

Материалы XVII международной
научной конференции

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И ХИМИИ



БФФХ - 2022



СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ



СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ

www.sevbppc.ru

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И ХИМИИ**

БФФХ – 2022

*Материалы XVII международной научной конференции
г. Севастополь, 19-23 сентября 2022 г.*

**MODERN TRENDS IN BIOLOGICAL PHYSICS AND CHEMISTRY
BPPC – 2022**

*Proceedings of XVII International Scientific Conference
Sevastopol, 19-23 of September, 2022*

Севастополь 2022

УДК 577.113:541.49

ББК

28.07

28.07 Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2022: материалы XVII международной научной конференции, г. Севастополь, 19-23 сентября 2022 г. – Севастополь, 2022. – 210 с.

Сборник материалов составлен по итогам XVII международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2022», организованной совместно Севастопольским государственным университетом и Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова с 19 по 23 сентября 2022 г. в Севастополе.

В сборнике приведены материалы научных работ, посвященных актуальным вопросам общей и молекулярной биофизики, нанобиофизики, биофизики клетки, биофизики сложных систем, проблемам современной биоорганической, биофизической и медицинской химии.

Издание рассчитано на научных работников, аспирантов, студентов.

Modern Trends in Biological Physics and Chemistry. BPPC-2022: proceedings of XVII International Scientific Conference, Sevastopol, 19-23 of September, 2022. – Sevastopol, 2022. – 210 p.

The proceedings is a compilation of the reports of XVII International scientific conference "Modern Trends in Biological Physics and Chemistry. BPPC-2022", organized by Sevastopol State University and Lomonosov Moscow State University 19-23 of September, 2022 in Sevastopol.

The proceedings contains materials of research papers, devoted to modern trends in general and molecular biophysics, nanobiophysics, cell biophysics, complex systems biophysics, problems of modern biological, biophysical and medicinal chemistry.

The publication is intended for scientists, postgraduate, students.

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ:

Евстигнеев Максим Павлович, проректор по научной деятельности СевГУ, профессор, д.ф.-м.н. – сопредседатель;

Твердислов Всеволод Александрович, заведующий кафедрой биофизики физического факультета МГУ, профессор, д.ф.-м.н. – сопредседатель;

Артюхов Валерий Григорьевич, заведующий кафедрой, профессор, д.б.н. (Воронежский государственный университет, г. Воронеж);

Бержанский Владимир Наумович, заведующий кафедрой, д.ф.-м.н. (Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, г. Симферополь);

Заседателев Александр Сергеевич, профессор (Институт молекулярной биологии РАН, г. Москва);

Нечипуренко Юрий Дмитриевич, д.ф.-м.н., в.н.с. (Институт молекулярной биологии РАН, г. Москва);

Ризниченко Галина Юрьевна, профессор (Московский государственный университет, г. Москва);

Рууге Энно Куставич, профессор (ФГБУ «НМИЦ Кардиологии» Минздрава России, г. Москва);

Тихонов Александр Николаевич, профессор (Московский государственный университет, г. Москва);

Эрнандес Сантьяго Адриан Аполинар, д-р философии (Автономный университет, г. Пуэбла, Мексика);

Яковенко Леонид Владимирович, профессор (Московский государственный университет, г. Москва).

PROGRAM COMMITTEE:

Evstigneev M.P., Vice-rector for Scientific Activity, Professor, Ph.D. (Sevastopol State University) – co-Chairman;

Tverdislov V.A., Head of the Department of Biophysics, Faculty of Physics, Professor, Ph.D. (Moscow State University) – co-Chairman;

Artyuhov V.G., Head of Department, Professor, Ph.D. (Voronezh State University, Voronezh);

Berzhansky V.N., Head of Department (V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol);

Hernandez Santiago A.A., Ph.D. (Autonomous University, Puebla, Mexico);

Nechipurenko Yu.D., Ph.D., Senior Researcher (Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow);

Riznichenko G.Yu., Professor, Ph.D. (Moscow State University);

Ruuge E.K., Professor, Ph.D. (Moscow State University);

Tikhonov A.N., Professor, Ph.D. (Moscow State University);

Yakovenko L.V., Professor, Ph.D. (Moscow State University);

Zasedatelev A.S., Professor, (Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow).

СОДЕРЖАНИЕ

СЕКЦИЯ 1. ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

| | |
|--|----|
| Г.А. Агаева, Г.Р. Сафарли, Н.М. Годжаев Конформационная подвижность молекулы гиламбатина, определенная методами молекулярного моделирования..... | 17 |
| Л.М. Апашева, М.И. Будник, Л.А. Смурова, О.Т. Касаикина, Е.Н. Овчаренко, А.В. Лобанов, В.В. Савранский, В.В. Турбин, М.В. Розанцев Лазерное импульсное излучение и растворы экопероксида для обработки семян сахарной свеклы | 18 |
| Л.М. Апашева, М.И. Будник, А.В. Лобанов, Н.А. Лукина, Е.Н. Овчаренко, К.Ф. Сергейчев Вода, активированная СВЧ-плазмотроном, как регулятор роста хвойных | 19 |
| Р.М. Багиров, Е.Ю. Боброва, Х.О. Гафарова, О.Ш. Багирова Комплексообразование ионов железа с грибными меланинами | 20 |
| О.Е. Багрова, Е.В. Белова, В.А. Твердислов Механическое поведение модельного элемента хиральной молекулярной машины | 21 |
| В.Ю. Байрамуков, М.В. Филатов, Р.А. Ковалев, Р.А. Пантина, С.В. Григорьев, Е.Ю. Варфоломеева Визуализация транскрипционно активного хроматина в ядрах эукариот, подвергнутых механической деформации, посредством атомно-силовой микроскопии..... | 22 |
| Е.Д. Борисова, Б.Э. Кожемова, О.О. Константинов, Е.А. Корепанова, В.М. Михеев, А.В. Михнич, В.И. Сухова, П.Н. Астанина, О.В. Коплак, А.А. Аносов Влияние наночастиц феррита кобальта в гидрофильной оболочке на проводимость бислойных липидных мембран | 22 |
| М.В. Вишневская, П.М. Готовцев Долговечный микробный биотопливный элемент на основе <i>Glucanobacter Oxydans</i> | 23 |
| А.В. Гаджи, Н.В. Шадрин, Е.В. Ануфриева, Я.В. Мегер, А.О. Лантушенко Локальный эндемизм <i>Artemia Salina</i> в гиперсоленом озере Сасык-Сиваш..... | 24 |
| Л.Н. Галль, А.С. Бердников, И.Р. Галль, Т.Э. Кулешова, Н.Р. Галль Структуры воды в тканях листьев растений: исследования методом L-диэлькометрии..... | 25 |
| А.Е. Гасанова, Н.А. Мусаев Биоэлектрические эффекты отмывания клеток <i>Chara fragilis</i> от растворов фитокомпозиции Одуванчик-Зверобой-Календулы..... | 26 |
| Ю.М. Горовой, Д.В. Наумов Передача информации и трансляция симметрии в реакции молекулярного распознавания биологических макромолекул..... | 27 |
| И.В. Жигачева, Н.И. Крикунова, И.П. Генерозова, П.А. Буцанец, С.В. Васильева Тетранитрозильный комплекс железа с тиосульфатными лигандами предотвращает дисфункцию митохондрий в условиях стресса | 28 |
| К.Б. Ильина, А.С. Бойкова, М.А. Марченкова, П.В. Конарев, Ю.В. Писаревский Особенности структуры растворов и кристаллизации лизоцима в H ₂ O и D ₂ O..... | 29 |
| А.И. Капитунова, И.Н. Доминова, В.В. Жуков Транскрипция генов γ M-кристаллинов в хрусталике молодых <i>Cyprinus Carpio</i> | 30 |
| Н.Е. Карузина, Е.В. Немцева, Б.С. Мельник Время-разрешенная флуоресценция карбоксиангидразы Б при вариации pH..... | 31 |

| | |
|--|----|
| В.С. Ключкова, А.С. Лелеков Соотношения фотосинтетических пигментов в накопительной культуре <i>Porphyridium purpureum</i> в условиях углеродного лимитирования..... | 32 |
| Р.Е. Марченков, Е.А. Йоник, И.И. Терехов, Е.В. Дворецкая, О.В. Коплак, А.А. Аносов Редкоземельные магнитные микропинцеты для биологических и медицинских приложений..... | 33 |
| П.Ф. Котюк, В.О. Корниенко Влияние сочетанного действия переменного магнитного поля с наночастицами Fe_3O_4 (cit) на онтогенез и морфометрию кукурузы сахарной..... | 34 |
| Н. Кочарли, С. Гумматова Продукция активных форм кислорода при действии ультрафиолетового-В излучения на клетки дрожжей..... | 35 |
| Т.Э. Кулешова, П.В. Желначева, З.А. Гасиева, А.С. Галушко, Г.Г. Панова Зависимость биоэлектрического потенциала в корнеобитаемой среде от формы азота в питательном растворе..... | 36 |
| К.К. Лапшина, О.Е.Багрова, Е.В. Белова Выявление консервативности вторичных структур в ходе эволюции белков различных классов | 37 |
| М.А. Марченкова, П.В. Конарев, Ю.В. Кордонская, К.Б. Ильина, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук Роль катионов и анионов при образовании кристаллизационных олигомеров в растворах белков по совокупности данных малоуглового рентгеновского рассеяния и молекулярной динамики | 38 |
| С.Р. Набиев, Л.В. Никитина, А.М. Матюшенко, Д.В. Щепкин, Г.В. Копылова Исследование влияния актин-связывающих белков на изгибную жесткость актиновой нити с помощью метода оптической ловушки..... | 39 |
| С.Р. Набиев, Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин Влияние сердечного миозин-связывающего белка с на характеристики одиночного актин-миозинового взаимодействия в миокарде..... | 40 |
| Д.С. Пайметьева, А.Н. Дубовицкая, М.Г. Холявка, М.С. Лавлинская, А.В. Сорокин, В.Г. Артюхов Иммобилизация фицина на матрицеполи-1-винил-1,2,4-триазола | 40 |
| Г.А. Погосян, М.А. Шагинян, М.С. Микаелян Влияние миллиметровых электромагнитных волн на перекисное окисление липидов в эритроцитах крови человека <i>in vitro</i> | 41 |
| О.А. Рогачевская, А.П. Черкашин, П.Ю. Фадеев, А.А. Хохлов Вход Ca^{2+} извне участвует в трансдукции сигналов вкусовыми клетками типа II..... | 42 |
| В.В. Рощина Азулены листовой поверхности как защитный оптический фильтр | 43 |
| И.Н. Доминова, М.В. Сафонов, В.В. Жуков Участвует ли NO-ергический механизм в регуляции световой чувствительности сетчатки <i>Lymnaea stagnalis</i> ? | 43 |
| Е.В. Семенова, Е.В. Белова О возможных причинах хиральных соответствий в фармакологии | 44 |
| Е.В. Семенова, В.И. Лобышев Электропроводность водных растворов аланина и валина, приготовленных итерационным методом разбавления с последующим интенсивным механическим воздействием..... | 45 |
| Ю.А. Сирюк, А.В. Безус, Р.А. Капшуков, В.В. Кононенко Возможности транспортировки магнитных микрообъектов решеткой полосовых доменов пленки феррита-граната..... | 46 |
| Ю.А. Сирюк, А.В. Безус, Р.А. Капшуков, В.В. Кононенко Особенности поведения магнитных микрообъектов на поверхности одноосной пленки феррита-граната | 47 |

| | |
|---|----|
| М.А. Суслов Применение метода ЯМР с парамагнитным допингом для оценки апопластного переноса воды в корнях интактных растений при действии абиотических стрессов..... | 47 |
| А.А. Талько, Н.Н. Волченко, А.А. Самков, А.А. Худокормов, В.А. Чоба, М.Г. Барышев Исследование влияния модификации изотопного D/H состава среды на прирост биомассы бактериальной культуры <i>Shewanella Oneidensis</i> Mr-1 | 48 |
| В.А. Твердислов Нарушение симметрии – физическая основа совершения «полезной работы» биологическими молекулярными машинами | 49 |
| Л.В. Терещенко, Л.С. Жиганов, М.А. Кадочникова, Е.А. Красавин, А.В. Латанов Изменения зрительного внимания у обезьян после воздействия протонного излучения высокой энергии | 49 |
| Н.Н. Тимченко, И.В. Головченко Температурное поведение гемоглобина А | 50 |
| Д.О. Фесенко Гидрогелевые биологические микрочипы низкой плотности – новый высокочувствительный инструмент ДНК-фенотипирования и генетической идентификации личности | 51 |
| А.А. Цай, Т.И. Васильева, В.А. Глушников, Н.А. Роденко Влияние импульсного магнитного поля на компоненты аμιлолитической реакции..... | 52 |
| Д.Н. Чернышев, В.С. Клочкова, А.С. Лелеков, Е.С. Серяк Оценка пигментного состава микроводоросли <i>Porphyridium purpureum</i> по спектру поглощения культуры с применением табличного процессора | 53 |
| Е.В. Чихиржина, Т.Ю. Старкова, А.С. Цимоха, А.Н. Томилин, А.М. Поляничко Особенности структуры и функции негистоновых белков хроматина HMGB1 и HMGB2..... | 54 |
| В.А. Чоба, А.А. Талько, М.Г. Барышев Верификация теории изотопного резонанса | 55 |
| М.А. Шагинян, М.С. Микаелян, П.О. Вардеванян Исследование влияния ММ ЭМВ на комплексообразование Hoechst 33258 с биомакромолекулами | 56 |
| И.А. Шаев, Е.В. Яблокова, В.В. Новиков Временная динамика продукции активных форм кислорода нейтрофилами после обработки в гипомагнитных условиях | 57 |
| М. Шейнман, Ф. Массип, П.Ф. Арндт Bacterial networks of horizontal allele transfer | 57 |
| Д.М. Шумейко, А.Ю. Поплавская, В.А. Доценко, А.С. Лелеков Зависимость среднего диаметра клеток <i>Porphyridium purpureum</i> (Boyu) Ross от освещенности..... | 58 |
| Ю.А. Яковлева, К.В. Шадрин, В.Г. Пахомова, О.В. Крюкова Влияние наночастиц магнетита на функциональную активность изолируемой перфузируемой печени | 56 |
| Т.А. Яхно, Т.А. Богданов, А.Г. Санин, В.Г. Яхно Электронная микроскопия дисперсной фазы дистиллированной воды | 60 |

СЕКЦИЯ 2. МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

| | |
|--|----|
| Л.Н. Агаева, А.А. Абдинова, С.Р. Ахмедова, Н.Ф. Ахмедов, Н.А. Ахмедов Теоретический конформационный анализ молекулы бета-лактоर्फина..... | 62 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| С.В. Аксенова, А.С. Батова, А.Н. Бугай, Э.Б. Душанов Влияние модуляторов на активацию рецептора NMDA | 63 |
| Н.А. Ахмедов, Л.Н. Агаева, Р.М. Аббаслы, Л.И. Исмаилова Структурная организация молекулы альфа-лакторфина | 64 |
| А.С. Бескудрова, А.А. Пантелеев, В.В. Шинин, Н.Т. Левашова, А.Э. Сидорова Клеточная динамика структуры эпидермиса в условиях гомеостаза | 65 |
| Ю.Н. Чиргадзе, Е.В. Бражников, И.В. Лихачев, Н.К. Балабаев Передача конформационного сигнала от аллостерического ингибитора к активному центру в ферменте белковая тирозин фосфатаза РТР1В человека | 65 |
| М.А. Васильева, А.Н. Бугай, Э.Б. Душанов Моделирование репарации повреждений ДНК, индуцированных тяжелыми ионами в клетках млекопитающих | 66 |
| В.В. Войнаровский, Г.Г. Мартинович Защитные свойства эритроцитов при гемолизе и их регуляция окислителями | 67 |
| А.В. Гисич, Е.С. Ястребова, В.П. Мальцев Определение условного возраста эритроцитов с учетом процесса везикуляции | 68 |
| Е.П. Глаголева, В.Г. Артюхов, И.Е. Лесных, И.А. Колтаков Влияние особенностей пространственной структуры триптофана в составе сывороточного альбумина быка на его спектральные характеристики в области длин волн 130-230 нм | 69 |
| А.В. Гладышева, А.А. Гладышева, В.А. Терновой, А.П. Агафонов Белки капсида потенциально патогенных для человека новых вирусов, как объекты для кристаллографического исследования методом синхротронного излучения | 70 |
| А.А. Гладышева, А.В. Гладышева Моделирование пространственных структур вирусных белков и поиск функционально значимых регионов нового многокомпонентного вируса Kindia tick virus | 71 |
| А.А. Гриневич, И.С. Масулис, Л.В. Якушевич Математическое моделирование влияния торсионного момента на динамику транскрипционного пузыря в плазмиде рPF1 со вставками промоторсодержащих последовательностей из <i>E. Coli</i> | 72 |
| С.Д. Демухамедова Теоретическое квантово-химическое моделирование структуры и свойств дипептида карнозина методом DFT | 73 |
| А.А. Елкина, М.И. Дроботенко, С.С. Джимак Возникновение зон открытых состояний в молекуле ДНК в зависимости от локализации и величины торсионного воздействия | 74 |
| Х.Л. Эрнандес Касерес, С.С. Джимак, М.И. Дроботенко, А.А. Свидлов, Д.И. Кудрявцев, Ю.Д. Нечипуренко Модели, описывающие проведение нервного импульса | 75 |
| А.А. Елкина, М.И. Дроботенко, А.А. Свидлов Влияние внешнего силового воздействия различной частоты на динамику молекулы ДНК | 76 |
| Н.А. Захаров, Е.М. Коваль, Л.В. Гоева, Е.В. Шелехов, А.Д. Алиев, М.Р. Киселев, В.В. Матвеев, Т.В. Захарова Влияние альбумина яичного белка на биоминерализацию карбоната кальция в водных растворах | 77 |
| И.А. Стрельников, Н.А. Ковалева, Е.А. Зубова Определение из экспериментальных данных крупнозернистых степеней свободы двойной спирали ДНК, отвечающих за конформационные переходы из В- в А- и С- формы | 78 |

| | |
|--|----|
| Л.И. Исмаилова, Р.М. Аббаслы, Н.А. Ахмедов Пространственная структура глипролинового пентапептида | 79 |
| Ю.С. Карташова, В.Г. Артюхов, Е.П. Глаголева, И.А. Колтаков Особенности пространственной структуры трипина в нативном состоянии и при фотомодификации коротковолновым УФ-излучением..... | 80 |
| И.В. Клименко, Т.Ю. Астахова, Е.Н. Тимохина, А.В. Лобанов Димеризация фталоцианина алюминия в органической и водно-органической средах | 81 |
| П.П. Кобчикова, С.В. Ефимов, В.В. Клочков Подходы к анализу данных, полученных с помощью моделирования молекулярной динамики | 82 |
| И.А. Колтаков, В.Г. Артюхов, Д.А. Луковиков. Исследование влияние пептидных связей на формирование полос поглощения фенилаланина в диапазоне длин волн 140-270 нм | 83 |
| Н.А. Колтовая, Э.Б. Душанов Мутационный анализ структуры дрожжевой аргинин пермиазы CAN1 | 83 |
| Ю.В. Кордонская, В.И. Тимофеев, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук Молекулярная динамика олигомеров лизоцима в кристаллизационных растворах с различными осадителями..... | 84 |
| Л.А. Краснобаева, Л.В. Якушевич Особенности структуры потенциального поля плазмиды PPF1 и их влияние на характер движения нелинейных конформационных возмущений – кинков | 85 |
| И.А. Лавриненко, Ю.Д. Нечипуренко Кооперативность гемоглобина – ключевая модель молекулярной биофизики | 86 |
| А.А. Лашков, П.А. Эйстрих-Геллер, В.Н. Самыгина, С.В. Рубинский Исследование методами КМ/ММ ферментативной реакции с участием ванадат-иона, катализируемой уридинфосфорилазой из <i>V. Cholerae</i> | 87 |
| Н.Т. Левашова, А.Э. Сидорова, Д.В. Лукьяненко, Р.Л. Аргун, А.Я. Гараева, К.А. Зуев, Е.П. Георгиевская, Е.В. Белова Особенности моделирования процессов самоорганизации в биологических системах | 88 |
| Н.А. Марнаутов, А.Б. Елфимов, Л.Х. Комиссарова Исследование возможности выявления различий в развитии опухолевого процесса путем кластеризации с использованием алгоритма kMEANS, на примере мышей с перевитой карциномой Льюис | 90 |
| О.С. Никонов, М.В. Лебедева, Е.Ю. Никонова, В.В. Колесникова, В.В. Таранов, А.В. Бабаков, С.В. Никонов Структурные аспекты взаимодействия VPg вируса картофеля Y и кэп-связывающих факторов семейства EIF4E картофеля | 91 |
| М.А. Пак, Д. Н. Иванков Применение AlphaFold в предсказании изменения стабильности белка вследствие мутаций | 91 |
| И.С. Панина, Н.А. Крылов, А.О. Чугунов, Р.Г. Ефремов, Л.В. Кордюкова Молекулярный механизм селективности фермента hDHHC20 к липидному субстрату: исследование <i>in silico</i> | 93 |
| М.Б. Стригин Экологическая ниша как потенциальная яма, определяющая собственные значения волновой функции живого | 93 |

| | |
|---|----|
| К.Б. Терешкина, Н.Г. Лойко, Э.В. Терешкин, В.В. Коваленко, А.А. Генералова, Ю.Ф. Крупянский Структурные особенности кластеров ДНК-DPS при изменении концентрации 4-гексилрезорцина | 94 |
| А.В. Халаимова, А.В. Кузнецов Влияние слабого электромагнитного излучения на трихоплаксов (Placozoa), опосредованное Са-каналами Т-типа | 95 |
| С.С. Хрущев, Т.Ю. Плюснина, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин Мезомасштабный подход к моделированию фотосинтетического переноса электронов с использованием клеточных автоматов | 97 |
| Д.К. Чистюлин, Е.А. Зелепуга, В.А. Хоменко, О.Д. Новикова Взаимодействие канала OmpF порина <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> с норфлоксацином | 98 |
| Д.К. Шпигун, А.О. Луценко, А.Э. Сидорова Методика оценки хиральности регулярных и нерегулярных структур белков | 99 |
| И.В. Кручинин, Л.В. Яковенко, Два конкурирующих механизма при агрегации миксамеб <i>Dictyostelium discoideum</i> | 99 |

СЕКЦИЯ 3. МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

| | |
|---|-----|
| А.С. Аверин, Ф.В. Тюрин, К.В. Самодурова, В.Г. Старков, Т.В. Андреева, Ю.Н. Уткин Сравнительное исследование воздействия двух кардиотоксинов кобры на папиллярную мышцу и сердце крысы, перфузируемое по Лангендорфу | 101 |
| Я.А. Андреев, А.П. Калиновский Нейробластома SH-SY5Y, дифференцированная ретиноевой кислотой, как доступная клеточная модель для изучения кислоточувствительных ионных каналов человека 1a (ASIC1a) | 102 |
| В.Н. Антипова, К.В. Соболев, Е.П. Корепанова, С.А. Воронцов, Е.В. Левада, В.В. Родионова Влияние плазменной обработки на морфо-механические и адгезивные свойства магнитоэлектрических биологических интерфейсов | 102 |
| А.П. Антонян, М.А. Парсаданян, З.О. Мовсесян, А.А. Шиладжян, К.Р. Григорян, П.О. Вардеванян Особенности связывания метиленового синего с одноцепочечными синтетическими полинуклеотидами Poly(rA) и Poly(rU) | 103 |
| В.Г. Артюхов, А.Н. Барилюк, И.А. Колтаков Особенности структурных свойств сывороточного альбумина быка в условиях воздействия длинноволнового УФ-излучения | 104 |
| Ю.Л. Бабурина, И.В. Одинокова, Р.Р. Крестинин, Л.Д. Сотникова, О.В. Крестинина Роль модуляторов неспецифической поры mPTP в митохондриальных патологиях при хронической алкогольной интоксикации | 105 |
| А.П. Баврина, П.В. Пчелин, Р.Д., Лапшин И.И. Белоусова, Н.А. Щелчкова Влияние низкоинтенсивного красного света на функциональное состояние митохондрий при моделировании миофасциального синдрома у крыс | 106 |
| Е.М. Бакурова, Р.Б. Кондратюк, Ю.Д. Турсунова Особенности метаболизма пероксида водорода в опухолях при их эпителиально-мезенхимальном переходе | 107 |
| Н.В. Леконцева, А.Е. Своглазова, А.О. Михайлина, В.В. Марченков, В.А. Балобанов Создание функционального олигомерного белка: проверка возможности стабилизации кольцевого гептамера sm-подобным белком из <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> | 108 |

| | |
|--|-----|
| Д.К. Баушева, Е.Л. Гурьев, Н.Ю. Шилягина, В.А. Воденев, С.М. Деев, А.В. Звягин Получение люминесцентных тераностических наноконплексов на основе антистоксовых нанофосфоров и рекомбинантных белков..... | 108 |
| Н.Е. Беликов, И.И. Демина Левина, А.Ю. Лукин, А.Я. Сафинова, Л.Е. Петровская, С.Д. Варфоломеев, А.А. Ходонов Фотохромные лиганды для модификации катионов металлов и квантовых точек..... | 109 |
| Л.В. Беловолова, М.И. Беловолов, В.М. Парамонов, М.М. Беловолов, М.В. Свистушкин, А.А. Луничева Методика исследования вибрационной активности голосовых связок..... | 110 |
| Л.В. Бельская, Е.А. Сарф Характеристики ИК спектров слюны при патологиях представительной железы..... | 111 |
| Ю.Г. Бирулина, В.В. Иванов, Е.Е. Буйко, М.О. Вольхина, М.М. Щербакова Роль циклических нуклеотидов в регуляции сокращений гладких мышц воздухоносных путей при метаболическом синдроме..... | 112 |
| А.В. Благова, Г.О. Степанов, А.Н. Осипов Образование пор в мембранах липосом, индуцированное взаимодействием фосфатидной кислоты и цитохрома с в присутствии перекиси водорода..... | 113 |
| М.А. Большаков, А.В. Самойлова, А.А. Гостюхина, О.С. Дорошенко, О.П. Кутенков, К.В. Зайцев, В.В. Ростов Наносекундные микроволновые импульсы влияют на скорость пролиферации стволовых клеток..... | 114 |
| Р.В. Бутяев, Д.А. Чернышев, Э.С. Михайлец, Л.В. Плотникова, А.Д. Гарифуллин, А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, А.М. Поляничко Применение метода главных компонент для скрининга пациентов с онкогематологическими заболеваниями..... | 115 |
| П.О. Вардеванян, А.П. Антонян, М.А. Парсаданян, Н.Р. Петросян Особенности флуоресцентных характеристик Hoechst 33258 при комплексообразовании с бычьим сывороточным альбумином..... | 116 |
| В.В. Волков, Г.О. Степанов, А.Н. Осипов. Перекисное окисление липидов, индуцированное цитохромом с в присутствии фосфатидной кислоты. Перспективная роль в развитии апо- и ферроптотических процессов..... | 117 |
| А.Ф. Петрова, А.В. Халиуллина, Д.Л. Мельникова, Д.И. Камбеева, О.И. Гнездилов, Р.С. Гиматдинов Самодиффузии в системе липосом по данным ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля..... | 118 |
| А.Р. Юсупова, И.В. Ковязина, Р.С. Гиматдинов Исследование биологической деструкции тканей методом ядерного магнитного резонанса..... | 119 |
| Д.И. Грачев, В.А. Медведева, К.Б. Шумаев, В.З. Ланкин, Э.К. Рууге Динитрозильные комплексы железа как ингибиторы перекисного окисления липидов..... | 120 |
| Н.А. Гребешкова, А.А. Глотов, Н.А. Роденко Исследование воздействия импульсного магнитного поля на биологическую активность 1,1-бис(1 <i>h</i> -имидазол-1-ил)метанимина..... | 121 |
| Д.А. Грехнёв, В.А. Вигонт, О.С. Лебедева, Л.Д. Беликова, С.А. Ключников, Е.В. Казначеева Пациент-специфичные модели полиглутаминовых заболеваний: нарушение кальциевой сигнализации и селективная гибель нейронов..... | 122 |

| | |
|---|-----|
| Л.Н. Гринкевич “Простые Нервные Системы” в исследованиях эпигенетических механизмов долговременной памяти | 123 |
| В.С. Гусакова, Л.В. Смаглий, Е.А. Голованов, Т.Н. Зайцева, С.В. Гусакова, М.А. Пшемьский, В.А. Рашкаускайте Сократительная активность гладкомышечных клеток легочной артерии крысы в модели гипоосмотической стрикции: вклад хлорного транспорта | 123 |
| О.И. Гуценко, И.В. Корниенко, А.А. Ананян, Н.П. Милютина, В.В. Внуков Митохондриально-направленный антиоксидант SKQ1 регулирует сигнальную систему KEAP1/NRF2/ARE и апоптоз в лейкоцитах крови при окислительном стрессе | 124 |
| О.К. Gasymov, M. Bakhishova, R.B. Gasanova, R.B. Aslanov, L. Melikova, J.A. Aliyev Benzotate group attachment to TEMPO provides enhanced discrimination of liposomes fabricated using human lung normal and carcinoma cells | 126 |
| А.Р. Дюкина, И.В. Тихонова, В.Г. Сафронова Адгезивные свойства гранулоцитов костного мозга мышей, устойчивых к ожирению, при остром воспалении..... | 127 |
| А.Р. Дюкина, С.И. Заичкина, М.М. Поцелуева, Д.П. Ларюшкин, Н.В. Минаев, В.И. Юсупов Исследование действия низкоинтенсивного фемтосекундного лазерного излучения на мышцах <i>in vivo</i> на молекулярном, клеточном и организменном уровнях..... | 128 |
| А.В. Ерофеев, Н.В. Грановский, П.И. Селиванова, А.И. Шугаева, А.С. Шаракшанэ, М.И. Щербаков, А.Д. Мансфельд, А.А. Аносов Контроль параметров температурного распределения в предплечье человека при процедуре УВЧ-гипертермии методами пассивной акустической термометрии и инфракрасной термографии | 129 |
| Н.М. Каштанова, Е.Н. Животова, Г.Г. Сучкова, Г.А. Дружинин, Т.И. Оранская Влияние КВЧ-терапии на восстановление артериального давления и пульса переболевших COVID-19 после физической нагрузки | 129 |
| Л.В. Жорина, И.Д. Матвеев, В.Н. Аникеев Действие КВЧ излучения с длиной волны 5,6 мм на биообъекты <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> | 130 |
| Э.Р. Журавлева, Г.О. Степанов, А.Н. Осипов Исследование влияния фосфатидной кислоты на температуру конформационного перехода комплексов [цитохром С+ фосфолипиды]..... | 131 |
| А.В. Иванов, М.А. Уварова, Е.В. Семенова Авидность IgG К SARS-CoV-2 у беременных женщин коррелирует с уровнем антител в крови и не зависит от давности перенесённого заболевания COVID-19..... | 132 |
| М.М. Игнатьева, М.В. Новаковская, И.А. Черенков Активация бактериальным липополисахаридом клеток перитонеального смыва в биоэлектрохимической модели..... | 133 |
| А.Т. Ишемгулов, С.Н. Летута, Д.В. Дорофеев, Д.Е. Цюрко Изучение механизмов фотодеструкции бактерий в присутствии молекул-сенситизаторов | 134 |
| К.Д. Казаринов, В.А. Щелконогов, А.В. Чеканов, О.А. Баранова, И.Г. Полников Исследование легочной сурфактантной системы с помощью электрической генерации капиллярных волн | 135 |
| Е.Б. Киселева, М.Г. Рябков, П.А. Зарубенко, М.А. Сизов, М.В. Багрянцев, Г.В. Геликонов, Н.Д. Гладкова Оптическая когерентная ангиография ишемизированной кишки в открытой и лапароскопической хирургии | 135 |

| | |
|--|-----|
| Д.Р. Колтышев, В.П. Баранников, И.Н. Межевой, В.И. Смирнов Термодинамика взаимодействия цитозина с различными пептидами | 136 |
| М.С. Конькова, Е.С. Ершова, Н.Н. Вейко, А.А. Кальянов, Л.В. Каменева, В.П. Вейко, С.В. Костюк Ионизирующее излучение в дозе 50 сГр способствует проникновению GC-обогащенных плазмид в мезенхимные стволовые клетки человека | 137 |
| С.П. Конюхова, В.В. Волков, Г.О. Степанов, А.Н. Осипов Тушение флуоресценции NBD-PC в DOPC, DOPA и TOCL содержащих мембранах при добавлении цитохрома с | 138 |
| Т.Ю. Копнова, Л.Р. Якупова, Скуредина А.А., Кудряшова Е.В. Термодинамические параметры взаимодействия человеческого сывороточного альбумина с комплексами левовлоксацина с β -циклодекстринами | 139 |
| П.Д. Котова, Е.А. Дымова, О.А. Рогачевская получение моноклональной линии клеток, экспрессирующих сенсоры cAMP и Ca^{2+} , для тестирования лекарственных соединений | 140 |
| О.В. Крестинина, Р.Р. Крестинин, Ю.Л. Бабурина, Л.Д. Сотникова Защитное действие астаксантина в митохондриях мозга у крыс с сердечной недостаточностью | 141 |
| Л.В. Крылова, А.А. Горохова, В.Ф. Отвагин, А.В. Нючев, А.Ю. Федоров, И.В. Балалаева Исследование противоопухолевой активности конъюгата хлорина <i>eb</i> с кабозантинибом как агента с комбинированным действием | 142 |
| М.С. Лавлинская, А.В. Сорокин, С.С. Ольшанникова, М.Г. Холявка, Н.Е. Юдин, В.Г. Артюхов Стабилизация протеолитической активности папаина путем создания наноразмерных гибридных препаратов | 143 |
| А.В. Моторжина, С.Е. Пшеничников, В.В. Малащенко, С. Йованович, Л.С. Литвинова, Л.В. Панина, В.В. Родионова, Е.В. Левада Оценка цитотоксичности наноконструкций золота и кобальтового феррита, легированного Zn/Ga | 143 |
| А.Л. Литвиненко, В.М. Некрасов, В.П. Мальцев Оценка чувствительности тромбоцитов крови человека к агонисту активации методом сканирующей проточной цитометрии в условиях применения антитромбоцитарной терапии | 144 |
| М.Г. Маклецова, Г.Т. Рихирева, М.Ю. Вакуленко Полиамины и возраст-зависимые заболевания | 145 |
| Е.М. Малиновская, Е.А. Савинова, В.А. Сергеева, Е.С. Ершова, Е.В. Проскурнина, Л.В. Каменева, О.А. Долгих, Н.Н. Вейко, О.А. Краевая, П.А. Трошин, С.В. Костюк Влияние водорастворимых производных фуллерена C_{60} на уровень активных форм кислорода в культивируемых <i>in vitro</i> эмбриональных фибробластах легких человека | 146 |
| А.В. Мельницкая, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая, В.И. Бадюлина Модулирующее влияние цистамина и цистина на транспорт Na^+ в коже лягушки | 147 |
| Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая, В.И. Бадюлина, А.О. Симонян Влияние нейрорептинов на Ca^{2+} -ответы, вызываемые глутоксимом и моликсаном в перитонеальных макрофагах | 148 |
| Г.И. Морозова, О.А. Лопатина, А.А. Аношин Феномен аутомикробиоты в противоопухолевом эффекте «метода Шевченко», выявляемый с помощью флуоресцентного зондирования нативной крови | 149 |

| | |
|--|-----|
| А.В. Моторжина, С.Е. Пшеничников, С. Йованович, А.А. Аникин, В.К. Беляев, В.В. Родионова, Л.В. Панина, Е.В. Левада Наноккомпозит кобальтовый феррит/золото для фототермической терапии..... | 150 |
| П.А. Мутовкин, Ю.О. Веляев, А.А. Мосунов, В.Н. Василец, М.П. Евстигнеев, О.С. Завьялова, К.А. Рыбакова Исследование сверхвысокомолекулярного полиэтилена для медицинских целей методами комбинационного рассеяния..... | 151 |
| А.М. Mammedzade, А.Ж. Mamedova, О.К. Gasymov Structure of silk fibroin nano-particles: characterization of hydrophobic patches..... | 152 |
| Г.А. Набережных, О.Д. Новикова Квантовые точки сульфида кадмия, полученные с использованием белков-поринов, каррагинанов, хитозанов и липополисахаридов..... | 153 |
| М.А. Наквасина, В.Г. Артюхов, М.С. Радченко, Т.И. Старикова, Н.Г. Сараджи, В.А. Щиголева Пути реализации апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного пероксидом водорода, и их регулирование..... | 154 |
| В.А. Овсянников Способ лечения онкологических больных в стадии метастазирования..... | 155 |
| А.А. Олешкевич Анализ сочетанного изменения активности ферментов гомеостаза сыворотки крови собак методами математической нелинейной динамики..... | 155 |
| А.А. Пастухов, С.М. Пестов Термодинамическое моделирование систем с бензойной кислотой как “модельных систем” для фармацевтики..... | 156 |
| П.В. Перетягин, А.Г. Соловьева Влияние активных форм кислорода на параметры вариабельности сердечного ритма при длительном применении в эксперименте..... | 157 |
| А.Г. Погорелов, Л.Г. Ипатова, А.Л. Кузнецов, В.Н. Погорелова, А.И. Панат, О.А. Суворов Спектрометрия раствора сывороточного альбумина в электрохимически активированной воде..... | 158 |
| А.А. Прокопов, А.В. Митронин Спектроскопия ЯМР слюны пациентов с хроническими формами нарушения мозгового кровообращения..... | 159 |
| Е.В. Проскурнина, О.А. Долгих, М.М. Созарукова, С.В. Костюк Эффект малых доз радиации на оксидативный метаболизм нейтрофилов и моноцитов крови..... | 160 |
| С.Е. Пшеничников, А.В. Моторжина, В.В. Малащенко, С. Йованович, Л.С. Литвинова, Л.В. Панина, В.В. Родионова, Е.В. Левада Цитотоксические эффекты наноккомпозита золота и легированного галлием кобальтового феррита..... | 161 |
| М.Ю. Раваева, Е.Н. Чуян, И.В. Черетаев Показатели тканевого окислительного метаболизма при действии низкоинтенсивного миллиметрового излучения..... | 162 |
| Н.А. Роденко, Т.И. Васильева, В.А. Глушечков, И.А. Беляева Влияние импульсного магнитного поля высокой напряженности на изменение антибактериальной активности бета-лактамов антибиотиков..... | 163 |
| Н.О. Ронжин, Е.Д. Посохина, О.А. Могильная, А.П. Пузырь, И.И. Гительзон, В.С. Бондарь Система цитохрома р450 может участвовать в светоизлучении высших грибов..... | 164 |
| Н.О. Ронжин, Е.Д. Посохина, Е.В. Михлина, И.И. Рыжков, В.С. Бондарь Сенсорный композит нановолокна γ -Al ₂ O ₃ / наноалмазы / Cu ²⁺ с увеличенной каталитической активностью для детекции фенолов в водной среде..... | 165 |

| | |
|---|-----|
| Т.В. Рыбинская, О.Ю. Портнягина, Е.А. Зелепуга, Н.Ю. Ким, Е.А. Чингизова, Е.С. Менчинская, В.А. Хоменко, Д.К. Чистюлин, О.Д. Новикова Исследование амилоидогенного потенциала неспецифических поринов <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | 166 |
| Т.С. Серченя, И.В. Горбачева, П.А. Семижон, Е.П. Счесленок, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов структурно-функциональная стабильность рекомбинатного рецептора Бета-лактамовых антибиотиков VLaR-CTD..... | 167 |
| А.И. Сидякин, Э.Р. Джелдубаева, Е.Н. Чуян, С.И. Чмелёва, К.Н. Туманянц, С.Ю. Ливенцов Особенности воздействия низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на культуры грамположительных и грамотрицательных условно-патогенных бактерий | 168 |
| О.В. Слатинская, Г.В. Максимов Изменение конформации и распределения гемоглобина при изменении объема эритроцита..... | 169 |
| Л.В. Смаглий, В.С. Гусакова, С.В. Гусакова, А.А. Калинина, П.Е. Рязанцева, А.Ш. Сафарова, Ж.А. Шарипханова АТФ-зависимая регуляция тонуса кровеносных сосудов в гипосмотической среде..... | 170 |
| А.Г. Соловьева Каталитические и кинетические свойства ферментов антиоксидантной защиты в крови при экспериментальной термической травме под воздействием оксида азота..... | 171 |
| А.В. Сорокин, С.С. Ольшанникова, М.С. Лавлинская, М.Г. Холявка, Н.Е. Юдин, В.Г. Артюхов Стабилизация активности бромелина, папаина и фицина путем их комплексообразования с графт-сополимерами натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и <i>N</i> -винилимидазола..... | 172 |
| М.Ю. Сучков, Г.О. Степанов, А.Н. Осипов Молекулярные механизмы инициации феррототических процессов при действии комплексов цитохрома С с фосфатидной кислотой | 173 |
| Е.Е. Текуцкая, Л.Р. Гусарук, И.И. Павлюченко Степень окислительного повреждения ДНК и полиморфизм rs652438 гена <i>MMP-12</i> при мультифакториальных заболеваниях в условиях оксидативного стресса..... | 174 |
| М.Е. Никитина, М.А. Агафонов, Е.С. Делягина, Н.Е. Кочкина, И.В. Терехова Гидрогели медицинского назначения на основе каррагинанов и 5-фторурацила | 175 |
| Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова, А.Н. Осипов Определение антиоксидантной способности АпоВ-содержащих липопротеинов сыворотки крови..... | 175 |
| Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова, О.Б. Любичкий, А.Н. Осипов Радикалперехватывающие и железохелатирующие свойства кофеиновой кислоты | 176 |
| Е.П. Тимохина, Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, В.В. Яглов Изменения секреторных процессов в щитовидной железе при сдвиге баланса дейтерия и протия в организме | 177 |
| А.А. Тимошин, В.Л. Лакомкин, А.А. Абрамов, Э.К. Рууге Образование короткоживущих активных форм кислорода в гомогенате сердца крысы. исследование методом ЭПР | 178 |
| В.Ю. Титов, А.Н. Осипов, И.И. Кочиш, А.М. Долгорукова Специфические функции оксида азота в эмбриогенезе..... | 179 |
| И.В. Тихонова, А.А. Гриневич, А.В. Танканаг, В.Г. Сафронова Влияние нагрева на кожную микрогемодинамику и кинетику генерации активных форм кислорода у больных сахарным диабетом 2 типа..... | 180 |

| | |
|---|-----|
| А.Л. Ткаченко Аспекты применения информационных приложений в биофизической медицине..... | 181 |
| Е.В. Проскурнина, М.М. Созарукова, М.В. Федорова, М.В. Киселева Анализ активности микросомальных редуктаз ткани яичников после криоконсервации методом активированной хемилюминесценции..... | 182 |
| М.Г. Холявка, С.М. Панкова, С.С. Ольшаникова, В.А. Королева, В.Г. Артюхов Влияние УФ-излучения на удельную активность свободных и иммобилизованных путем адсорбции и включения в гели протеолитических ферментов..... | 183 |
| Ю.М. Чудакова, Г.В. Шмарина, Е.С. Ершова, С.Г. Никитина, С.В. Костюк Усиление окислительного стресса и изменение в уровне экспрессии генов BCL и BAX у детей с тяжелой формой РАС..... | 184 |
| А.С. Шафорост, Е.В. Воропаев Особенности свойств мембраны эритроцитов у пациентов с тяжелым течением COVID-19..... | 184 |
| О.М. Масленникова, М.Н. Шипко, А.Л. Сибирев, М.А. Степович Особенности белок-индуцированных ассоциатов при сверхвысоком разведении антител к интерферону- γ | 185 |
| И.И. Шошина, И.С. Зеленская, М.П. Бекренева, С.И. Ляпунов, И.С. Ляпунов, Д.А. Котова, Е.С. Томиловская Контрастная чувствительность и микродвижения глаз как маркеры адаптации и реадaptации в модельном эксперименте по изучению влияния изменений гравитации..... | 186 |
| К.Б. Шумаев, О.В. Космачевская, А.Ф. Топунов, Д.И. Грачев, Э.И. Насыбуллина, И.С. Пугаченко, Э.К. Рууге Новые варианты динитрозильных комплексов железа. Антиоксидантное и антирадикальное действие..... | 188 |
| В.А. Щелконогов, А.В. Чеканов, О.А. Баранова, К.Д. Казаринов, Н.С. Шастина, С.Л. Стволинский, Т.Н. Федорова, Э.Ю. Соловьева, А.И. Федин, Г.М. Сорокоумова Липосомальная форма с липоевой кислотой и карнозином: получение, антиагрегантное и антиоксидантное действие..... | 189 |
| Е.А. Генералов, Е.Ю. Симоненко, Л.В. Яковенко Возможные молекулярные механизмы действия полисахаридов при вирусных заболеваниях..... | 190 |

СЕКЦИЯ 4. БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ

| | |
|--|-----|
| Е.В. Бажина, В.В. Стасова Особенности структуры кроны и строения побегов пихты сибирской разной сексуализации..... | 192 |
| Н.В. Бурдиян Распределение анаэробных бактерий в донных осадках в зависимости от окислительно-восстановительных условий и глубины (на примере прибрежной акватории Севастополя, Крым, Чёрное море)..... | 193 |
| Т.В. Возная, А.А. Мосунов, Е.Н. Сибирцова, Н.С. Кузьминова, А.В. Темных, М.И. Силаков Микропластиковое загрязнение прибрежных зон рекреации Севастополя..... | 194 |
| О.А. Гасюк, Н.Н. Волченко, А.А. Лазукин, А.А. Самков, А.А. Худокормов Биоэлектрогенез микробных топливных элементов в присутствии <i>shewanella oneidensis</i> MR-1 и некоторых тяжелых металлов..... | 195 |
| Ю.В. Дорошенко Микробиологическая составляющая гидротехнических сооружений как фактор самоочищения прибрежных акваторий..... | 196 |

| | |
|--|-----|
| А.И. Зейналов, М.А. Савицкий, А.В. Бебиашвили, А.В. Кузнецов Реакция некоторых представителей двустворчатых моллюсков чёрного моря на свет: структурная модель чувствительного к голубому свету опсина <i>Mytilus galloprovincialis</i> | 197 |
| Э.А. Иванова Эко-генетическая стресс-устойчивость растений, как стратегия и тактика: супермолекулярно-протеомного, морфо-динамического дизайна физико-химической природы биологии развития | 199 |
| И.А. Ильючик, Л.О. Захаревич, В.Н. Никандров Влияние $Cr_2(SO_4)_3$ на состояние клеток культуры <i>Chlorella vulgaris</i> при различном содержании в питательной среде источника азота – KNO_3 | 200 |
| М.В. Фадеева, В.М. Курченко, А.В. Кузнецов Описание семейства катионных TRPA1-каналов <i>Trichoplax adhaerens</i> | 201 |
| Д.Н. Маторин, О.В. Яковлева, Д.А. Тодоренко, С.Н. Горячев, А.А. Алексеев Использование замедленной флуоресценции хлорофилла водорослей для биотестирования загрязнений | 202 |
| Р.О. Мягченко, Е.В. Ануфриева, В.А. Яковенко, Н.В. Шадрин Влияют ли заросли тростника <i>Phragmites australis</i> (sav.) trin. ex steud. на распределение зоопланктона в гиперсоленом озере Мойнаки (Крым)? | 203 |
| А.А. Олешкевич, С.А. Комарова, В.И. Федоров Физиологические особенности систем организма северных оленей различных климатических зон | 204 |
| Е.Н. Скуратовская, А.С. Алемова, А.Д. Сербин Влияние нефтяных углеводородов на биохимические показатели черноморской мидии <i>Mytilus galloprovincialis</i> | 205 |
| А.А. Солдатов, А. Брюханов Функциональные аспекты толерантности гидробионтов к сероводородному заражению | 206 |
| С.И. Чмелёва, Э.Р. Желдубаева, Е.Н. Чуян, А.И. Сидякин, К.Н. Туманянц Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на прорастание семян <i>Glycine max</i> l. в условиях недостаточного водообеспечения | 207 |
| В.Е. Шаповалова, В.П. Евстигнеев, А.В. Гаджи, А.О. Лантушенко Морфометрический анализ микроводорослей рода <i>Dunaliella</i> из гиперсоленых озер Крыма | 208 |
| Л.Н. Шишкина, А.С. Дубовик, М.В. Козлов, А.Ю. Повх, В.О. Швыдкий Модельные системы для оценки воздействия компонентов водной среды на биологические объекты | 209 |

СЕКЦИЯ 1. ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

КОНФОРМАЦИОННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ МОЛЕКУЛЫ ГИЛАМБАТИНА, ОПРЕДЕЛЕННАЯ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ Conformational Flexibility of Molecule Hylambatin Determined by Molecular Modelling Methods

Агаева Г.А., Сафарли Г.Р., Годжаев Н.М.

Бакинский государственный университет, г. Баку, Азербайджан, *gulshen@mail.ru*

Методами молекулярной механики и молекулярной динамики были исследованы особенности пространственной организации молекулы гиламбатина. Гиламбатин состоит из двенадцати аминокислотных остатков в последовательности: Asp-Pro-Pro-Asp-Pro-Asn-Arg-Phe-Tyr-Gly-Met-Met-NH₂. В отличие от всех других тахикининов, гиламбатин имеет остаток Met, заменяющий обычный Leu в положении 2. Тахикининовый пептид гиламбатин был выделен и химически охарактеризован из метанольных экстрактов кожи *Hylambates maculatus*, африканской лягушки-ракофориды. Было показано, что вводимый внутривенно гиламбатин значительно повышает уровень глюкозы и инсулина в плазме крови [1].

В данной работе было проведено исследование конформационной подвижности молекулы гиламбатина методами молекулярной механики и молекулярной динамики. При конформационном расчете пептида учитывали невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионные потенциалы. На основе фрагментарного анализа были определены стабильные пространственные структуры додекапептида гиламбатина, которые могут быть представлены в виде набора конформаций, характеризующихся относительно лабильным N-концевым тетрапептидом и конформационно жестким C-концевым октапептидом. В рассчитанных стабильных конформационных состояниях были уточнены и энергетически оценены эффективные взаимодействия боковых цепей остатков и водородные связи. Показано, что молекула гиламбатина предпочитительно формирует практически изоэнергетичные конформации с различными структурными типами на N-конце пептидной цепи, переходящими в виток альфа-спирали на C-конце [2]. Методом молекулярной динамики была смоделирована картина внутримолекулярной подвижности стабильных конформаций молекулы гиламбатина как в вакууме, так и в окружении молекул воды. На основе рассчитанных значений двугранных углов были построены молекулярные модели энергетически предпочтительных конформационных состояний додекапептида гиламбатина. На рисунке показана оптимизированная структура молекулы гиламбатина в обоих условиях.



a)

b)

Рисунок 1. Оптимизированная структура молекулы гиламбатина в условиях вакуума (а) и явно заданного водного окружения (б). Желтой линией указана вторичная структура.

Молекулярная динамика молекул проводилась в следующей последовательности: 1. Ввод начальных данных; 2. Минимизация энергии; 3. Нагрев до 300К; 4. Равновесные симуляции и 5. Молекулярное моделирование. Данное теоретическое исследование показало степень конформационной подвижности молекулы. Полученные данные позволяют заключить, что молекула гиламбатина содержит устойчивые элементы пространственной структуры, которые могут быть необходимы для связывания с рецепторами тахикининов.

1. Güllner H.G., Harris V., Yajima H., Unger R.H., Hylambatin, a structurally unique tachykinin: effects on insulin and glucagon secretion // *Arch Int Pharmacodyn Ther.*, 1984, vol. 272, no. 2, pp. 304-9.

2. Агаева Г.А., Сафарли Г.Р., Годжаев Н.М. Конформационное поведение молекулы гиламбатина и его фрагмента (5-12) // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 1, с. 20-25.

ЛАЗЕРНОЕ ИМПУЛЬСНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ И РАСТВОРЫ ЭКОПЕРОКСИДА ДЛЯ ОБРАБОТКИ СЕМЯН САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Laser Pulse Radiation and Ecoperoxide Solutions for the Treatment of Sugar Beet Seeds

Апашева Л.М.¹, Будник М.И.¹, Смурова Л.А.¹, Касаикина О.Т.¹, Овчаренко Е.Н.¹, Лобанов А.В.¹,
Савранский В.В.², Турбин В.В.³, Розанцев М.В.³

¹ ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова РАН, г. Москва, РФ

² ФИЦ ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, г. Москва, РФ

³ ООО НПО «Экопероксид водорода»

Сахарная свекла – двухлетняя техническая культура используется для производства этанола, биотоплива сахара, содержит в сухой массе до 70% сахарозы [1]. Ее выращивание, а главное, получение семян требует определенных условий. Востребованы поиск и применение способов оптимизации допосевной обработки семян.

Изучали возможность повышения всхожести семян и стимуляции развития на ранних фазах роста с помощью методов: обработка семян импульсным лазерным излучением [2] и растворами экопероксида [3]. Тест-объектом были сухие семена сахарной свеклы сорт F1 РМС 121 производства фирмы Гавриш.

Эффект обработки семян предлагаемыми методами оценивали по изменению количества проросших семян с определенными морфологическими показателями и методом спектрофотометрии в УФ-области по анализу выхода метаболитов в водную среду культивирования обработанных и контрольных семян. Определение количества выделяемых семенами метаболитов вели на спектрофотометре марки «Specord-UV» в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1-10 мм при комнатной температуре. Метаболиты имеют характерный спектр поглощения в УФ-области спектра с четко выраженным максимумом при λ_{max} 207 нм и поглощением (плечом) до границы с видимой областью λ_{max} 330 нм.

Импульсное облучение семян лазером осуществляли, используя лазер на парах меди. Параметры излучения: одновременная генерация двух длин волн – зеленая 510,5 нм и желтая 578,2 нм. Длительность импульса излучения 15 нс, частота повторения 10 кГц, суммарная энергия в импульсе $3,0 \cdot 10^{-4}$ Дж и $2 \cdot 10^4$ Вт. Соотношение энергии между зеленой и желтой линиями излучения – 3:1. Плотность мощности $2 \cdot 10^4$ Вт/см².

Облучение семян вели в течение 10, 20 и 90 секунд. Контрольные и облученные семена через 1 час после воздействия разделяли на две партии для оценки эффекта обработки. Часть семян раскладывали на увлажненные водой фильтры в чашки Петри и помещали в термостат при температуре + 20°C. Через двое суток и далее вели учет количества проросших семян. Получено, что облучение лазером в течение 10 с увеличило количество проросших семян по сравнению с контролем на 30%, облучение в течение 20 с – на 15-20%. Облучение в течение 90 с блокировало прорастание.

Отметим, что увеличение паузы между облучением и помещением семян на проращивание значительно влияет на эффективность воздействия. Уменьшение стимулирующего влияния показано при паузе 24 часа, пауза в 48 часов приводит к полной блокировке прорастания.

Одним из первых тестов, по которому судили об эффекте действия лазера на семена, может быть фиксация выхода из семян метаболитов (продуктов жизнедеятельности). Эффект фиксируется на ранних стадиях пробуждения семян, сразу после помещения их в сосуды с водой, когда морфологические изменения не наблюдаются. Пробуждение семян идет быстро с начальной скоростью в контроле $\omega_k = 4 \cdot 10^{-3}$ оп.ед./мин, в опыте с облучением 10 с – $\omega_{10} = 8 \cdot 10^{-3}$ оп.ед./мин, наименьшая скорость с облучением 90 с – $\omega_{90} = 2,9 \cdot 10^{-3}$ оп.ед./мин. Стимулирующее действие на прорастание семян отмечено при обработке семян водными растворами экопероксида, содержащими разные концентрации пероксида водорода. Концентрация пероксида в исходном растворе – $5 \cdot 10^{-4}$ М, этот раствор блокировал прорастание семян. Растворы с концентрацией пероксида $5 \cdot 10^{-5}$ М и $5 \cdot 10^{-6}$ М стимулировали прорастание. Наиболее выраженный эффект стимуляции наблюдали при $5 \cdot 10^{-6}$ М, где отмечено превышение контроля на 30-40%.

Спектрофотометрически в УФ-области по количеству выходящих метаболитов определено минимальное время 30 мин контакта семян свеклы с растворами экопероксида для получения эффекта стимуляции прорастания и дальнейшего развития.

Таким образом, показана возможность стимуляции развития на ранних этапах роста сахарной свеклы с помощью допосевной обработки ее семян растворами экопероксида и импульсным лазерным излучением при генерации двух длин волн.

1. Векленко В.И. Тенденции развития и устойчивости производства сахарной свеклы в ведущих странах и регионах РФ // Вестник Курской государственной с/х академии, 2022, № 2, с. 114-122.

2. Апашева Л.М., Смурова Л.А., Овчаренко Е.Н., Савранский В.В., Будник М.И. Способ повышения всхожести семян и стрессоустойчивости сеянцев хвойных. Заявка на изобретение № 014072 от 15.03.2022.

3. Стребков Д.С., Будник М.И., Апашева Л.М., Лобанов А.В. Получение экологически чистых растворов пероксида водорода // Материалы XV международной научной конф. Севастополь, 2020, с. 191-192.

ВОДА, АКТИВИРОВАННАЯ СВЧ-ПЛАЗМОТРОНОМ, КАК РЕГУЛЯТОР РОСТА ХВОЙНЫХ

Water activated by UHF plasmotron as a growth regulator for conifer seedlings

Апашева Л.М.¹, Будник М.И.¹, Лобанов А.В.¹, Лукина Н.А.², Овчаренко Е.Н.¹, Сергейчев К.Ф.²

¹ ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова РАН

² ФИЦ ИОФ им. А.М. Прохорова РАН

Сокращение мировых лесных массивов грозит глобальными экологическими катастрофами. Естественное возобновление лесов затруднено по ряду биотических и абиотических причин, востребованы исследования по искусственному лесовосстановлению. Изучали влияние воды, активированной плазмой (ВАП) [1], получаемой с помощью СВЧ-плазмотрона, генерирующей плазму в открытой атмосфере с получением растворов пероксида водорода и соединений азота, на рост и развитие хвойных на ранних стадиях роста. Тест объектами были: ель *Picea abies* сорт Заповедные дали, лиственница *Larix* сорт Сибирская бригантина. Жизнедеятельность растений в значительной степени определяет фотосинтез, где пероксид водорода является определяющей составляющей фотосинтеза [2]. Другой молекулой, играющей важную роль в развитии растений, является NO_x .

ВАП тестировали по содержанию количества пероксида водорода. Концентрацию пероксида определяли, используя спектрофотометрию в УФ-области. Общую концентрацию оксидов азота NO_x определяли по проводимости ВАП (вклад пероксида в проводимость незначителен) [3]. Исходная концентрация пероксида $8 \cdot 10^{-3}$ М. Концентрация оксидов азота – $3,1 \cdot 10^{-2}$ М. Растворы ВАП разбавляли водой для получения рабочих растворов: $\text{O}_1 - 2 \cdot 10^{-5}$ М, $\text{O}_2 - 2 \cdot 10^{-6}$ М.

Растворы ВАП с концентрацией пероксида выше указанных, блокировали прорастание семян и рост сеянцев, меньшие концентрации не эффективны. Семена проращивали в чашках Петри на фильтрах, увлажненных растворами ВАП в опыте, в контроле – водой. Количество проросших семян в опыте превышал контроль на 30-40 %. Проросшие семена раскладывали в герметически закрывающиеся культуральные сосуды из ПЭТ-пластика на песок, однократно увлажненный в контроле водой, в опытах растворами ВАП. Подращивали сеянцы в стрессовых условиях изоляции от окружающей среды в течение 50-ти суток. Увлажняли только воздушную среду дозированным опрыскиванием раз в сутки. Сосуды помещали в люминостат. Условия культивирования: освещенность 130 люкс, ритм освещения свет: темнота = 12:12 час, обедненный грунт – песок. За ростом сеянцев наблюдали дистанционно, отмечали изменение морфологических признаков: количество сеянцев с раскрытыми семядолями, имеющими свободную хвою, наличие тургора, число жизнеспособных растений. Результаты учета на примере сеянцев ели приведены в таблице.

Таблица 1. Тестирование сеянцев ели

| Вариант | Количество сеянцев, %, сутки | | | |
|--------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 7 сутки, семядоли раскрыты | 15 сутки, свободная хвоя | 30 сутки, жизнеспособные | 50 сутки, жизнеспособные |
| К | 30 | 20 | 5 | - |
| O_1 | 50 | 35 | 40 | - |
| O_2 | 60 | 60 | 45 | 30 |

Таким образом:

1. С помощью СВЧ-плазмотрона получены растворы активированной плазмой воды ВАП - потенциальные регуляторы роста растений.
2. Определены оптимальные для роста хвойных концентрации пероксида водорода в растворах ВАП, а именно $2 \cdot 10^{-5}$ М и $2 \cdot 10^{-6}$ М, а также концентрации пероксида водорода, блокирующие рост.

1. Сергейчев К.Ф., Лукина Н.А., Андреев С.Н., Апашева Л.М., Савранский В.В., Лобанова А.В. Способ плазменной активации воды или водных растворов и устройство для его осуществления. Патент РФ № 2702594, 2019.

2. Комиссаров Г.Г. Фотосинтез: физико-химический подход. М.: Эдиториал УРСС, 2003. 224 с.

3. Сергейчев К.Ф., Лукина Н.А., Апашева Л.М., Овчаренко Е.Н., Лобанов А.В. Вода, активированная струей аргоновой СВЧ плазмы, как фактор, стимулирующий прорастание семян // Химическая физика, 2022, т. 41, № 1, с. 60-65.

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА С ГРИБНЫМИ МЕЛАНИНАМИ Complex Formation of Iron Ions with Fungal Melanins

Багиров Р.М., Боброва Е.Ю., Гафарова Х.О., Багирова О.Ш.

Бакинский государственный университет, г. Баку, Азербайджан, rafiqbagirov@list.ru

В наших ранних работах были исследованы комплексообразования прооксидантных ионов Fe^{2+} с синтетическим L – ДОФА -меланином, с меланинами животного и растительного происхождения [1,2]. Пигменты меланинового ряда играют важную роль и в микробном мире, где их функции связаны, главным образом, с защитой клеток от различных повреждающих факторов внешней среды и, в первую очередь, света. Как и в случае меланинов животного и растительного происхождения, защитное действие пигментов грибного происхождения связано как с пассивным экранированием от света, так и с активным подавлением фотоиндуцированного перекисного окисления липидов. Как было показано нами, в случае меланинов животного и растительного происхождения подавление ими перекисного окисления липидов связано, в первую очередь, со связыванием ионов Fe^{2+} , являющихся катализаторами перекисного окисления липидов. Можно полагать, что этот механизм является существенным и в случае пигментов грибного происхождения.

В представленной работе приводятся и обсуждаются результаты экспериментальных исследований комплексообразования ионов железа с меланинами из чаги бука лесного (*faqus sylvatica*) и из чаги березы (*betula*), которые проявляют высокую антиоксидантную активность.

Меланины выделены методом щелочной экстракции и осаждением в кислой среде. С целью идентификации экстрактов регистрировали их ИК- и ЭПР-спектры. Анализ параметров ИК- и ЭПР-спектров показали, что они хорошо согласуются с имеющимися в литературе аналогичными данными. Это позволяет нам полагать, что выделенные нами пигменты являются меланинами. Комплексные соединения ионов железа с грибными меланинами получали инкубированием свежесырьевых меланинов в растворе $^{57}FeSO_4$ при комнатной температуре. Время инкубирования варьировали от 5 мин. до 2 часов. Связывание ионов железа с данными меланинами исследовали методом гамма-резонансной спектроскопии (ГРС).

Установлено, что полученные осадки(комплексы) имеют сложный ГР-спектр, состоящий, по крайней мере, из четырех парциальных спектров: двух дублетов и двух секстетов с уширенными линиями релаксационной природы. Центральный более интенсивный широкий дублет ($\delta I = 1,31$ мм/с, $\Delta E_Q = 3,08$ мм/с) характерен для высокоспиновых (ВС) комплексов ионов Fe^{2+} . Менее интенсивный центральный узкий дублет ($\delta I = 0,50$ мм/с, $\Delta E_Q = 0,87$ мм/с) характерен для парамагнитных ВС комплексов ионов Fe^{3+} . Параметры секстетных парциальных спектров ($\delta I = 0,65$ мм/с, $\Delta E_Q = 0,23$ мм/с, $B_{ef} = 50,2$ Тл и $\delta I = 0,51$ мм/с, $\Delta E_Q = 0,34$ мм/с, $B_{ef} = 55$ Тл) также характерны для ВС комплексов ионов Fe^{3+} . Сравнительный анализ параметров всех парциальных спектров показывает, что ионы железа в комплексе имеют октаэдрическое лигандное окружение. Другими словами, грибные меланины в отношении к ионам железа выступают как лиганды слабого поля.

Одновременное присутствие магнитной и дублетной парциальных ГР- спектров в образце, по-видимому, связано с неоднородным распределением железосвязывающих центров в полимере меланина. Для двух или более близкорасположенных ионов Fe^{3+} (например, они могут входить в состав полиядерных ($n \geq 2$) кластеров), благодаря быстрой релаксации, обусловленной эффективным спин-спиновым взаимодействием, будут наблюдаться дублетные парциальные ГР-спектры. В случае достаточно разделенных в пространстве ионов Fe^{3+} спин-спиновое взаимодействие сильно ослабится, и для таких структур будут наблюдаться релаксационные ГР-спектры с размытой сверхтонкой структурой. Секстет с эффективным магнитным полем ~ 55 Тл, по – видимому, соответствуют ионам Fe^{3+} связанным с карбоксильными группами. Секстет с меньшим полем (~ 50 Тл) соответствует структурам, где в координации Fe^{3+} , наряду с COO^- группами полимера участвуют также амини- или имино-группы меланина.

Таким образом, из полученных результатов следует, что грибные меланины способны эффективно связывать ионы железа как в его двух-, так и трехвалентном состоянии. Существенно, что грибные меланины подобно меланинам животного и растительного происхождения способны непосредственно связывать прооксидантные ионы Fe^{2+} и окислять их до Fe^{3+} неактивного в прооксидантном отношении с последующим комплексообразованием. Активность обоих этих процессов растет по мере увеличения pH реакционной среды и освещении суспензии видимым светом.

1. Рамазанов М.А., Багиров Р.М., Багирова О.Ш., Турабова Г.А. Изучение методом гамма-резонансной спектроскопии (ГРС) связывания ионов железа с растительными меланинами // Journal of Radiation Researches, 2018, т. 6, № 2, с. 45-50.

2. Багиров Р.М., Боброва Е.Ю., Гафарова Х.О., Турабова Г.А., Багирова О.Ш. Связывание ионов железа с меланинами растительного происхождения // Актуальные вопросы биологической физики и химии, 2019, т. 4, № 2, с. 190-194.

3. Кузнецова О.Ю., Шаехов М.Ф., Зиятдинова Г.К., Будников Г.К. Экстракты и меланины из чаги, полученные после плазменной обработки сырья // Ученые записки Казанского Университета. Серия естественные науки, 2019, т. 161, № 2, с. 211-221.

**МЕХАНИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ МОДЕЛЬНОГО ЭЛЕМЕНТА ХИРАЛЬНОЙ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАШИНЫ****Mechanical Behavior of a Model Element of a Chiral Molecular Machine****Багрова О.Е., Белова Е.В., Твердислов В.А.**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ, *o-bagrova@mail.ru*

Симметрии и их нарушение – свойство вселенной, которое можно обнаружить в различных областях физики. Не важно, является ли живая материя неотделимой от неживой, она вынуждена подчиняться тем же законам физики. Тем не менее живые системы в отличие от неживых характеризуются рядом особенностей, среди которых присутствует хиральность и машинность [1]. Предполагается, что хиральность обеспечивает необходимую симметричность живых объектов, а машины способны преобразовывать форму энергии, нарушая симметрию. В роли молекулярных машин выступают белки, которые конструктивно и функционально хиральны. Элементами этих молекулярных машин являются вторичные структуры полипептидов, которые по своей природе являются несимметричными. Такие несимметричные элементы могут выступать в роли вентильного элемента.

Ранее был проведён предварительный анализ механических свойств модельных конструкций различной хиральности [2]. В качестве модельного объекта была выбрана суперспираль, построенная из двух малых спиралей. Данная модель была описана в рамках теории упругих материалов. Подобное исследование уже проводилось для одного типа гомохиральной системы, который наблюдается в реальных системах [3]. Объектом данного исследования выступали все возможные комбинации хиральных спиралей: гомохиральная система из двух правых малых спиралей, гомохиральная система из двух левых спиралей и гетерохиральная система из одной правой и другой левой спирали. В результате данного рассмотрения была показана механическая эквивалентность обоих знаков хиральности. Ответ гомохиральных систем на внешние возмущения являлся нелинейным. Гетерохиральная система с механической точки зрения не образовывала стабильную суперспираль и не проявляла нелинейного поведения при внешнем возмущении. Подобные системы могут являться вентильным элементом молекулярных машин.

В реальных системах наглядным примером молекулярной машины может служить АТФ-синтаза. Этот комплекс белков обеспечивает синтез АТФ посредством аккумуляции энергии протонов, переносимых через мембрану. Функционирование АТФ-синтазы кратко можно представить следующим образом. Протоны переносятся благодаря вращающемуся барабану из субъединиц c в мембране. Этот барабан увлекает за собой субъединицу γ , которая сопряжена с кольцом из нескольких субъединиц a и b . При вращении γ обеспечивает изменение конформации a и b , что приводит к синтезу АТФ из АДФ. Направленное действие такой машины обеспечивается её конструкцией. При этом известно, что роторная часть АТФ-синтазы может вращаться в обе стороны с переключением с синтеза на гидролиз АТФ и обратно [4]. Также высказываются предположения, что γ субъединица АТФ-синтазы может накапливать энергию упругой деформации при вращении барабана c_n . Изучению данного явления и посвящена настоящая работа.

Багрова О.Е. является стипендиатом Фонда развития теоретической физики и математики «БАЗИС» (№ 21-2-1-14-1).

1. Твердислов В.А., Малышко Е.В., Ильченко С.А. От автоволновых механизмов самоорганизации к молекулярным машинам // Известия РАН. Серия физическая, 2015, т. 79, № 3, с. 1728-1732, doi: 10.7868/S0367676515120236.

2. Багрова О.Е., Малышко Е.В., Твердислов В.А. Об особенностях хиральных вторичных структур, определяющих функции белков // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2019: материалы XIV международной научной конференции, г. Москва, 21-24 ноября 2019 г., с. 38-39.

3. Neukirch S., Goriely A., Hausrath A.C. Chirality of coiled coils: elasticity matters // Phys Rev Lett, 2008, vol. 100, no. 3, doi: 10.1103/PhysRevLett.100.038105.

4. Романовский Ю.М., Тихонов А.Н. Молекулярные преобразователи энергии живой клетки. Протонная АТФ-синтаза – вращающийся молекулярный мотор // УФН, 2010, № 180, с. 931-956, doi: 10.3367/UFNr.0180.201009b.0931.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННО АКТИВНОГО ХРОМАТИНА В ЯДРАХ ЭУКАРИОТ, ПОДВЕРГНУТЫХ МЕХАНИЧЕСКОЙ ДЕФОРМАЦИИ, ПОСРЕДСТВАМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

AFM Imaging of the Transcriptionally Active Chromatin in Eukaryotic Nuclei Undergone Mechanical Stress

Байрамуков В.Ю., Филатов М.В., Ковалев Р.А., Пантина Р.А., Григорьев С.В., Варфоломеева Е.Ю.

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», г. Гатчина, РФ, bairamukov_vy@pnpi.nrcki.ru

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) исследован рельеф поверхности ядер HeLa после их механической деформации. Ядра выделяли из клеток линии HeLa, деформировали под действием центробежного ускорения при $60g$ и фиксировали глутаральдегидом. Показано, что наблюдаемый рельеф поверхности обусловлен, главным образом, высокой устойчивостью хроматина к деформации. Природа этой устойчивости коррелирует с суперспирализацией ДНК. Действие ингибитора топоизомераз I и II, а также ингибитора транскрипции актиномицина Д, приводило к снятию суперскрученности и значительному уплощению ядра, тогда как действие ДНК-интеркалятора, наоборот, приводило к увеличению суперскрученности и, как следствие, устойчивости хроматина к механическому воздействию. Таким образом, нами предложен новый подход визуализации внутриядерной структуры, при котором наблюдаемые нами изменения морфологии отражают функциональные особенности клеточного ядра.

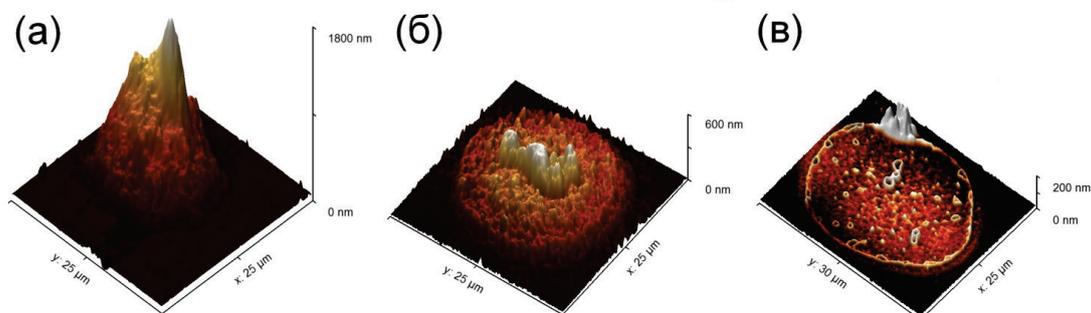


Рисунок 1. АСМ-визуализация рельефа поверхности ядер HeLa: (а) – фиксированных в суспензии и помещенных на подложку; (б) – подвергнутых механической деформации; (в) – клетки HeLa предварительно инкубировали с ингибитором транскрипции актиномицином Д в концентрации 0,1 мкг/мл в течение суток, ядра лизировали и подвергали механической деформации

Работа поддержана грантом РФФ 20-12-00188.

1. Байрамуков В.Ю., Филатов М.В., Ковалев Р.А., Пантина Р.А., Григорьев С.В., Варфоломеева Е.Ю. Структурные особенности механически деформированных ядер HeLa, наблюдаемые методом атомно-силовой микроскопии // Поверхность рентгеновские синхротронные и нейтронные исследования, 2022 (в печати).

2. Baïramukov V.Yu., Filatov M.V., Kovalev R.A., Fedorova N.D., Pantina R.A., Iashina E.G., Ankudinov A.V., Grigoriev S.V., Varfolomeeva E.Yu. AFM imaging of the transcriptionally active chromatin in eukaryotic nuclei undergone mechanical stress // Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 2022 (In Press).

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ФЕРРИТА КОБАЛЬТА В ГИДРОФИЛЬНОЙ ОБОЛОЧКЕ НА ПРОВОДИМОСТЬ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Effect of Cobalt Ferrite Magnetic Nanoparticles in Hydrophilic Coating on the Conductivity of Bilayer Lipid Membranes

Борисова Е.Д., Кожемова Б.Э., Константинов О.О., Корепанова Е.А., Михеев В.М., Михнич А.В., Сухова В.И., Астанина П.Н., Коплак О.В. Аносов А.А.

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), г. Москва, РФ, anosov_a_a@staff.sechenov.ru

Магнитные наночастицы (МНЧ) широко используются в медицинских приложениях. Однако, при использовании МНЧ *in vivo* им требуется специальное покрытие, способствующее биосовместимости и минимизирующее потенциальную токсичность МНЧ в физиологических условиях [1].

В данной работе изучено взаимодействие (МНЧ) феррита кобальта с дифитаноилфосфатидилхолиновыми (dphpc) бислойными липидными мембранами (БЛМ). Мы использовали наночастицы в гидрофильной оболочке

(в человеческом сывороточном альбумине (ЧСА) и полиэтиленгликоле (ПЭГ)), которые добавляли в окружающий мембрану раствор. В исследованиях использовали коллоидный раствор кубических магнитных наночастиц феррита кобальта CoFe_2O_4 . Диагонали образцов наночастиц составляли 12 и 27 нм. Сформированные плоские БЛМ находились в растворе 0.1 М KCl .

В ходе эксперимента были посажены и исследованы 28 мембран: к десяти мембранам добавляли МНЧ-12 с ЧСА, еще к десяти – МНЧ-27 с ЧСА, и к восьми мембранам – МНЧ-27 с ПЭГ. Среднее время жизни мембран после полного почернения составляло 82 ± 42 мин (после знака \pm указано стандартное отклонение).

На мембраны подавали постоянное напряжение 25 мВ и регистрировали флуктуации мембранного тока. Полученные в работе зависимости проводимости от объема добавленных МНЧ говорят о том, что при добавлении МНЧ проводимость мембран увеличивается, но при этом, из-за большого разброса данных, нельзя достоверно определить характер этой зависимости. Значимых различий между проводимостями при добавлении одинакового объема наночастиц, окруженных ЧСА, не было обнаружено. При добавлении МНЧ с оболочкой из ПЭГ проводимость меняется значительно слабее, чем при добавлении МНЧ с оболочкой из ЧСА.

На рисунке представлены треки проводимости, полученные на одной мембране. После добавки МНЧ зарегистрирован скачок проводимости, после которого следуют ступенчатые флуктуации тока, вызванные возникновением проводящих пор.

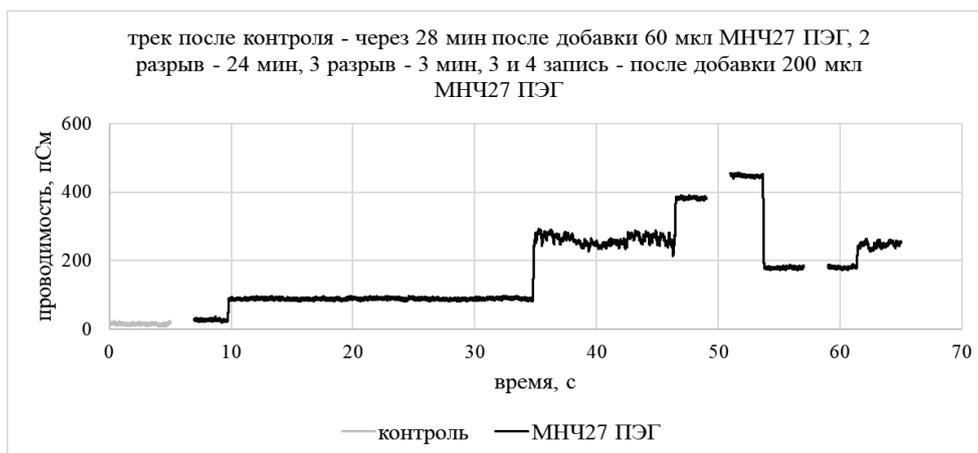


Рисунок 1. Треки проводимости БЛМ из $dPhrc$ при добавке МНЧ-27 с ПЭГ. Мембранный потенциал 25 мВ, окружающий мембрану раствор 0.1 М KCl

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что МНЧ-12 и МНЧ-27 с гидрофильным покрытием взаимодействуют с $dPhrc$ мембранами, что может приводить к появлению метастабильных проводящих пор, которые, в свою очередь, увеличивают интегральную проводимость мембран.

1. Аносов А.А., Корепанова Е.А., Коплак О.В., Казаманов В.А., Дерунец А.С., Моргунов Р.Б. Рост электрической проводимости и появление липидных пор под действием магнитных наночастиц CoFe_2O_4 в бислоистой липидной мембране // *Электрохимия*, 2022, т. 58, с. 179-187.

ДОЛГОВЕЧНЫЙ МИКРОБНЫЙ БИОТОПЛИВНЫЙ ЭЛЕМЕНТ НА ОСНОВЕ *GLUCONOBACTER OXYDANS*

Long-Lived Microbial Biofuel Cell Based on *Gluconobacter Oxydans*

Вишневская М.В., Готовцев П.М.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва, РФ, Vishnevskaya_MV@rrcki.ru

В настоящее время технология биотопливных элементов (БТЭ) является одной из активно исследуемых в теме изучения альтернативных источников энергии. Микробные биотопливные элементы (МБТЭ), являющиеся видом БТЭ, используют в качестве биокатализаторов бактерии, которые способны окислять органические субстраты. Таким образом, МБТЭ возможно использовать не только для получения электроэнергии, но и очистки сточных вод [1].

В данной работе исследовалась продуктивность работы МБТЭ на основе электрогенных бактерий *Gluconobacter Oxydans* ВКМ В-1280. Ячейка была безмембранной, а нанесение биокатализатора безмедиаторным, что значительно удешевляет конструкцию данного БТЭ. Анодное и катодное отделение соединялись соевым мостиком. В качестве электродов применялась графитированная ткань ТГН-2МК. На аноде была нанесена рабочая смесь с высокопроводящими полимерами *Gluconobacter Oxydans*:PEGDE:PEDOT PSS в

соотношении 4:1:1. Анолитом выступала среда, имитирующая сточные воды (ИСВ) [2], католит варьировался (К-фосфатный буфер, питательная среда ВВМ для выращивания микроводоросли *Chlorella Vulgaris*, *Chlorella Vulgaris* с дополнительным освещением, *Chlorella Vulgaris* без какого-либо освещения).

Для исследования работоспособности собранного МБТЭ снимались вольт-амперные характеристики (ВАХ) на потенциостате Autolab PGSTAT204 (Mertohm) (ПО NOVA 2.0) еженедельно. Таким образом БТЭ проработал 100 дней. Данные по максимальной удельной мощности в зависимости от времени жизни анода приведены на рисунке 1.

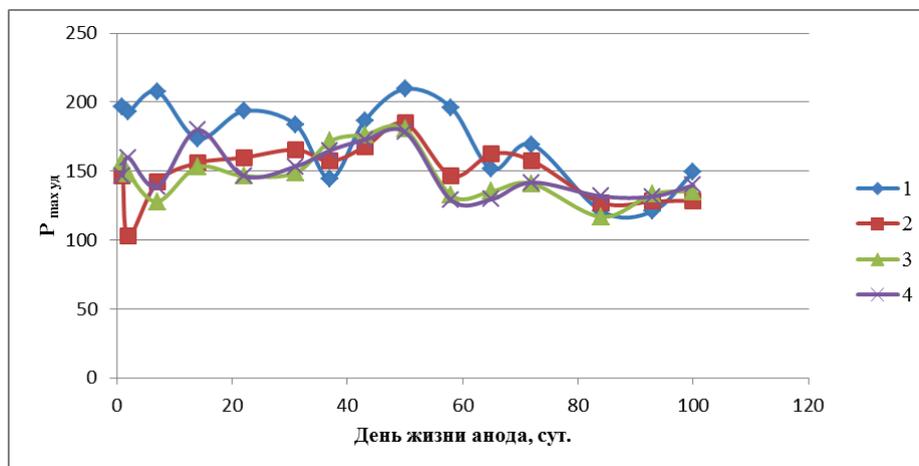


Рисунок 1. Диаграмма зависимости максимальной удельной мощности от времени жизни анода. Католиты: 1 – К-фосфатный буфер; 2 – питательная среда ВВМ для выращивания *Chlorella Vulgaris*; 3 – *Chlorella Vulgaris* с дополнительным освещением; 4 – *Chlorella Vulgaris* без какого-либо освещения

Из полученных данных можно сделать вывод, что данные варианты БТЭ перспективны для очистки сточных вод и способны работать стабильно долгое время. Так же возможно объединить данный МБТЭ с фотобиореактором.

1. Gude V.G.J. Wastewater treatment in microbial fuel cells – an overview // J. of Clean. Prod., 2016, vol. 122, pp. 287-307.
2. Salgueiro J., Pe´rez L., Maceiras R., Sa´nchez A., Cancela A. Semicontinuous culture of *Chlorella vulgaris* microalgae for wastewater treatment // International Journal of Environmental Research, 2018, vol. 12, pp. 765-772.

ЛОКАЛЬНЫЙ ЭНДЕМИЗМ *ARTEMIA SALINA* В ГИПЕРСОЛЕНОМ ОЗЕРЕ САСЫК-СИВАШ

Local Endemism of *Artemia Salina* in the Hypersalt Lake Sasyk-Sivash

Гаджи А.В.¹, Шадрин Н.В.², Ануфриева Е.В.², Мегер Я.В.¹, Лантушенко А.О.¹

¹ Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, Россия, nashira98@mail.ru

² Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь, Россия

Представители рода *Artemia* находят широкое применение в медицине, фармацевтической промышленности как источник аминокислот и витаминов группы В, в различных формах используются в качестве корма для различных животных, рыб, а также в качестве удобрений для растений. Содержание и тип полезных веществ, синтезируемых представителями рода *Artemia*, является видоспецифичным признаком. Ранее генетический скрининг рода *Artemia* в гиперсоленом озере Сасык-Сиваш не проводился. В данной работе описаны образцы, собранные летом 2021.

В эксперименте были использованы 7 двуполовых особей (4 мужские и 3 женских). Выделение ДНК осуществлялось с помощью набора ДНК-ЭКСТРАН-2 (Синтол, Россия) с предварительной гомогенизацией ткани. Проверка качества полученного продукта проводилась спектрофотометрически с использованием нанофотометра Implen и методом электрофореза в агарозном 1,5% геле. Для амплификации митохондриального маркерного гена *COI* были использованы праймеры jgLCOI490 и jgHCO2198 [1]. ПЦР проводилась в объеме 25 мкл с использованием готовой реакционной смеси ScreenMix (Евроген, Россия). Секвенирование проводилось в центре коллективного пользования «Молекулярная структура вещества» и использованием генетического анализатора Нанофор-05 (Синтол, Россия). Для анализа фитогеографии были использованы данные о популяциях *A. salina* из других регионов [2, 3]. Филогенетический анализ проводился байесовскими методами, реализованных в MrBayes v. 3.2.6 [4]. Анализ включал 2 независимых симуляций по 10 миллионов итераций, с

построением дерева каждые 10.000 генераций. Консенсусное дерево было построено на основе наилучшей топологии, параметры рассчитывались после удаления первых 20% деревьев. В качестве внешней группы была использована последовательность *Daphnia Tenebrosa* (GenBank accession number HQ972028). Отношения между гаплотипами были построены методом TCS в программе PopART [5]. Основные популяционно-генетические параметры были вычислены с помощью DnaSP 6.0 [6].

Анализ включал в себя 21 географически разделённых популяций *Artemia salina*, общее число образцов в анализе составило 115 с длиной последовательности 528 п.н. Делеции, инсерции, а также стоп-кодны не включались в анализ. В пределах данной последовательности было отмечено 197 переменных сайтов, из которых было 117 информативных. Было обнаружено 72 гаплотипа. Популяция из озера Сасык-Сиваш образовала 4 отдельных гаплотипа, что свидетельствует о локальном эндемизме. Результаты филогенетического анализа были сравнены с работами по Средиземноморскому региону [2, 3]. Наиболее генетически близкой популяцией оказалась популяция из Кипра (Lagasa salt lake), который географически также близок к озеру Сасык-Сиваш.

Популяция *Artemia salina* из озера Сасык-Сиваш показывает достаточно высокий уровень генетической изменчивости в рамках, что свидетельствует об интенсивном эволюционном процессе данного вида в регионе. Как и в случае других популяций *Artemia salina*, у крымской группы ярко выражен локальный эндемизм с выраженной филогеографической структурой. Интересно отметить, что для других видов рода *Artemia* подобной структуры не наблюдается.

Работа выполнена при поддержке программы «Приоритет-2030» Севастопольского Государственного Университета (стратегический проект № 3, №121121700318-1)

1. Geller, J., Meyer, C., Parker, M., & Hawk, H. (2013). Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys // *Molecular ecology resources*, vol. 13, no. 5, pp. 851-861.

2. Eimanifar, Amin et al. *Artemia* biodiversity in Asia with the focus on the phylogeography of the introduced American species *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 // *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2014, vol. 79, pp. 392-403.

3. Munoz, Joaquin et al. Phylogeography and local endemism of the native Mediterranean brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca) // *Molecular Ecology*, 2008, vol. 17, no. 13, pp. 3160-3177.

4. Ronquist, Fredrik et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space // *Systematic biology*, 2012, vol. 61, no. 3, pp. 539-542.

5. Leigh, Jessica W., David Bryant. POPART: full-feature software for haplotype network construction // *Methods in Ecology and Evolution*, 2015, vol. 6, no. 9, pp. 1110-1116.

6. Rozas, Julio et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets // *Molecular biology and evolution*, 2017, vol. 34, no.12, pp. 3299-3302.

СТРУКТУРЫ ВОДЫ В ТКАНЯХ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ: ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ L-ДИЭЛЬКОМЕТРИИ

Determining Water Structures in Tissues of Plant Leaves by L-Dielkometry Metod

Галль Л.Н.¹, Бердников А.С.¹, Галль И.Р.¹, Кулешова Т.Э.^{2,3}, Галль Н.Р.³

¹ Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург, РФ

² Агрофизический научно-исследовательский институт, г. Санкт-Петербург, РФ

³ Физико-технический институт им. А.Ф.Иоффе РАН, г. Санкт-Петербург, РФ

В работе рассмотрены физико-химические свойства водной компоненты цитоплазмы живой клетки и межклеточной жидкости, связанные с их структурной организацией. Структура водной компоненты растения, как единой целостной системы, играет важнейшую роль в его водном режиме, и в силу этого определяет развитие и приспособляемость растения к условиям внешней среды, однако возможности ее экспериментального измерения очень ограничены. В данной работе для экспериментальных исследований водного режима растений впервые применена низкочастотная L-диэлькометрия, позволяющая проводить измерения в частотном режиме, характерном для структурных процессов в водных и водно-молекулярных системах живых растений без их разрушения [1]. По изменению интенсивностей пиков в спектре зависимости тангенса диэлектрических потерь от частоты ЭМП в условиях искусственной засухи различных фитотест-объектов было показано присутствие в живых растениях водных структур двух типов: воды свободной и воды связанной. «Свободная» вода, наполненная ионами, малыми молекулами и биополимерами, ответственна за режим испарения, а «связанная», организованная в упорядоченные стержневые структуры из двух смежных спиралей 30/11, существование которых показано Н.А.Бульеноковым методом модульного дизайна [2], участвует в процессе организации сложной сети межмолекулярных и межклеточных коммуникаций растения, включая передачу сигналов через предполагаемые синапсоподобные контакты.

Полученные результаты полностью коррелируют с результатами фитомониторинга растений, ведущегося в Казанской научной школе физиологов методом импульсного ЯМР [3] и трактуемых авторами как одновременное присутствие в живом растении структур воды двух типов. Использование теоретических представлений Бульenkова позволяет обосновать существование водных коммуникаций между биополимерами в клетке и между клетками, создающих, благодаря этому, единую целостную молекулярно-водную систему живого растения.

1. Галль Л.Н., Бердников А.С., Галль И.Р., Максимов С.И., Галль Н.Р. Диэлектрические измерения структурных изменений в разбавленных водных растворах соединений натрия // Научное приборостроение, 2020, т. 30, № 2, с. 3-9.

2. Желиговская Е.А., Бульenkов Н.А. Стержневые структуры связанной воды: их возможная роль в самоорганизации биологических систем и недиссипативной передаче энергии // Биофизика, 2017, т. 62, № 5, с. 837-845.

3. Хохлова Л.П., Бочкарева М.А. Водный обмен растений: итоги ЯМР исследований // Ученые записки Казанского государственного университета 2009, т. 151, № 4, с. 73-103.

БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ОТМЫВАНИЯ КЛЕТОК *CHARA FRAGILIS* ОТ РАСТВОРОВ ФИТОКОМПОЗИЦИИ ОДУВАНЧИК-ЗВЕРОБОЙ-КАЛЕНДУЛЫ Bioelectric Effects of Washing of the *Chara fragilis* Cells from Solutions of Phytocomposition of Dandelion-Hypericum-Calendula

Гасанова А.Е., Мусаев Н.А.

Институт ботаники НАНА, Бакинский государственный университет, г. Баку, Азербайджан,
ahasanova89@gmail.com

С помощью микроэлектродной техники изучены закономерности изменения потенциала (φ_m) и сопротивления (R_m) плазматической мембраны (ПМ) клеток *Chara fragilis* в присутствии растворов фитокомпозиции Одуванчик – Зверобой – Календулы (ОЗК). Все три отмеченных растения обладают радиопротекторным свойством. Целью настоящей работы было выявление возможных механизмов радиопротекторной способности названных растений. Клетки *Chara fragilis* в практику электрофизиологических исследований внедрены впервые нами. Растения собраны из пруда «Катиб Булагы», образующихся из сточных вод нескольких горных родников в Товузском районе Азербайджанской Республики. *Chara fragilis* принадлежит к семейству *Characeae* Ag. *Emand Hollerb* из класса *Charophyceae*. Одновременное и непрерывное измерение параметров φ_m и R_m проводилось с применением метода Хогга. Анализ распределения потенциала, сопротивления плазматической мембраны по числу клеток *Chara fragilis* в стандартных условиях среды представлены нами в предыдущих работах [1-3]. Сухой порошок экстракта ОЗК получали в лабораторных условиях из корней одуванчика, зверобоя и лепестков календулы. Экстракт был изготовлен из трав фармацевтической компании «Herba-Floga», Азербайджан. Композиционная смесь экстрагировалась из смеси растворов порошков этих растений в равной пропорции 70%-ным этанолом. Рабочие растворы экстракта для электрофизиологических экспериментов готовили на искусственной прудовой воде (ИПВ) с известным ионным составом. Статистическая обработка результатов экспериментов проводилась по законам вариационной статистики [1, 2] с использованием компьютерной программы SigmaPlot12.0.

Первичной мишенью любого экзогенного фактора при воздействии на клетки растений является их плазматическая мембрана. Поэтому в представленной работе мы пытались установить механизмы модификации структурно-функциональной организации компонентов системы первичного активного транспорта ПМ при действии рабочих растворов композиции ОЗК. Компонентами системы первичного активного транспорта ПМ, являются H^+ -помпа с высокой электрогенной активностью и два типа K^+ -каналов: K^+ -каналов внутреннего выпрямления (ККВВ), K^+ -каналов наружного выпрямления (ККНВ).

Стационарные значения φ_m и R_m разбросаны в довольно широких пределах: $-90 \div -300$ мВ и $1 \div 32,6$ Ом · м² соответственно. Среднее значение φ_m составило $-183 \pm 4,9$ мВ, $R_m = 9,2 \pm 1,2$ Ом · м². Наиболее эффективными концентрациями фитокомпозиции ОЗК в среде оказались 10^{-1} и -1 мг / мл.

На предыдущем этапе наших исследований на клетках *Chara fragilis* обнаружили двухэтапную стимуляцию транспортных процессов через плазматическую мембрану в присутствии композиции «Одуванчик-Лопух». Начальный этап стимуляции происходил в присутствии композита. Второй этап стимуляции происходил при отмывании опытной клетки от растворов композиции «Одуванчик-Лопух» [1]. Что касается действия фитокомпозиции ОЗК, пока клетка находилась в среде с концентрацией композита 10^{-1} или 1 мг / мл в течение 25 мин изменения φ_m и R_m нами не выявлены. Стимуляция или подавление транспортных процессов под влиянием композитов происходили только при исключении ОЗК из состава питательной среды. Причем в диапазоне активации ККНВ обнаружили стимуляции (абсолютное значение φ_m возросло на 20 мВ), а в диапазоне активации ККВВ подавление (абсолютное значение φ_m уменьшился на 16-18 мВ) транспортных

процессов. Характер изменения R_m при этом определялся концентрацией протектора и кинетикой изменения φ_m клеток. При анализе кинетики биоэлектрических реакций можно наблюдать, что изменения φ_m и R_m при действии фитопротекторов очень часто происходят синхронно. С другой стороны, биохимический состав используемых нами композитов довольно гетерогенный, что осложняет идентификацию их воздействия на ПМ. Для идентификации кинетических зависимостей φ_m и R_m , необходимо их сопоставить с основными кинетическими характеристиками K^+ -каналов, электрогенной H^+ -помпы.

1. Hasanova A.E. The influence of photocomposition Dandellon-Burdock on electrophysiological characteristics of *Chara fragilis* cells // Актуальные вопросы Биологической физики и химии, 2020, т. 5, № 1, с. 29-34.

2. Hasanova A.E., Musayev N.A. Bioelectric characteristics of *Chara fragilis* (*Characeae*) cells // Ukrainian Botanical Journal, M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine, 2020, vol. 77, no. 5, pp. 398-404.

3. Hasanova A., Najafaliyeva Sh., Aliyeva P. and Musayev N. *Chara fragilis* cells – a new object for electrophysiology research // Journ. of Baku Engineering University - Chemistry and Biology, 2017, vol. 1, no. 2, pp. 176-182.

ПЕРЕДАЧА ИНФОРМАЦИИ И ТРАНСЛЯЦИЯ СИММЕТРИИ В РЕАКЦИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО РАСПОЗНАВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ **Information Transfer and Symmetry Translation in the Reaction of Molecular Recognition of Biological Macromolecules**

Горовой Ю.М., Наумов Д.В.

Ярославский государственный технический университет, г. Ярославль, РФ, gorovoyj@mail.ru

В реакциях молекулярного распознавания характерных для супрамолекулярных систем, к которым относятся и биологические макромолекулы со своим водным окружением, происходит процесс рецепции информации: передача информации от лиганда к рецептору. Химическая термодинамика супрамолекулярных систем не описывает процесс рецепции информации, ограничиваясь такими параметрами, как селективная способность и свободная энергия комплексообразования. В настоящей работе поставлена задача: описать реакцию молекулярного распознавания как процесс передачи информации. Поскольку в ходе реакции молекулярного распознавания меняется структура рецептора (следовательно, меняется и его симметрия!), то помимо передачи информации в этой реакции осуществляется и трансляция симметрии.

Для решения поставленной задачи использовался аппарат статистической термодинамики сложных систем. И лиганд и рецептор рассматривались как сложные системы, состоящие из нескольких взаимодействующих между собой подсистем. Помимо обычных термодинамических параметров сложные системы характеризуются специфической термодинамической координатой – количеством взаимной информации [1]. Количество взаимной информации равно разности энтропии сложной системы и суммарной энтропии невзаимодействующих между собой подсистем. Поскольку в результате взаимодействия подсистем сложная система становится относительно упорядоченной (происходит образование структуры) количество взаимной информации отрицательно. Сложные системы, как и супрамолекулярные системы, могут иметь несколько метастабильных состояний, которые характеризуются различными конфигурациями пространственной структуры таких систем. Переход из одной конфигурации в другую сопровождается изменением количества взаимной информации. Получены уравнения, описывающие изменение количества взаимной информации при изменении пространственной конфигурации, в частности, в ходе реакции молекулярного распознавания.

В представленной работе доказана теорема Нётер для сложной, в том числе и супрамолекулярной, системы. Доказано, что количество взаимной информации является инвариантом для канонических преобразований сложной системы (преобразований, которые не меняют форму уравнений Гамильтона). Для равновесных и метастабильных состояний форма уравнений Гамильтона не меняется так как энергия взаимодействия подсистем постоянна. Поэтому изменение структуры и симметрии супрамолекулярной системы: переход из одной пространственной конфигурации в другую (переход из одного метастабильного состояния в другое) можно количественно охарактеризовать как изменение количества взаимной информации. Таким образом, количество взаимной информации служит мерой изменения (трансляции) симметрии, которая осуществляется в ходе реакции молекулярного распознавания.

Физический смысл количества взаимной информации проясняют работы Блюменфельда [2] и Чернавского [3]. Блюменфельд доказал неприменимость комбинаторного подхода к описанию количества информации, содержащегося в биологических системах, поскольку биологические системы содержат «конструкции». «С позиций статистической физики наличие конструкций означает наличие границ между областями фазового пространства, пересечение которых запрещено для фигуративных точек статистической системы». Отметим, что количество взаимной информации определяет глубину деформации фазового пространства, которая явилась результатом взаимодействия подсистем, составляющих сложную систему.

Количество взаимной информации, рассчитанное как разность энтропии нативной ДНК спермы лосося (со своим водным окружением) и энтропии «расплетенных» молекул ДНК спермы лосося с соответствующим

количеством воды, составляет 3,5% от энтропии наивной ДНК. Что не противоречит биофизическим представлениям о количестве информации, содержащейся в биологических системах. Расчеты выполнены на основе экспериментальных данных о теплоемкости ДНК в широком диапазоне температур [4].

Количество взаимной информации является микроинформацией по классификации Д.С. Чернавского, поскольку характеризует незапоминаемые состояния сложной (супрамолекулярной) системы. Применительно к реакции молекулярного распознавания количество взаимной информации характеризует степень деформации структуры и трансляции симметрии при взаимодействии лиганда с рецептором.

1. Горовой Ю.М. Статистическая термодинамика сложных систем // Научные труды VI международного конгресса, 2012, 10 с.

2. Блюмефельд Л.А. Информация, термодинамика и конструкция биологических систем // Соросовский образовательный журнал, 1996, № 7, с. 68-72.

3. Чернавский Д.С. Синергетика и информация. М.: УРСС, 2004, 287 с.

4. Андроникашвили Э.Л., Мревлишвили Г.М. Низкотемпературная теплоемкость ДНК // УФН, 1986, т. 150, с. 625-628.

ТЕТРАНITРОЗИЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ЖЕЛЕЗА С ТИОСУЛЬФАТНЫМИ ЛИГАНДАМИ ПРЕДОТВРАЩАЕТ ДИСФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА Tetranitrosyl Iron Complex with Thiosulphate Ligands Prevents Mitochondrial Dysfunction under Stress

Жигачева И.В.¹, Крикунова Н.И.¹, Генерозова И.П.², Буцанец П.А.², Васильева С.В.¹

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва, РФ, zhigacheva@mail.ru

² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, РФ, igenerozova@mail.ru

Использование регуляторов роста и развития растений (РРР) является одним из наиболее эффективных путей повышения урожайности сельскохозяйственных культур и повышения их устойчивости к стрессовым воздействиям и патогенам. В связи с этим актуальной задачей является поиск новых биологически активных веществ, повышающих устойчивость растений к действию стрессовых факторов. В наших исследованиях мы обратили внимание на доноры оксида азота. Такой выбор объекта исследования связан с тем, что оксид азота представляет собой сигнальную молекулу, участвующую в самых разнообразных физиологических процессах в растениях, включая прорастание, развитие, цветение и старение [1]. При этом различными исследованиями показано наличие положительной корреляции между увеличением содержания NO в различных органах и тканях растений при стрессовых воздействиях и адаптацией растений к изменяющимся условиям внешней среды [2]. Способность NO стимулировать адаптивные реакции, в условиях абиотического стресса, может быть связана с тем, что он может связывать свободные ионы железа в составе нитрозильных комплексов, что, возможно, будет приводить ингибированию реакций свободно-радикального окисления, катализируемые редокс-активными ионами железа [3]. Таким образом, NO может действовать как антиоксидант, хотя возможен и синергизм в действии NO и H₂O₂ [4].

Как показано в ряде работ, обработка растений экзогенными донорами NO регулирует устойчивость к абиотическому стрессу [5]. В нашей работе в качестве донора оксида азота мы использовали натрий μ -дителиосульфато-тетранитрозилдиферрат тетрагидрат (комплекс железа с тиосульфатом)-[Na₂ [Fe₂ (S₂O₃)₂ (NO)₄]₂ × 4H₂O (кристаллический ТНКЖ-тио) [6].

Поскольку энергетический обмен играет важную роль в адаптивных процессах и митохондриях растений являются источниками и мишенью для оксида азота. Целью нашего исследования было изучение влияния стресса (дефицит воды и тепловой шок) на функциональное состояние митохондрий 5-дневных этиолированных проростков гороха.

Стрессовые воздействия вызывали активацию ПОЛ в мембранах митохондрий. Активация ПОЛ была сопряжена с существенными изменениями в содержании C₁₈ жирных кислот (ЖК), играющих важную роль в устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов внешней среды: индекс ненасыщенности C₁₈ ЖК в мембранах митохондрий снижался с 1,33±0,02 до 1,17±0,01. Понижение содержания линолевой и линоленовой кислот – одних из основных ЖК, входящих у высших растений в состав кардиолипина, по-видимому, вызывало снижение скоростей транспорта электронов при окислении НАД-зависимых субстратов митохондриями проростков с 85,5±3,1 до 46,0±2,4 нг.атом O₂/мг белка × мин. ТНКЖ-тио предотвращал изменения ЖК состава мембран митохондрий и обусловленные стрессом изменения биоэнергетических характеристик митохондрий. Полученные данные могут свидетельствовать, что протекторные свойства препарата реализуются на мембранном уровне за счет сохранения/увеличения пула ненасыщенных ЖК, способствующих поддержанию текучести мембран.

1. Мамаева А.А., Фоменков А.В., Носов И.Е., Машков Л.А. Мур Ж., Холл М.А., Новикова Г.В. Регуляторная роль оксида азота в растениях // Физиол. Растений, 2015, т. 62, № 4, с. 459-474, doi: 10.7868/S0015330315040132.

2. Nabi R.B.S., Tayade R., Hussain A., Kulkarni K.P., Imran Q.M., Bong-Gyu Mun. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress // *Environmental and Experimental Botany*, 2019, vol. 161, pp. 120-133, doi: 10.1016/j.envexpbot.2019.02.003.

3. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами: физико-химия, биология, медицина. Москва-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2015, 220 с.

4. Hasanuzzaman M.K., Nahar K., Alam Md.M., Masayuki Fujita. Exogenous nitric oxide alleviates high temperature induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by modulating the antioxidant defense and glyoxalase // *Australian J. Crop Science*, 2012, vol. 6, no. 8, pp. 1314-1323.

5. Ahmad P., Ahanger M.A., Alyemeni M.N., Wijaya L., Alam P. Exogenous application of nitric oxide modulates osmolyte metabolism, antioxidants, enzymes of ascorbate-glutathione cycle and promotes growth under cadmium stress in tomato // *Protoplasma*, 2018, vol. 255, p. 79-93, doi: 10.1007/s00709-017-1132-x.

6. Санина Н.А., Алдошин С.М. Структура и свойства нитрозильных комплексов железа с функциональными серосодержащими лигандами // *Изв. РАН, Сер., Хим.*, 2011, № 7, с. 1199-1205.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ РАСТВОРОВ И КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ЛИЗОЦИМА В H_2O И D_2O

Features of the structure of solutions and crystallization of lysozyme in H_2O and D_2O

Ильина К.Б.¹, Бойкова А.С.¹, Марченкова М.А.^{1,2}, Конарев П.В.^{1,2}, Писаревский Ю.В.^{1,2}

¹ Кристаллография и фотоника РАН, г. Москва, РФ

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва, РФ, ilina-ks@mail.ru

Кристаллизация белков является одним из важнейших и наиболее сложных этапов на пути определения структуры белковых молекул посредством рентгеноструктурного анализа. Результат кристаллизации зависит одновременно от большого числа параметров: температуры, состав и концентрации компонентов, pH и т.д. [1], что затрудняет поиск оптимальных условий роста кристаллов. Выявление закономерностей самоорганизации белковых молекул в растворе позволит не только лучше понять механизмы кристаллизации белков, но и существенно сократить время поиска условий роста кристаллов.

Ранее в работах [2,3] методами малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (МУРР) изучалось влияние концентрации белка, типа осадителя и растворителя на структуру растворов лизоцима при кристаллизации. Было показано образование димеров и октамеров в кристаллизационных растворах лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии. В данной работе показаны результаты исследования структуры растворов лизоцима при кристаллизации и рост кристаллов лизоцима в протонированной (H_2O) и дейтерированной воде (D_2O) при изменении концентрации и температуры. Условия кристаллизации соответствовали условиям роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии.

Для определения особенностей структуры растворов лизоцима в H_2O и D_2O при изменении температуры проводились исследования кристаллизационных растворов методом МУРР. Во всем диапазоне температур в кристаллизационных растворах лизоцима в H_2O и D_2O были обнаружены, помимо мономеров, димеры и октамеры. На рис.1. показана зависимость объемных долей димеров и октамеров в кристаллизационных растворах лизоцима в H_2O и D_2O при изменении температуры.

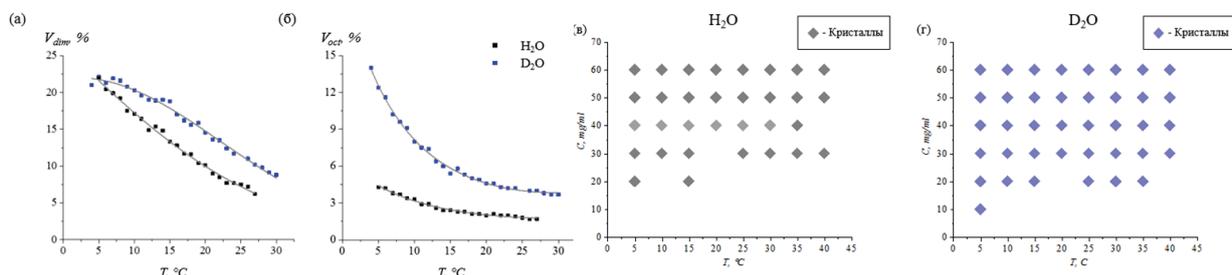


Рисунок 1. Зависимость объемной доли димеров (а) и октамеров (б) от температуры в кристаллизационных растворах лизоцима в H_2O (черная кривая) и D_2O (синяя кривая). Зависимость успешных результатов кристаллизаций лизоцима от концентрации и температуры в H_2O (в) и D_2O (г)

Показано, что объемная доля как октамеров, так и димеров, увеличивается при понижении температуры. Объемная доля октамеров лизоцима выше в D_2O , чем H_2O , причем с понижением температуры рост объемной доли октамеров лизоцима в D_2O происходит существенно быстрее, чем у лизоцима в H_2O (рис. 1б).

Для определения особенностей кристаллизации лизоцима в различных типах растворителей проводилось исследование роста кристаллов лизоцима в H_2O и D_2O при изменении концентрации лизоцима от 10 до 60 мг/мл и температуры от 5 до 40 °C. На рисунке 1в,г. показаны условия успешных результатов кристаллизации лизоцима

при изменении температуры и концентрации в H₂O и D₂O. Показано, что диапазон оптимальных условий роста тетрагональных кристаллов лизоцима в D₂O значительно больше, чем в H₂O. При более низких температурах и высоких значениях концентрации лизоцима рост кристаллов наиболее вероятен. Результаты кристаллизации хорошо согласуются с результатами исследования структуры растворов в H₂O и D₂O.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по гранту № 075-15-2021-1362, договор № 208 ЕП, Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-29-12042 мк) и Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

1. McPherson A., Cudney B. Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules // Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun. International Union of Crystallography, 2014, vol. 70, no. 11, pp. 1445-1467.

2. Dyakova Y.A. et al. Small-angle X-ray scattering study of conditions for the formation of growth units of protein crystals in lysozyme solutions // Crystallogr. Reports, 2017, vol. 62, no. 3, pp. 364-369.

3. Boikova A.S. et al. Small-angle X-ray scattering study of the influence of solvent replacement (from H₂O to D₂O) on the initial crystallization stage of tetragonal lysozyme // Crystallogr. Reports, 2017, vol. 62, no. 6, pp. 837-842.

ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНОВ γ М-КРИСТАЛЛИНОВ В ХРУСТАЛИКЕ МОЛОДЫХ *CYPRINUS CARPIO*

Transcription of γ M-Crystallin Genes in the Lens of Juvenile *Cyprinus Carpio*

Капитунова А.И., Доминова И.Н., Жуков В.В.

Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, г. Калининград, РФ, aikapitunova@mail.ru

Характерной особенностью белкового состава хрусталиков рыб является существенная доля γ М-кристаллинов, которые отвечают за его специфические свойства у гидробионтов [1]. Формирование этих свойств в онтогенезе, очевидно, сопровождается изменением паттернов экспрессии отдельных белков этой группы [2]. Целью данной работы было продолжение ранее начатого мониторинга уровня транскрипции генов γ М-кристаллинов в хрусталике карпов *Surginus carpio* Парской породы (УОРХ ФГБОУ ВО «КГТУ») на возрастном интервале от 4-х до 20-ти месяцев. Материал для анализа был взят у 4-х, 10-ти, 14-ти и 20-ти месячных рыб (n=10). Из гомогенизированных образцов выделяли рНК, а затем проводили ОТ-ПЦР, по результатам которой оценивали уровни транскрипции генов. Дизайн специфических праймеров осуществляли с помощью ПО Primer-BLAST на основании данных о геноме *C. carpio* в базе NCBI [4]. Полученные праймеры анализировали и оценивали с помощью ПО IDT OligoAnalyzer Tool и Nucleotide BLAST. В качестве референсного был взят ген 18S рНК [5]. Уровни транскрипции выбранных генов определяли скорректированным методом 2- $\Delta\Delta$ Ct [6]. Оценку достоверности различий между нормализованными уровнями транскрипции генов кристаллинов проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим post hoc анализом на основе критерия Тьюки. Величину инкремента показателя преломления (dn/dc) кристаллинов рассчитывали, как средневзвешенное значение, определенное на основе аминокислотного состава белка [7].

В хрусталиках рыб всех возрастных групп была обнаружена экспрессия генов семи белков: γ -кристаллина N-A (*Crygn1*), β -кристаллина подобного S (*Grygs2*), γ -кристаллина M1 (*Gcm1*), γ -кристаллин подобного M1 (*Gcm11*), 2 изоформ γ -кристаллина подобного M2 (*Gcm21*, *Gcm212*) и γ -кристаллина M6 (*Crygm6*). Уровни транскрипции этих генов с возрастом изменялись без определенной тенденции, но при этом достигали статистически подтверждаемых максимальных значений у рыб 20-ти месячного возраста. Экспрессия генов *Grygs2*, *Crygn1* и *Gcm212* была выявлена также в мозге, мышцах и печени. Поэтому был сделан вывод, что кристаллины *Gcm1*, *Gcm11*, *Gcm21*, *Crygm6*, являются специфическими белками хрусталика глаза *C. Carpio*, по крайней мере, на возрастном периоде 4 – 20 месяцев. Для них были получены следующие значения dn/dc : *Gcm1* - 0,1989; *Gcm11* - 0,1983; *Gcm21* - 0,2011; *Crygm6* - 0,1954. По этому показателю выделяется белок *Gcm21*, ген которого имеет по сравнению с другими наибольшее значение уровня транскрипции в хрусталиках карпов всех возрастных групп. Все же небольшие различия в величинах dn/dc этих белков, а также отсутствие в онтогенезе строгой закономерности экспрессии их генов показывают, что формирование радиального градиента показателя преломления хрусталика не определяется лишь динамикой синтеза конкретных кристаллинов, а является более сложным процессом, включающим специфический фолдинг молекул.

1. Lin Y.R., Mok H.K., Wu Y.H., Liang S.S., Hsiao C.C., Huang C.H., Chiou S.H. Comparative proteomics analysis of degenerative eye lenses of nocturnal rice eel and catfish as compared to diurnal zebrafish // Mol Vis., 2013, vol. 19, pp. 623-637.

2. Pierscionek B.K., Regini J.W. The gradient index lens of the eye: an opto-biological synchrony // Prog Retin Eye Res, 2012, vo. 31, no. 4, pp. 332-349.

3. Kolder ICRM, van der Plas-Duivesteijn J., Tan G., Wiegertjes G.F. et al. A full-body transcriptome and proteome resource for the European common carp // BMC Genomics, 2016, vol. 17, p. 701.

4. Liu W., Yuan X., Yuan S., Dai L., Dong S., Liu J., Peng L., Wang M., Tang Y., Xiao Y. (2020) Optimal reference genes for gene expression analysis in polyploid of *Cyprinus carpio* and *Carassius auratus* // BMC Genet, vol. 21, p. 107.
5. Yuan J.S., Reed A., Chen F., Stewart C.N. Statistical analysis of real-time PCR data // BMC Bioinformatics, 2006, vol. 7, p. 85.
6. Zhao H., Brown P.H., Schuck on the distribution of protein refractive index increments // Biophys J, 2011, vol. 100, no. 9, pp. 2309-2317.

ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ КАРБОКСИАНГИДРАЗЫ Б ПРИ ВАРИАЦИИ pH Time-Resolved Fluorescence of Carbonic Anhydrase II at pH Variation

Карузина Н.Е.¹, Немцева Е.В.^{1,2}, Мельник Б.С.³

¹ Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, РФ, karuzina1994@gmail.com

² Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск, РФ

³ Институт белка РАН, г. Пущино, Московская область, РФ

Собственная флуоресценция белков, обусловленная в большинстве случаев триптофановыми остатками, является чувствительным параметром к нарушению структуры белка [1]. Ранее, на примере карбоксиангидразы Б было предложено использовать компоненты времени жизни флуоресценции белков для описания их структурных переходов в ходе разворачивания/сворачивания [2], поскольку значения времени жизни обусловлены только структурой и окружением флуорофора, а не его концентрацией. В данной работе исследовали структурные переходы карбоксиангидразы Б при вариации pH раствора методом время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии. Целью было сравнить полученные характеристики с данными для равновесной денатурации этого белка в растворах мочевины и определить сходство/различия путей разворачивания под действием двух разных факторов.

Для исследования использовали лиофилизированный препарат карбоксиангидразы Б быка (BCA II), полученный в группе спектроскопии белка Института белка РАН (г. Пущино). Объектом исследования являлись дикий тип BCA II и его мутантные формы L78A, L139A, I208A, M239A.

Белки инкубировали в течение >20 часов при комнатной температуре в цитратно-фосфатном буфере при pH 2-8. Затем были измерены оптические характеристики: спектр поглощения (спектрофотометр Cary 5000, Agilent Technologies), флуоресценция при стационарном и импульсном возбуждении с длиной волны 296 нм (спектрофлуориметр Fluorolog-3, Horiba, JobinYvon). Времена жизни флуоресценции вычисляли с помощью методов деконволюции [3] и глобального анализа [4] по спадам флуоресценции, измеренным в диапазоне 305–417 нм. Спектры флуоресценции были откорректированы с учетом эффекта внутреннего фильтра и фона растворителя.

Было получено, что триптофановая флуоресценция белков характеризуется двумя основными временами жизни: $\tau_1 = 1-2$ нс и $\tau_2 = 4,8-5,8$ нс. При значениях pH от 4 до 5 наблюдалась агрегация белков, что приводило к искажению спектров поглощения рассеянием, снижением интенсивности флуоресценции и появлению третьей компоненты времени жизни флуоресценции белков, $\tau_3 = 0,01-0,03$ нс со значительным спектральным вкладом (до 35%). Наложение рассчитанных значений времени жизни флуоресценции на параметрические графики $\tau_1(\tau_2)$, полученные при равновесной денатурации BCA II в мочеине, показало, что в области нативного состояния белков (pH 6,5-8) время-разрешенные характеристики совпадают. Для корректной интерпретации и сравнения характеристик белков было проведено измерение зависимости времени жизни свободного триптофана от pH среды. Получено, что при увеличении pH от 2 до 6,5 флуоресценция триптофана характеризуется двумя компонентами с увеличивающимися значениями: τ_1 – с 1,01 до 1,38 нс и τ_2 – с 1,98 до 3,10 нс.

Таким образом, было показано, что для корректного сравнения путей разворачивания белка под действием различных факторов требуется учитывать изменение характеристик репортерных групп белка (триптофановых остатков) под действием этих факторов.

1. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy // J.R. Lakowicz. New York: Springer Science, 2006.
2. Nemtseva E.V., Gerasimova M.A., Melnik T.N., Melnik B.S. Experimental approach to study the effect of mutations on the protein folding pathway // PLoS ONE, 2019, vol. 14, no. 1, p. e0210361.
3. Ameloot M., Hendrickx H. Extension of the performance of Laplace deconvolution in the analysis of fluorescence decay curves // Biophys. J., 1983, no. 44 (1), pp. 27-34.
4. Knutson J.R., Beechem J.M., Brand L. Simultaneous analysis of multiple fluorescence decay curves: A global approach // Chem. Phys. Lett., 1983, no. 102 (6), pp. 501-507.

СООТНОШЕНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ *PORPHYRIDIUM PURPUREUM* В УСЛОВИЯХ УГЛЕРОДНОГО ЛИМИТИРОВАНИЯ

Ratios of Photosynthetic Pigments in Batch Culture *Porphyridium Purpureum* in Conditions of Carbon Limitation

Клочкова В.С.¹, Лелеков А.С.²

¹ Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ, viki-iki@mail.ru

² ФИЦ Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь, РФ, a.lelekov@yandex.ru

Есть три группы светособирающих и фотозащитных пигментов: хлорофиллы, каротиноиды и фикобилипротеины (ФБП). Хлорофиллы – пигменты, которые улавливают энергию солнечного света, передают её на реакционные центры фотосинтеза. Каротиноиды обладают фотопротекторными свойствами, а также они могут передавать поглощенную энергию на хлорофилл. Фикобилипротеины входят в состав фикобилисом, участвуют в чрезвычайно эффективной цепи передачи энергии на реакционный центр ФСII. Они отвечают примерно за 50 % захвата света красными водорослями [1].

ФБП красной водоросли *Porphyridium purpureum* являются В-фикоэритрин (В-ФЭ), R-фикоцианин (R-ФЦ) и аллофикоцианин (АФЦ). В прикладном аспекте наибольший интерес вызывает красный пигмент В-ФЭ. Количество В-ФЭ может составлять до 85 % от общей суммы ФБП. Относительное содержание В-ФЭ и его продукция варьируют в достаточно широком диапазоне в зависимости от условий культивирования *P. purpureum*; значение скорости синтеза В-ФЭ может достигать 40–50 мг·л⁻¹·сут⁻¹ [2].

Известны работы, в которых исследовалось влияние азота и интенсивности света на концентрацию и продукцию пигментов в квазинепрерывных культурах *P. purpureum* [1, 3]. Однако, для накопительной культуры в условиях углеродного лимитирования исследование динамики соотношений между фотосинтетическими пигментами является актуальной задачей.

Целью данной работы являлось определить динамику изменения концентраций основных пигментов и их соотношений в накопительной культуре *P. purpureum*.

Работа выполнялась на базе кафедры “Физика” СевГУ. Объектом исследования являлась красная морская микроводоросль *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew & Ross (1965). Выращивание проводилось в накопительном режиме в плоскопараллельном культиваторе объёмом 1 л с использованием среды для красных морских водорослей [3]. В качестве источника освещения использовалась световая решётка из холодных люминесцентных ламп Philips Daylight TL-D 54-765 6G мощностью 18 Вт. Средняя освещённость рабочей поверхности фотобиореактора составляла 5 клк. Температура культуры стабилизировалась на уровне 24±1 °С. Спектры поглощения микроводоросли регистрировались ежедневно в диапазоне от 400 до 800 нм на двулучевом спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible, оснащённом интегрирующей сферой (ИС) диаметром 60 мм. Для определения истинного спектра поглощения, компенсированного на рассеяние, 1 см кюветы помещали в стандартное положение и на расстоянии от входного окна ИС. Спектры фиксировались относительно дистиллированной воды. Для определения концентрации пигментов культуры *P. purpureum* в красной области использовалась математическая модель [4].

В процессе роста плотности накопительной культуры *P. purpureum* биомасса увеличилась до 4 г СВ/л, что соответствует максимально возможному значению на используемой питательной среде. Скорость роста культуры была ограничена потоком углерода, её максимальное значение составляло 0,29 г СВ/(л·сут). Концентрация хлорофилла *a* возрастала от 0,8 до 15,1 мг/л; В-ФЭ – от 7,9 до 161,5 мг/л; R-ФЦ – от 0,5 до 20,4 мг/л; АФЦ – от 0,9 до 1,8 мг/л. Относительное содержание пигментов в сухой биомассе *P. purpureum* в среднем составляло 0,35 % для хл *a*; 4 % для В-ФЭ, 0,48 % для R-ФЦ; 0,1 % для АФЦ. Экспериментально установлено, что соотношения концентраций пигментов хл *a*/В-ФЭ; хл *a*/R-ФЦ; хл *a*/АФЦ; В-ФЭ/R-ФЦ; В-ФЭ/АФЦ; R-ФЦ/АФЦ не изменяются в течение роста накопительной культуры *P. purpureum*. Проведённые исследования позволяют поставить вопрос о постоянстве соотношений между фотосинтетическими пигментами накопительной культуры *P. purpureum* в условиях углеродного лимитирования.

1. Cunningham F.X., Dennenberg R.J., Mustardy L., Jursinic P.A., Gantt E. Stoichiometry of photosystem I, photosystem II, and phycobilisomes in the red alga *Porphyridium cruentum* as a function of growth irradiance // *Plant Physiol.*, 1989, vol. 91, no. 3, pp. 1179-1187, doi: 10.1104/pp.91.3.1179.

2. Боровков А.Б., Гудвилович И.Н., Новикова Т.М., Климова Е. В. Продукционные характеристики полупроточной культуры *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross при низкой освещённости // *Морской биологический журнал*, 2022, т. 7, № 1, с. 3-13, doi: 10.21072/mbj.2022.07.1.01.

3. Гудвилович И.Н., Боровков А.Б. Продукционные характеристики *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. в условиях накопительной и квазинепрерывной культуры // *Альгология*, 2014, т. 24, № 1, с. 34-46.

4. Чернышев Д.Н., Клочкова В.С., Лелеков А.С. Разделение спектра поглощения культуры *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. в красной области // *Вопросы современной альгологии*, 2022

РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫЕ МАГНИТНЫЕ МИКРОПИНЦЕТЫ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

Rare-Earth Magnetic Micro Tweezers for Biological and Medical Applications

Марченков Р.Е.¹, Йоник Е.А.¹, Терехов И.И.¹, Дворецкая Е.В.^{1,2}, Коплак О.В.^{1,2}, Аносов А.А.¹¹ Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России² Институт проблем химической физики РАН (ИПХФ РАН), o.koplak@gmail.com

Идентификация микробиологических объектов, позиционирование и их адресное перемещение возможны с использованием магнитных пинцетов, магнитных микроустройств, работающих на принципах магнитного взаимодействия. Для адресного изучения отдельных клеток, сепарации здоровых и больных необходим инструмент, который позволил бы благодаря неразрушающему контролю манипулировать ими в жидкой среде. Задача анализа и изучения поведения здоровых и зараженных клеток, меченных ферромагнитными наночастицами может быть решена с помощью микромагнитов - магнитных пинцетов, способных притягивать/перемещать магнитомеченные клетки за счет большого градиента магнитного поля [1-3]. В качестве такого манипулятора может выступать магнитный микропинцет на основе конусообразных микропроводов Tb, которые обладают микронным диаметром ($\sim 10 \mu\text{m}$), малым значением коэрцитивной силы ($H_C \approx 9 \text{ Oe}$) и высоким значением намагниченности насыщения ($M_S \approx 30.5 \text{ emu/g}$) (рис. 1a). В работе исследована структура, интегральные и локальные магнитные свойства TbFeV микропроводов, полученных методом экстракции висящей капли расплава [4]. Путём селективного травления цилиндрического микропровода TbFeV в смеси кислот $\text{HClO}_4 + \text{HNO}_3$ (1:1) получена конусообразная геометрия конца микропровода (рис. 1b), что привело к значительному (в 100 раз) увеличению градиента магнитного потока на конце.

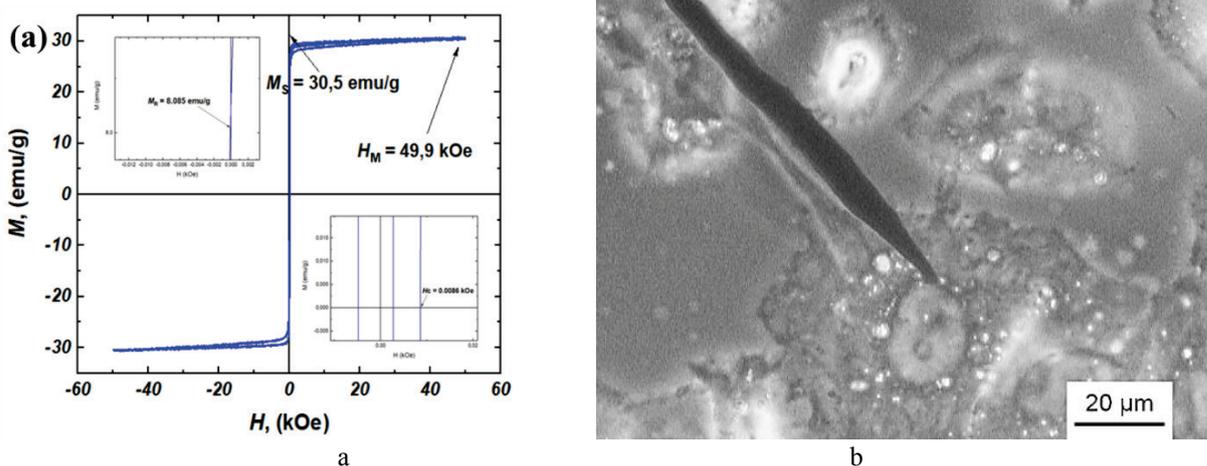


Рисунок 1. Магнитный гистерезис микропинцета TbFeV (a) и оптическое изображение магнитного микропинцета TbFeV с захваченной клеткой HeLa (b).

Селективное травление смесью кислот $\text{HClO}_4 + \text{HNO}_3$ (1:1) позволяет получить вытянутую конусообразную геометрию конца микропровода радиусом $\sim 1 \mu\text{m}$ и градиентом магнитного потока $1.03 \cdot 10^4 \text{ T/m}$, что достаточно для использования модифицированного микропровода в качестве магнитного микропинцета, способного манипулировать магнитомечеными биологическими объектами, производить исследования механочувствительных ионных каналов; изменять пути дифференцировки и экспрессии генов мезенхимальных стволовых клеток, а также модифицировать клетки моноцитарной лейкемии TH3-1 [5].

Работа выполнена в рамках тематической карты Института проблем химической физики РАН АААА-А19-119092390079-8.

1. Morgunov R.B., Koplak O.V. Focused magnetization in sharpened rare-earth microwires with four switchable magnetic states // Materials Letters, 2020, vol. 273, p. 127954.
2. Kollmannsberger P, Fabry B. High-force magnetic tweezers with force feedback for biological applications // Review of Scientific Instruments, 2007, vol. 78, p. 114301.
3. Koplak O.V., Morgunov R.B. Exchange bias and spin-reorientation transition in $\alpha\text{-Fe/PrDyCoFeV}$ core/shell microwires // Materials Science and Engineering: B, 2021, vol. 263, p. 114845.
4. Коплак О.В., Дворецкая Е.В., Кравчук К.С., Усейнов А.С., Королев Д.В., Валеев Р.А., Пискорский В.П., Дмитриев О.С., Моргунов Р.Б. Морфология и механические свойства микропроводов PrDyFeCoV // Физика твердого тела, 2020, вып. 12, с. 2026.
5. Kobayashi T. J-Aggregates. Singapore: World Scientific, 1996, 228 p.

ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ С НАНОЧАСТИЦАМИ Fe_3O_4 (НЧ) НА ОНТОГЕНЕЗ И МОРФОМЕТРИЮ КУКУРУЗЫ САХАРНОЙ

Influence of the Combined Action of an ac Magnetic Field with Fe_3O_4 Nanoparticles (cit) on Ontogenesis and Morphometry of Sugar Corn

Котюк П. Ф., Корниенко В.О.

Донецкий национальный университет, г. Донецк, ДНР, *pkotyuk01@mail.ru*

В настоящее время вопросами предпосевной обработки сельскохозяйственных культур занимаются ученые-биологи (ботаники, физиологи, биофизики), физики, химики, инженеры, специалисты в области сельского хозяйства и технических наук, что говорит об особой актуальности данной проблемы. Ранее нами было изучено влияние исключительно наночастиц (НЧ) Fe_3O_4 [1,2], а также влияние переменного магнитного поля (ПеМП) [3,4], на рост и развитие кукурузы сахарной. В связи с тем, что прогрессивная технология получения сельскохозяйственной продукции должна предусматривать экономию материальных и трудовых затрат при высокой стабильности получаемых результатов и сохранении единого согласованного во всех звеньях производственного цикла, нами было предпринято изучение сочетанного действия двух факторов – ПеМП и НЧ на предпосевные свойства семян растений.

Облучение семян ПеМП. Предпосевная обработка семян кукурузы сахарной происходила в течение 1 часа при значениях магнитной индукции ПеМП 1 мТл и частотой магнитных колебаний 50 Гц. Выборка состояла из 50 семян в 3-кратной повторности.

Обработка семян НЧ. Семена замачивали на 1 час в раствор наночастиц Fe_3O_4 с цитратным покрытием и концентрацией 0,1 мг/мл.

В результате проведения исследований были сформированы 5 групп:

Таблица 1. Экспериментальные группы

| НАЗВАНИЕ ГРУППЫ | ОПИСАНИЕ |
|-----------------|---|
| К | контрольная группа растений |
| I | ПеМП с магнитной индукцией 1 мТл (время облучения 1 час) |
| II | обработка наночастицами Fe_3O_4 с цитратным покрытием при $C=0.1$ мг/мл (время инкубации 1 час) |
| III | сочетанное действие ПеМП ($B=1$ мТл) и НЧ Fe_3O_4 ($C=0.1$ мг/мл) |
| IV | сочетанное действие НЧ Fe_3O_4 ($C=0.1$ мг/мл) и ПеМП ($B=1$ мТл) |

Оценка силы роста группы семян. После обработки переменным магнитным полем семян кукурузы сахарной и дальнейшего проращивания, оценивали проростки, согласно критериям стандартного теста на всхожесть. Более подробно методика описана в предыдущих разделах.

При общей оценке влияния сочетанного действия переменного магнитного поля и наночастиц Fe_3O_4 , достоверно получены однозначные данные о стимулирующем действии схемы № III – сочетанное действие ПеМП (с параметрами поля: $f=50$ Гц, $B=1$ мТл, тип сигнала синусоида, $t_{облучения}=1$ час) и НЧ Fe_3O_4 ($C=0,1$ мг/мл, $t_{инкубации}=1$ час). По сравнению с контролем а) сила роста составляла 28%; б) опережение фазы онтогенеза всходы «1-2 листа» в 2,5 раза; в) морфометрические параметры надземной части и корневой системы выше в 2,2 и 1,4 раза соответственно.

1. Корниенко В.О., Кольченко О.Р., Яицкий А.С. Влияние наночастиц Fe_3O_4 на онтогенез и морфометрические показатели кукурузы сахарной (*Zea mays* L.) // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки, 2020, № 08/2, с. 30-36.

2. Корниенко В.О. Влияние наночастиц Fe_3O_4 с различными типами покрытия на ранние стадии развития кукурузы сахарной (*Zea mays* L.) // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона, 2020, № 3-4, с. 88-98.

3. Корниенко В.О., Котюк П.Ф., Яицкий А.С. Влияние переменного магнитного поля (1-14 мТл) на рост и развитие кукурузы сахарной // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и Технические Науки, 2021, № 11, с. 17-23.

4. Корниенко В.О., Котюк П.Ф., Яицкий А.С. Влияние переменного магнитного поля с различным временем экспозиции на рост и развитие кукурузы сахарной (*Zea mays* L.) // Естественные и технические науки, 2021, № 11 (162), с. 57-61.

**ПРОДУКЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПРИ ДЕЙСТВИИ
УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО-В ИЗЛУЧЕНИЯ НА КЛЕТКИ ДРОЖЖЕЙ**
Production of Reactive Oxygen Species under the Action of UV-B Radiation on Yeast Cells

Кочарли Н., Гумматова С.

Бакинский государственный университет, г. Баку, Азербайджан, sam_bio@mail.ru

Живые организмы постоянно сталкиваются с большим количеством повреждений, вызванных различными биотическими и абиотическими факторами, такими как температура, ультрафиолетовое, ионизирующее излучение, тяжелые металлы. Под влиянием неблагоприятных факторов образуются активные формы кислорода (АФК), которые приводят к окислительному стрессу. Под активными формами кислорода подразумевают совокупность взаимно превращающихся высоко реакционноспособных форм кислорода, большинство из которых существует короткое время. Активные формы кислорода представляют собой частично восстановленные формы кислорода. Существуют три основных вида АФК, которые производятся поэтапно, в зависимости от степени снижения содержания кислорода [2].

Супероксид анион-радикал ($\cdot\text{O}_2^-$) является основной активной формой кислорода, образующейся при соединении одного электрона к молекуле кислорода. НАДФН является донором электронов. НАДФН-оксидаза выполняет функцию в качестве катализатора реакции. Образование этого радикала оказывает разрушительное воздействие на фотосистему I и фотосистему II, а также на весь фотосинтетический механизм [3].

Перекись водорода (H_2O_2) - достаточно стабильная активная форма кислорода, которая является дисмутацией супероксида. Присоединение двух электронов к молекуле кислорода или одного электрона к супероксид анион-радикалу приводит к образованию перекиси водорода. Перекись водорода при низкой концентрации передает сигналы, которые приводят к противодействию биотическому и абиотическому стрессу, и при более высоких концентрациях вызывает запрограммированную гибель клеток.

Гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$) является самым активным и наиболее токсичным видом АФК, который образуется в результате реакции Хабера - Вейса и Фентона. Этот радикал может вступать в реакцию со всеми видами биологических молекул [1].

В настоящей работе изучено влияние ультрафиолетового-В (УФ-В) излучения на продукцию АФК в клетках дрожжей.

Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii*. Клетки дрожжей выращивали на сусло-агаре (4 Балл) в термостате при температуре 30⁰ С в течение 3 дней. Изменение уровня АФК определяли с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate- $\text{H}_2\text{DCF}\cdot\text{DA}$ («Fluka», Швеция). Данный краситель используется для определения уровня АФК в живых клетках. $\text{H}_2\text{DCF}\cdot\text{DA}$ при деацетилировании эстеразами превращается в H_2DCF . В присутствии АФК H_2DCF окисляется до DCF, который в дальнейшем флуоресцирует в зеленом канале. Для определения уровня АФК клетки дрожжей – с 50 мкМ в течение 30 мин. Источником УФ-В служила ртутная лампа ПРК-4. Клетки дрожжей *Candida guilliermondii* являются удобным модельным объектом для исследования клеточных процессов, а также ответа клетки на действие стресса. Использование в работе легко размножающихся клеток дрожжей, время удвоения клеток которых значительно меньше времени удвоения клеток высших эукариот.

Изучено изменения содержания АФК и жизнеспособности клеток *Candida guilliermondii* при УФ-В излучении и влияние аскорбиновой кислоты на изменение данных процессов.

Известно, что УФ-В излучение приводит к повышению продукции АФК в клетках дрожжей. Избыточное накопление уровня АФК вызывает развитие окислительного стресса, который может вызывать гибель клетки. Клетки дрожжей подвергали облучению в дозе ($1,2 \times 10^4$ эрг/мм² - $4,8 \times 10^4$ эрг/мм²) анализировали изменение изучаемых параметров.

Установлено, что при воздействии на клетки дрожжей различными дозами УФ-лучей увеличивается количество АФК. Флуоресценция зонда наблюдается при взаимодействии с АФК и интенсивность характеризует активность свободно-радикальных процессов.

Количество АФК в облученных клетках зависит от дозы УФ-лучей. При добавлении аскорбиновой кислоты (1×10^{-3} М) в суспензию не облученных клеток количество АФК не изменяется. Аскорбиновая кислота уменьшает количество АФК в суспензии облученных клеток. При больших дозах ($4,5 \times 10^4$ эрг/мм²) облучения антиокислительный эффект аскорбиновой кислоты в клетках дрожжей незначителен. По-видимому, при облучении клеток дрожжей большими дозами УФ-В излучения уменьшение антиокислительной активности аскорбиновой кислоты связано с использованием аскорбиновой кислоты также в процессе перекисного окисления липидов.

Совокупность полученных данных позволяет предположить, что при действии на клетки УФ-В лучами увеличивается скорость окисления зонда (H_2DCF) и наблюдается высокая интенсивность флуоресценции DCF, но при модификации клеток аскорбиновой кислотой скорость окисления и интенсивность DCF уменьшается. Кроме того, увеличивается жизнеспособность модифицированных клеток. Таким образом, можно заключить, что

при действии УФ-В лучей на клетки дрожжей антиоксиданты возможно могут участвовать в регуляции редокс-гомеостаза.

1. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, vol. 48, no. 12, pp. 909-930.
2. Swati Sachdev et al. Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms *Antioxidants* (Basel). 2021, vol. 10, no. 2, p. 277, doi: 10.3390/antiox10020277.
3. Yergaliyev T.M. et al. The involvement of ROS producing aldehyde oxidase in plant response to Tombusvirus infection // *Plant physiology and biochemistry*, 2016, vol. 109, pp. 36-44.

ЗАВИСИМОСТЬ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА В КОРНЕОБИТАЕМОЙ СРЕДЕ ОТ ФОРМЫ АЗОТА В ПИТАТЕЛЬНОМ РАСТВОРЕ

Dependence of the Bioelectric Potential in the Root Environment on the Nitrogen Form in the Nutrient Solution

Кулешова Т.Э., Желначева П.В., Гасиева З.А., Галушко А.С., Панова Г.Г.

Агрофизический научно-исследовательский институт, г. Санкт-Петербург, РФ, www.piter.ru@bk.ru

В корнеобитаемых средах наблюдается наличие электрических полей, связанных с протеканием окислительно-восстановительных реакций и формированием различных плотностей подвижных зарядов [1]. Градиент концентраций в корнеобитаемой среде наряду с электроактивностью растений и сопутствующей им микрофлоры положены в основу биоэлектрохимической системы (БЭС) – устройства, преобразующего химическую энергию в электрическую с помощью живых организмов [2]. В качестве потенциалобразующего иона рассматривается нитрат, который, однако, также может выступать акцептором электронов, данные процессы могут приводить к конкуренции за электроны в окислительно-восстановительных реакциях. В литературе существуют неоднозначные данные по влиянию форм азота на электрические характеристики БЭС. Например, в работе [3] показано, что присутствие нитрата не влияло на величину выходной мощности микробного топливного элемента, тогда как для БЭС на основе кактусов [4] еженедельное добавление нитрата аммония повысило выработку энергии почти в 13 раз. Целью данной работы являлось выявление влияния формы азота в питательном растворе на формировании разности потенциалов в системе корнеобитаемая среда-растения.

В качестве фитотест-объекта был выбран салат сорта Тайфун. Растения выращивали по технологии тонкослойной панопоники в условиях интенсивной светокультуры. БЭС представляла собой ячейку площадью $15 \times 10 \text{ см}^2$ и высотой 4 см, в которой размещали и выращивали пророщенные семена салата в количестве 2 растений. Измеряемой характеристикой, отражающей биоэлектрическую активность корневой системы и сопутствующих микроорганизмов и протекание метаболических процессов в корнеобитаемой среде, служил биоэлектрический потенциал (БЭП) – разность потенциалов, измеряемая в нашем случае между корневой шейкой и дном емкости для выращивания. В работе были исследованы следующие варианты питательного раствора, модифицированные по форме азота: вариант 1 (классический раствор Кнопа) содержал нитратную форму азота ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KNO_3), вариант 2 – амидную ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$), вариант 3 – смешанную нитратно-аммонийную (NH_4NO_3 , KNO_3). Вегетационный опыт проводили дважды, с 3х-кратной повторностью вариантов в каждом эксперименте.

В таблице 1 представлены полученные результаты по генерации разности потенциалов и формированию растительной продукции в БЭС на основе питательных растворов, содержащих азот в различной форме. Нитратная и аммонийная формы азота быстро усваиваются растениями и имеют близкую подвижность ионов – $7.4 \cdot 10^{-8} \text{ м}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ для NO_3^- и $7.6 \cdot 10^{-8} \text{ м}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ для NH_4^+ , при этом поглощение аммонийной формы является более энергетически выгодным. Амидная же форма усваивается в основном через листовую поверхность, что отразилось на биомассе растений. По полученным данным можно предположить, что величина БЭП связана с массой корневой системы и напрямую не зависит от продуктивности надземной части.

Таблица 1. Электрические и морфологические параметры БЭС на основе панопоники, содержащей питательный раствор с различными формами азота

| Форма азота в БЭС | Средний БЭП, мВ | Максимальный БЭП, мВ | Масса листьев одного растения, г | Высота растений, см | Масса корней, г | Содержание нитрата в листьях, мг/кг н.в. |
|---------------------|-----------------|----------------------|----------------------------------|---------------------|-----------------|--|
| Нитратная | 243±21 | 347 | 21,1±4,3 | 13±2,5 | 8,2±2,3 | 940±41 |
| Амидная | 147±36 | 298 | 12,1±2,2 | 11,5±3,4 | 3,3±3,1 | 247±22 |
| Нитратно-аммонийная | 178±35 | 298 | 22,9±2,2 | 13±3,1 | 6,8±2,3 | 1157±95 |

Таким образом, выявлена наглядная тенденция по увеличению выходных характеристик БЭС на основе питательного раствора, содержащего азот в нитратной форме, – разность потенциалов достигала ~350 мВ и была

стабильной на протяжении вегетационного периода. Перемещение ионов в корнеобитаемой среде в процессе жизнедеятельности растений может стать новым зеленым источником электроэнергии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-4397.2022.5).

1. Поздняков А.И., Позднякова А.Д. Электрофизика почв. Москва–Дмитров: ВНИИМЗ, МГУ, 2004, 48 с.
2. Кулешова Т.Э., Панова Г.Г., Галль Н.Р., Галушко А.С. Концентрационный элемент на основе электрогенных процессов в корнеобитаемой среде // ПЖТФ, 2022, № 8, doi: 10.21883/PJTF.2022.08.52363.19066.
3. Morris J.M., Jin S. Influence of NO_3^- and SO_4^{2-} on power generation from microbial fuel cells // Chemical Engineering Journal, 2009, vol. 153, no. 1-3, doi: 10.1016/j.cej.2009.06.023.
4. Apollon W. et al. Effect of ammonium nitrate on novel cactus pear genotypes aided by biobattery in a semi-arid ecosystem // Sustainable Energy Technologies and Assessments, 2022, vol. 49, doi: 10.1016/j.seta.2021.101730.

ВЫЯВЛЕНИЕ КОНСЕРВАТИВНОСТИ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР В ХОДЕ ЭВОЛЮЦИИ БЕЛКОВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ

Identification of Conservativeness of Secondary Structures during the Evolution of Proteins of Different Classes

Лапшина К.К., Багрова О.Е., Белова Е.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия, *lapshina.2003@gmail.com*

Белки являются одними из наиболее сложных по структуре молекул и выполняют набор высокоспецифичных функций: от структурной до ферментативной. Биологическая функция белка напрямую определяется его конформацией [1]. Появление таких сложных систем в живых организмах обусловлено их эволюционным развитием. Известно, что структура белка является более устойчивой во времени, нежели его аминокислотная последовательность. Выполняя различные функции, белки, имеющие, предположительно, общего предка, сохраняют трехмерную складку, несмотря на то что в ходе мутаций в них отсутствует даже набор общих функциональных остатков, которыми можно руководствоваться при сравнении последовательностей и структур [2].

В ходе данного исследования были проанализированы распределения вторичных структур (α -спиралей, β -листов, спиралей 3_{10} и нерегулярных структур) по полипептидным цепям белковых суперсемейств глобины и фикоцианины. Изучение их особенностей происходило на основании информации о вторичных структурах, полученной из базы данных PDB [3]. Отбор белков-представителей каждого класса был произведен с помощью баз данных CATH [4] и PFam [5]. Таким образом, была создана подборка из 168 уникальных белков (131 белок класса глобины, 37 белков класса фикоцианины).

Был проведен анализ 465 полипептидных цепей, из которых 370 принадлежат глобинам, 95 – фикоцианинам. Для обработки информации о выбранных структурах использовался алгоритм, реализованный с помощью программ на языке C++ и python. Полученные диаграммы и графики распределения вторичных структур по полипептидным цепям позволяют судить о сходствах и различиях белков двух классов, а также выявить их индивидуальные особенности.

1. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка: курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами. М.: кДУ. 2012.
2. Pastore A., Lesk A.M. Comparison of the structures of globins and phycocyanins: Evidence for evolutionary relationship // Proteins: Structure, Function, and Genetics, 1990, no. 8(2), pp. 133-155.
3. <http://www.rcsb.org> (The Protein Data Bank) (дата обращения: 15.02.2022).
4. <https://www.cathdb.info/> (CATH: Protein Structure Classification Database) (дата обращения: 14.12.2021).
5. <http://pfam.xfam.org> (PFam: The protein families database in 2021) (дата обращения: 14.12.2021).

**РОЛЬ КАТИОНОВ И АНИОНОВ ПРИ ОБРАЗОВАНИИ КРИСТАЛЛИЗАЦИОННЫХ
ОЛИГОМЕРОВ В РАСТВОРАХ БЕЛКОВ ПО СОВОКУПНОСТИ ДАННЫХ
МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ**
The Role of Cations and Anions in The Formation of Crystallization Oligomers in Protein Solutions from Small-Angle X-Ray Scattering and Molecular Dynamics Data

Марченкова М.А.¹, Конарев П.В.¹, Кордонская Ю.В.², Ильина К.Б.¹, Писаревский Ю.В.¹,
Ковальчук М.В.²

¹ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, г. Москва, РФ,
marchenkova@crys.ras.ru

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва, РФ

Проблема относительной эффективности различных ионов при кристаллизации белков рассматривается уже много лет [1,2]. Гофмейстер в [3] показал, что растворимость лизоцима в основном зависит от анионов и лишь незначительно от катионов, а в [2] было обнаружено, что в соответствии с порядком эффективности солей с разными анионами (pTs⁻, SCN⁻, NO₃⁻, Cl⁻ and H₂PO₄⁻), понижающими растворимость лизоцима, существуют отличия в их способности изменять белковые взаимодействия от отталкивания к притяжению, при этом вид катиона (Li⁺, Na⁺, K⁺, Cs⁺ and NH₄⁺) не оказывала на это заметного влияния.

Взаимопритяжение молекул белка приводит к образованию олигомеров, играющих роль «кластеров-прекурсоров» при формировании белкового кристалла. В недавних работах [4-6] было обнаружено, что перед кристаллизацией лизоцима в растворе образуются его олигомеры, участвующие в последующем росте кристалла.

В [7] было определено, что в условиях с разными осадителями количество катионов и анионов (Cl⁻), связанных с молекулой лизоцима, отличается (рис. 1): в структуре PDB ID: 4WLD учитывается только один ион натрия, а в структурах PDB ID: 6QWY, 6QWW, 6QWX, 6QWZ, 6QX0 в решетке были определены позиции ионов хлора и дополнительных ионов металлов, связанных с молекулой лизоцима. Для оценки стабильности таких олигомеров и изучения поведения атомов и связей в их структуре было предложено использовать метод молекулярной динамики [8-9].

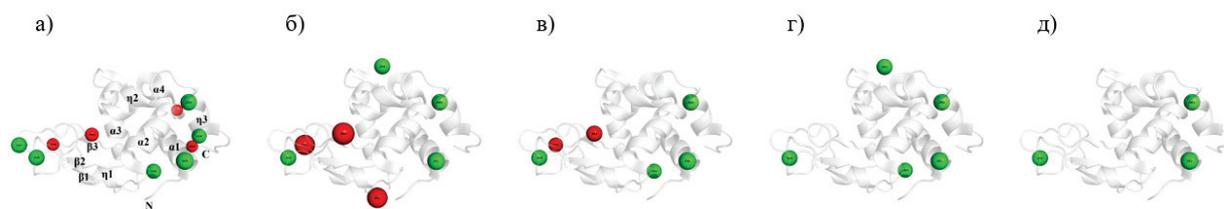


Рисунок 1. Расположение ионов металла (красная сфера) и хлора (зеленая сфера), связанных с молекулой лизоцима в Cu- (а), Ni- (б), Na- (в), K- (г), Li-кристаллах (д)

В работе [9] показано, что с повышением температуры RMSF димеров и октамеров лизоцима увеличивается (т.е. понижается стабильность олигомеров) регулярным образом только тогда, когда используются модели, учитывающие все ионы осадителя, связанные с белком. Кроме того, димеры стабильнее с ионами осадителя (по крайней мере, катионами), встроенными в белок, чем без них [10]. По данным МД димер и октамеры в кристаллизационном растворе лизоцима стабилизируют именно ионы хлора.

В данной работе был проведен анализ влияния используемых кристаллографических моделей олигомеров на качество приближения экспериментальных данных МУРР. Кристаллографические структуры из Protein Data Bank 6QWW, 6QWX, 6QWY, 6QWZ, 6QX0 или 4WLD, различающиеся количеством катионов (Cu²⁺, Ni²⁺, Na⁺, K⁺ and Li⁺) и анионов (Cl⁻), связанных с молекулой лизоцима от максимального присутствия (четыре иона меди и шесть ионов хлора) до полного отсутствия ионов осадителя в структуре мономера лизоцима, были взяты в качестве мономерных компонентов. Показано, что наилучшее согласие с экспериментальными данными достигается для олигомеров либо без катионов осадителя, либо с минимальным количеством встроенных ионов металлов. Заполнение белковых структур ионами меди и образование связей с катионом осадителя, по-видимому, происходит на более поздней стадии кристаллизации и не оказывает существенного влияния на образование предкристаллизационных олигомеров, в отличие от заполнения белковых структур ионами хлора и образования связей с анионом осадителя согласно результатам молекулярной динамики [9].

Поскольку МУРР более чувствителен к атомам с более высокой электронной плотностью (катионам), а МД показывает роль «легких» для рентгена анионов, сочетание этих двух методов дало возможность определить начальные шаги, предшествующие росту белкового кристалла: сначала только ионы хлора (все присутствующие в кристаллической структуре или некоторые из них) связываются с мономерами, затем образуются олигомеры с данными встроенными ионами, и, наконец, катионы (и остальные анионы) включаются в олигомеры, что приводит к образованию кристаллов, со всеми ионами осадителя, связанными с ним.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по гранту № 075-15-2021-1362 в части обработки данных МУРР и анализа результатов, Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-29-12042 мк) в части сопоставления данных МУРР и МД и Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части подготовки кристаллографических моделей кластеров белков-прекурсоров.

1. Ries-Kautt M.M., Ducruix A.F. Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme // Journal of Biological Chemistry, 1989, vol. 264, pp. 745-748, doi: 10.1016/s0021-9258(19)85005-6.
2. Ducruix A., Guilloateau J.P., Riès-Kautta M., Tardieu A. Protein interactions as seen by solution X-ray scattering prior to crystallogenesis // Journal of Crystal Growth, 1996, vol. 168, pp. 28-39, doi: 10.1016/0022-0248(96)00359-4.
3. Hofmeister F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze // Archiv fuer Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 1888, vol. 24, pp. 247-260.
4. Kovalchuk M.V., Blagov A.E., Dyakova Y.A. et al. Investigation of the Initial Crystallization Stage in Lysozyme Solutions by Small-Angle X-ray Scattering // Crystal Growth & Design, 2016, vol. 16, pp. 1792-1797, doi: 10.1021/acs.cgd.5b01662.
5. Marchenkova M.A., Volkov V.V., Blagov A.E. et al. In situ study of the state of lysozyme molecules at the very early stage of the crystallization process by small-angle X-ray scattering // Crystallography Reports, 2016, vol. 61, pp. 5-10, doi: 10.1134/S1063774516010144.
6. Boikova A.S., Dyakova Y.A., Il'ina K.B. et al. Small-angle X-ray scattering study of the influence of solvent replacement (from H₂O to D₂O) on the initial crystallization stage of tetragonal lysozyme // Crystallography Reports, 2017, vol. 62, p. 837, doi: 10.1134/S1063774517060074.
7. Marchenkova M.A., Kuranova I.P., Timofeev V.I. et al. The binding of precipitant ions in the tetragonal crystals of hen egg white lysozyme // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2020, vol. 38, pp. 5159-5172, doi: 10.1080/07391102.2019.1696706.
8. Kordonskaya Y.V., Timofeev V.I., Dyakova Y.A., Marchenkova M.A., Pisarevsky Y.V., Podshivalov D.D., Kovalchuk M.V. Study of the Behavior of Lysozyme Oligomers in Solutions by the Molecular Dynamics Method // Crystallography Reports, 2018, vol. 63, doi: 10.1134/S1063774518060196.
9. Kordonskaya Y.V., Marchenkova M.A., Timofeev V.I., Dyakova Y.A., Pisarevsky Y.V., Kovalchuk M.V. Precipitant ions influence on lysozyme oligomers stability investigated by molecular dynamics simulation at different temperatures // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2021, vol. 39, pp. 7223-7230, doi: 10.1080/07391102.2020.1803138.
10. Kordonskaya Y.V., Timofeev V.I., Dyakova Y.A., Marchenkova M.A., Pisarevsky Y.V., Kovalchuk M.V. Free energy change during the formation of crystalline contact between lysozyme monomers under different physical and chemical conditions // Crystals, 2021, vol. 11, doi: 10.3390/cryst11091121.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ НА ИЗГИБНУЮ ЖЕСТКОСТЬ АКТИНОВОЙ НИТИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ **Study of the Effect of Actin-Binding Proteins on the Bending Stiffness of Actin Filament Using the Optical Trap Method**

Набиев С.Р.¹, Никитина Л.В.¹, Матюшенко А.М.², Щепкин Д.В.¹, Копылова Г.В.¹

¹ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, РФ, salavatik2003@gmail.com

² Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва, РФ

Для обеспечения сократительной функции мышц важна стабильность тонкой нити, в поддержании которой принимают участие актин-связывающие белки тропомиозин и тропомодулин (Tmod). Известно, что наличие регуляторного белка тропомиозина на актиновой нити увеличивает её жесткость. Тропомодулин представляет собой актин-кэпирующий белок, который связывается с минус-концом актиновой нити, предотвращает её разборку, регулирует её длину и определяет её стабильность. В сократительном аппарате поперечно-полосатых мышц экспрессируется две изоформы тропомодулина – Tmod1 и Tmod4. Изоформа Tmod1 экспрессируется в миокарде, и обе изоформы экспрессируются в быстрых скелетных мышцах. Используя метод оптической ловушки, проанализировано влияние актин-связывающих белков, тропомиозина и тропомодулина (изоформ Tmod1 и Tmod4), на изгибную жесткость актиновой нити. Обнаружено, что присутствие регуляторных белков тропомиозин и тропонина на актиновой нити увеличивает её изгибную жесткость. Изоформы тропомодулина по-разному влияли на неё. Изоформа Tmod4 уменьшала изгибную жесткость тонкой нити, реконструированной из актина, тропонина и тропомиозина, а изоформа Tmod1 не влияла на неё. Таким образом, изоформы тропомодулина специфически взаимодействуют с актином и тропомиозином тонкой нити, что может иметь значение для реализации сократительной функции разных типов поперечно-полосатых мышц.

ВЛИЯНИЕ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ОДИНОЧНОГО АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МИОКАРДЕ

Effects of Cardiac Myosin-Binding Protein C on the Characteristics of a Single Actin-Myosin Interaction in the Myocardium

Набиев С.Р., Копылова Г.В., Щепкин Д.В.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, РФ, salavatik2003@gmail.com

Сокращение миокарда является результатом взаимодействия миозина, составляющего толстую нить, с актином, образующим основу тонкой нити, и регулируется кальцием через регуляторные белки тропонин и тропомиозин. Недавно было установлено, что в регуляции актин-миозинового взаимодействия, кроме регуляторных белков, принимает участие сердечный миозин-связывающий белок-С (сМуВР-С). сМуВР-С является одним из интегральных белков саркомера кардиомиоцита, который имеет сайты связывания с основными белками саркомера, миозином, актином и тропомиозином. сМуВР-С контролирует количество миозиновых головок, взаимодействующих с тонкой нитью, и участвует в её активации. В работе исследовано влияние сМуВР-С на характеристики одиночного актин-миозинового взаимодействия, размер шага миозина и продолжительность взаимодействия, используя метод оптической ловушки. Сердечный миозин экстрагировали из миокарда левого желудочка кролика, актин выделяли из быстрых скелетных мышц кролика, а сМуВР-С получали из миокарда левого желудочка курицы. сМуВР-С добавляли к сердечному миозину в физиологическом соотношении 1:5. В *in vitro* подвижной системе обнаружено, что добавление сМуВР-С замедляет скольжение актина по миозину на 30%. С помощью оптической ловушки показано, что сМуВР-С не влияет на величину рабочего шага миозина, но увеличивает продолжительность его взаимодействия с актиновой нитью. Полученные результаты говорят о прямом влиянии сМуВР-С на одиночное актин-миозиновое взаимодействие.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФИЦИНА НА МАТРИЦЕ ПОЛИ-1-ВИНИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛА

Immobilization of Ficin on poly-1-vinyl-1,2,4-triazole

Пайметьева Д.С.¹, Дубовицкая А.Н.¹, Холявка М.Г.^{1,2}, Лавлинская М.С.^{1,2}, Сорокин А.В.^{1,2}, Артюхов В.Г.¹

¹ Воронежский государственный университет, г. Воронеж, РФ, pay.dar@yandex.ru

² Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ

На сегодняшний день одной из ключевых тенденций в развитии пищевой промышленности является использование ферментных препаратов. В частности, широкое применение находят эндопротеазы, расщепляющие пептидные связи внутри белковой молекулы. Одним из перспективных ферментов в данном направлении является фицин, впервые выделенный из плодов, листьев и стеблей растения рода *Ficus*. Он применяется в сыроделии, обладает высокой створаживающей активностью, используется для «смягчения» мясных продуктов и улучшения качества мяса [2-3].

Ферменты – это катализаторы, имеющие в основном белковую природу. Они проявляют высокую активность в достаточно узком диапазоне температуры, рН среды или концентрации химических агентов. Под воздействием данных факторов могут происходить необратимые изменения в структуре фермента, что приводит к потере его функциональной активности. Иммунизация энзимов на нерастворимых носителях способствует повышению их устойчивости к тепловой денатурации и колебаниям значений рН среды, а также к ряду других факторов [2].

В нашей работе в качестве матрицы для иммобилизации фицина мы выбрали синтетический полимер поли-1-винил-1,2,4-триазол (ПВТр), синтезированный на кафедре высокомолекулярных соединений и коллоидной химии ВГУ. Это – азотсодержащий гетероциклический полимер, который обладает управляемым комплексом ценных свойств, таких как высокая гидрофильность, способность к комплексообразованию, растворимость в диполярных органических растворителях, химическая стабильность, биосовместимость и термостойкость [1].

В качестве стабилизатора системы фермент-носитель нами был выбран двухатомный фенол – резорцин. Известно, что он стабилизирует структуру белков за счет формирования водородных связей и гидрофобных взаимодействий [4].

Целью работы являлось изучение каталитических свойств фицина, иммобилизованного на поли-1-винил-1,2,4-триазоле с добавлением резорцина и в его отсутствие.

Иммобилизация фицина на матрицу поли-1-винил-1,2,4-триазола проводилась в соотношении 3 мг фермента на 100 мг носителя. Раствор энзима готовился в 7% растворе ПВТр, в качестве иммобилизационной среды был выбран глициновый буфер со значением рН 10.0. Часть препаратов выступала в качестве контрольных, другая часть была приготовлена с добавлением 1% раствора резорцина в соотношении 1:1. Инкубация проводилась в течение 20 минут при температуре 37°C, а затем – при комнатной температуре до полного высыхания препарата.

Далее измеряли эстеразную активность фермента по субстрату *N*- α -бензоил-*DL*-аргинин-*n*-нитроанилиду (BAPNA) с добавлением в реакционную смесь цистеина. После чего определяли оптическую плотность раствора при длине волны 410 нм. Метод основан на том, что фермент активируется цистеином и расщепляет BAPNA, вследствие чего образуется 4-нитроанилин (окрашенный продукт), количество которого служит мерой активности фермента.

В ходе проведенных экспериментов было выявлено, что активность свободного фицина составляет 69 ± 2 ед/мл. Активность фермента, иммобилизованного на поли-1-винил-1,2,4-триазоле, составила $8 \pm 0,5$ ед/мл, что представляет собой 11% от каталитической способности нативного энзима. При добавлении в смесь резорцина активность фермента значительно повысилась и составила 31 ± 2 ед/мл, что соответствует 45% от значения исходной активности свободного фицина. Таким образом, было установлено, что при добавлении резорцина в иммобилизационную среду активность фермента снижается в меньшей степени. Это позволяет нам сделать вывод о том, что поли-1-винил-1,2,4-триазол является перспективным носителем для иммобилизации ферментов в присутствии резорцина.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.

1. Поздняков А.С. Полифункциональные (со) полимеры 1-винил-1, 2, 4-триазола и нанокompозиты на их основе: дис. Иркутск: автореф. дис... канд. хим. наук, 2011.
2. Холявка М.Г. Практикум по биотехнологии: иммобилизованные биологические объекты в системе лабораторных работ. Воронежский государственный университет. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017, 161 с.
3. Aider M. Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates // JDS Communications, 2021, vol. 2, no. 5, pp. 233-237.
4. Lobachevskaya O.V. Reaction of Sulfhydryl Groups of Egg Albumin with Iodine // Украинский биохимический журнал, 1960, vol. 32, no. 4, p. 528.

ВЛИЯНИЕ МИЛЛИМЕТРОВЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ВОЛН НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Effect of Millimeter Electromagnetic Waves on Lipid Peroxidation in Human Blood Erythrocytes *in vitro*

Погосян Г. А.В., Шагинян М.А., Микаелян М.С.

Ереванский государственный университет, г. Ереван, Армения, g.poghosyan.yusu@am

Электромагнитные волны биосферы являются постоянным внешним фактором, воздействующим на живые организмы [1]. В последние десятилетия интенсивность этих волн растет, в связи с ростом числа искусственных источников электромагнитных волн, что делает вполне актуальным исследование возможных

последствий влияния электромагнитных волн миллиметрового диапазона (ЭМВ ММ) на биологические системы. Ключевая роль в метаболизме организма принадлежит крови и прежде всего эритроцитам. Ранее показано, что влияние ММ ЭМВ приводит к изменению различных физико-химических параметров крови – перекисное окисление липидов красных клеток крови, поверхностный заряд эритроцитов, флуоресценция и термостабильность альбумина и т.д [2, 3]. Однако сведения о влиянии ЭМВ ММ на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточной системы крови, в частности эритроцитов, достаточно противоречивы [4].

В данной работе проведено изучение влияния ММ ЭМВ на ПОЛ (содержание малонового диальдегида-МДА) мембран эритроцитов крови человека. В экспериментах использовали кровь человека из банка крови. Гепаризированную кровь разделяли на опытные и контрольные образцы, которые содержались в одинаковых температурных условиях. Образцы крови облучали ЭМИ с частотой 41,8 ГГц с продолжительностью 10, 20 и 30 мин. Выбор частоты основан на том, что электромагнитные волны в 41,8-42,2 ГГц интервале имеют ярко выраженный биологический эффект [5]. После облучения кровь разделяли центрифугированием. Эритроциты выделяли в градиенте плотности фиколл-верографин с последующим отмыванием забуференным физиологическим раствором. В качестве источника экспозиции использовали генератор Г4-141 (“Исток”, Россия) с областью рабочих частот 37,5-53,3 ГГц, при плотности потока энергии 0,6 мВт/см².

В результате проведенных экспериментов было установлено изменение ПОЛ эритроцитов в зависимости от длительности ЭМ экспозиции. При облучении суспензии эритроцитов в течении 10 мин. ЭМИ с частотой 41,8 ГГц не наблюдалось статистически достоверных различий содержания МДА по сравнению с контролем. Более длительные 20-и и 30-минутные экспозиции ЭМИ индуцировали статистически достоверное увеличение концентрации МДА ($P < 0,02$) в эритроцитах.

Результаты, представленные в данной работе, показывают, что воздействие ЭМИ нетепловой интенсивности индуцирует изменения метаболизма клетки, что говорит о стрессовом воздействии фактора на клетки красной крови.

1. Ongel K., Gumral N., Ozguner F. The potential effect of electromagnetic field: A review. // Cell membrane and free radical research, 2009, no. 1, pp. 85-89.

2. Погосян Г.А., Вардеванян П.О., Неркарарян А.В., Микаелян М.С. Изучение перекисного окисления липидов эритроцитов крови крыс облученной ЭМИ КВЧ IN VITRO // Научные труды 8-го Международного Конгресса “Сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине”, 2018, т. 8, с. 142-143.

3. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Shahinyan M.A., Mikaelyan M.S. Influence of millimeter electromagnetic waves on fluorescence of water-saline solutions of human serum albumin. // J. of Appl. Spectr., 2016, vol. 83, no. 3, pp. 486-489.

4. Мазуренко Р.В., Махно С.Н., Горбик П.П. и др. Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения на активность процессов перекисного окисления и антиоксидантной активности крови *in vitro* // Биомед. радиоэлектроника, 2009, № 2, с. 11-15.

5. Казаринов К. Д., Щелконогов В. А., Чеканов А. В. Изучение чувствительности клеток крови человека к микроволновому излучению// Ж. Радиоэлектроники, 2019, № 8, doi: 10.30898/1684-1719.2019.8.10.

ВХОД Ca^{2+} ИЗВНЕ УЧАСТВУЕТ В ТРАНСДУКЦИИ СИГНАЛОВ ВКУСОВЫМИ КЛЕТКАМИ ТИПА II

Ca^{2+} Input is Involved in Taste Cells Type II Signal Transduction

Черкашин А.П., Фадеев П.Ю., Хохлов А.А., Рогачевская О.А.

Институт биофизики клетки РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино, РФ, o.rogachevskaia@gmail.com

Периферическая вкусовая система представляет собой вкусовые клетки нескольких типов (I-IV), собранные в компактные образования – вкусовые почки – в эпителии языка. Основными хемосенсорными клетками вкусовой почки, распознающими горькое, сладкое и аминокислоты являются вкусовые клетки типа II. Современная концепция вкусовой трансдукции предполагает следующую цепочку событий: вкусовой стимул связывается с T1/T2 рецептором, что стимулирует фосфолипазу PLC β 2 и приводит к гидролизу PIP2 до двух вторичных медиаторов IP3 и DAG. Далее, IP3 активирует IP3 рецепторы, инициируя выброс депонированного Ca^{2+} с последующей активацией Ca^{2+} -зависимых катионных каналов TRPM5, деполяризацией плазмалеммы, генерацией потенциалов действия, открытием потенциал-зависимых каналов CALHM1 и выбросом АТР (неканонический механизм нейротрансдукции без формирования классических химических синапсов) [1,2]. Согласно этому DAG может считаться побочным продуктом, однако в других сенсорных системах внутриклеточные Ca^{2+} -сигналы генерируются и за счет входа наружного Ca^{2+} через ионные каналы, например, в сенсорных нейронах вомероназального органа в процессе трансдукции происходит вход наружного Ca^{2+} через DAG-активируемые каналы TRPC2 [3]. Таким образом, можно предположить, что для передачи информации о вкусовом стимуле так же необходим вход Ca^{2+} извне, регулируемый при участии DAG, что было проверено нами экспериментально на вкусовой ткани языка мыши.

Исследования проводились в трех типах экспериментов – на уровне вкусового эпителия в модифицированной камере Уссинга с регистрацией сигнала от люциферин-люциферазной смеси при помощи фотометра [4]; на вкусовых почках и клетках методом микрофотометрии с использованием Ca^{2+} зондов; в электрофизиологических экспериментах на одиночных идентифицированных клетках. Электрофизиологические исследования показали, что из вкусовых клеток, генерировавших входящие токи в ответ на аппликацию горьких стимулов, большинство также ответило на OAG (проникающий аналог DAG) генерацией входящих токов. Наличие токовых ответов на OAG, сходных по профилю и кинетике с ответами на вкусовой стимул, говорит об участии DAG во вкусовой трансдукции и функционировании на апикальной поверхности вкусовых клеток II типа DAG-активируемого Ca^{2+} -канала. Была продемонстрирована и зависимость амплитуды входящего тока от концентрации наружного Ca^{2+} . В микрофотометрических экспериментах мы наблюдали Ca^{2+} ответы вкусовых клеток типа II в ответ на аппликацию горьких стимулов, причем, эти Ca^{2+} -ответы сильно зависели от концентрации наружного Ca^{2+} и развивались медленно в течение 50-100 с. Результаты экспериментов на вкусовом эпителии соответствуют картине, наблюдаемой на изолированных вкусовых почках и клетках – аппликация вкусовых стимулов в растворе с пониженным содержанием ионов Ca^{2+} приводила к уменьшению секретирующегося АТР, детектируемого фотометром при регистрации сигнала от люциферин-люциферазной смеси. Таким образом, наша гипотеза об участии входа Ca^{2+} извне в передаче информации о вкусовых стимулах подтвердилось как на уровне отдельных клеток, так и на уровне изолированного эпителия.

Мы предполагаем, что в процессе трансдукции вкусового сигнала IP3-управляемое высвобождение Ca^{2+} из депо формирует начальный Ca^{2+} -сигнал, обеспечивающий быструю активацию TRPM5 и формирующий начальную фазу рецепторного потенциала. Далее, DAG-регулируемый вход Ca^{2+} извне через каналы TRPC2, возможно, в комбинации с SOC-каналами, продлевает состояние повышенной концентрации ионов Ca^{2+} внутри клетки для сохранения активности TRPM5, тем самым определяя продолжительность рецепторного потенциала и передачу сигнала о вкусовом стимуле.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-01035.

1. Taruno A., Nomura K., Kusakizako T., Ma Z., Nureki O., Foskett J.K. Taste transduction and channel synapses in taste buds // Pflugers Archiv, 2021, vol. 473, doi: 10.1007/s00424-020-02464-4.

2. Romanov R.A., Lasher R.S., High B. et al. aChemical synapses without synaptic vesicles: Purinergic neurotransmission through a CALHM1 channel-mitochondrial signaling complex // *Science Signaling*, 2018, vol. 11, no. 529, doi: 10.1126/scisignal.aao1815.

3. Lucas P., Ukhanov K., Leinders-Zufall T., Zufall F. A Diacylglycerol-Gated Cation Channel in Vomeronasal Neuron Dendrites Is Impaired in TRPC2 Mutant Mice: Mechanism of Pheromone Transduction // *Neuron*, 2003, vol. 40, no. 3, doi: 10.1016/s0896-6273(03)00675-5.

4. Хохлов А.А., Рогачевская О.А. Ex vivo мониторинг стимул-зависимой секреции АТФ вкусовыми клетками // *Биологические мембраны*, 2021, т. 38, № 3, doi: 10.31857/S023347552103004X.

АЗУЛЕНА ЛИСТОВОЙ ПОВЕРХНОСТИ КАК ЗАЩИТНЫЙ ОПТИЧЕСКИЙ ФИЛЬТР Azulenes of Leaf Surface as Protective Optical Filter

Рощина В.В.

Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, ул. Институтская, 3, г. Пущино, Московская обл., РФ,
roshchinavic@mail.ru

Исследованы реакции на озон поверхностных клеток листьев с голубой или серебристой окраской у растительных видов, по литературным данным устойчивых к озону - ивы белой *Salix alba* L., облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* L., клевера ползучего *Trifolium repens* L, райграса пастбищного *Lolium perenne* Engels. Показано, что поверхностные слои кутикулы и клеточной стенки этих растений содержали азулени. В спектрах поглощения листьев отмечены характерные для этих синих пигментов максимумы соответственно 580-585 нм и 608-610 нм, а в спектрах флуоресценции - 410 или 430 нм. Предполагается [1,2], что именно эти пигменты могут быть первичными мишенями для озона у видов с синей или серебристой окраской листьев, и их антиоксидантные свойства определяют низкую чувствительность к озону. В этом случае синие пигменты служат защитным оптическим фильтром от ультрафиолетовой радиации и озона, образуемого с ее участием.

Таблица 1. Спектральные характеристики листовой поверхности видов до и после 10 минутной экстракции азуленов 96 % этанолом из неповрежденных целых листьев исследованных растений

| Вид растения | Максимум в спектре поглощения, нм | Оптическая плотность в максимуме | Максимум в спектре поглощения, нм | Оптическая плотность в максимуме |
|-------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| | До экстракции | | После экстракции | |
| <i>Lolium perenne</i> | 585 | 0.85± 0.06 | 590-600 | 0,600± 0,10 |
| <i>Trifolium repens</i> | 585 | 1.615± 0.09 | 585 | 1,098± 0.08 |

1. Рощина В.В., Кучин А.В., Куньев А.Р., Солтани Г.А., Хайбулаева Л.М., Призова Н.К. Присутствие азуленов на поверхности растительных клеток как тест на чувствительность к озону // *Биологические мембраны*, 2022, т. 39, № 1, с. 54-62

2. Roshchina V.V. Possible Role of Azulene in Plant Life // *Experiments with Models. SMP Enviro.Sci.Technol.* vol. 1, pp.1-10.

УЧАСТВУЕТ ЛИ NO-ЕРГИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ В РЕГУЛЯЦИИ СВЕТОВОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СЕТЧАТКИ LYMNAEA STAGNALIS?

Is the No-Ergic Mechanism Involved in The Regulation of Light Sensitivity of The Retina of *Lymnaea Stagnalis*?

Доминова И.Н., Сафонов М.В., Жуков В.В.

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, г. Калининград, РФ,
irinadominova@gmail.com , mikhailsafonov96@mail.ru, valerzhukov@mail.ru

Сетчатка камерного глаза прудовой улитки *Lymnaea stagnalis* содержит многочисленные микровиллярные фоторецепторы, которые обеспечивают довольно высокую светочувствительность и пространственное разрешение зрения. Сама сетчатка получает эфферентную иннервацию, в том числе и волокнами, которые содержат FMRF-амид [1]. Экзогенный тетрапептид угнетает электрические реакции глаза моллюска на свет [2]. Основываясь на данных о том, что FMRF-амид может быть субстратом для NO-синтазы (NOS) при генерации NO [3], а также иммунохимическом обнаружении этого фермента в сетчатке *Helix pomatia* [4], мы предприняли поиск свидетельств NO-ергического механизма в сетчатке *L. stagnalis*. С этой целью искали транскрипцию генов

NOS в сетчатке и оценивали влияние на элетроретинограмму (ЭРГ) изолированного глаза доноров NO: S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин (SNAP) и нитропруссид натрия (SNP).

В поисках транскриптов NOS из тканей глаза и мозга была выделена РНК и проведена qPCR. Последовательности праймеров были взяты из работ [5,6]. Уровни транскрипции (УТ) двух изоформ генов NOS и анти-NOS межгенной области были нормализованы к *Gapdh* и рассчитаны методом 2ddCt. Статистический анализ проводили с помощью одностороннего ANOVA с post hoc тестом Тьюки ($p < 0,05$). УТ NOS1 и NOS2 были значительно повышены в глазу по сравнению с мозгом, но анти-NOS были близкими в обоих образцах.

Аппликация 0,1 mM SNAP обратимо уменьшала ЭРГ изолированного глаза улитки. Этот эффект развивался в течение 30 минут после применения препарата и сохранялся несколько часов после возвращения к физиологическому раствору. Эффекты SNP 0,1–1 mM оказались менее однозначными: возрастание амплитуды ЭРГ после аппликации вещества сменялось ее небольшим снижением.

Хотя полученные результаты являются предварительными, они позволяют предположить, что NO участвует в модуляции процессов в сетчатке.

1. Tuchina O.P., Zhukov V.V., Meyer-Rochow V.B. Distribution of serotonin and FMRF-amide in the brain of *Lymnaea stagnalis* with respect to the visual system // *Dongwuxue Yanjiu*, 2012, vol. 33, no. (E1-2), pp. e1-12, doi: 10.3724/SP.J.1141.2012.01-02e1.

2. Жуков В.В., Федоренко А.Д. FMRF-амид уменьшает электрические ответы глаза *Lymnaea stagnalis* на световую стимуляцию // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*, 2016, т. 52, № 5, с. 373-376.

3. Röszer T., Czimmerer Z., Szentmiklósi A.J., Bánfalvi G. Nitric oxide synthesis is blocked in the enteral nervous system during dormant periods of the snail *Helix lucorum* // *Cell Tissue Res.*, 2004, vol. 316, no. 2, pp. 255-262, doi: 10.1007/s00441-004-0870-1.

4. Huang S., Kerschbaum H.H., Engel E., Hermann A. Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail, *Helix pomatia* // *J Neurochem.*, 1997, vol. 69, no. 6, pp. 2516-2528, doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.69062516.x.

5. Korneev S.A., Piper M.R., Picot J., Phillips R., Korneeva E.I., O'Shea M. Molecular characterization of NOS in a mollusc: expression in a giant modulatory neuron // *J Neurobiol.*, 1998, vol. 35, no. 1, pp. 65-76, doi: 10.1002/(sici)1097-4695(199804)35:1<65::aid-neu6>3.0.co;2-9.

6. Korneev S., O'Shea M. Evolution of nitric oxide synthase regulatory genes by DNA inversion // *Mol. Biol. Evol.*, 2002, vol. 19, no. 8, pp. 1228-1233, doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004183.

О ВОЗМОЖНЫХ ПРИЧИНАХ ХИРАЛЬНЫХ СООТВЕТСТВИЙ В ФАРМАКОЛОГИИ On the Possible Causes of Chiral Correspondences in Pharmacology

Семенова Е.В., Белова Е.В.

Московский государственный университет, г. Москва, РФ, *k.semenova99@gmail.com*

В ахиральном окружении энантиомеры лекарственных средств обладают одинаковыми физическо-химическими свойствами, но в хиральном окружении энантиомеры могут проявлять себя по-разному [1]. Это связано с тем, что определенную фармакологическую активность препарат приобретает в результате его взаимодействия с различными хиральными мишенями. Примером хиральной среды является человеческий организм, который состоит из таких хиральных структур, как белки, нуклеиновые кислоты и липиды. Поэтому попадая в человеческий организм один энантиомер препарата может обладать желаемым терапевтическим эффектом, в то время как противоположный энантиомер может быть неактивным, менее активным или вызывать серьезные побочные эффекты.

Известно, что в 2008 году среди лекарств, одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), 63% препаратов составили энантиомерно чистые лекарственные средства, 32% представлены ахиральными препаратами и только 5% составили рацематы [2]. Таким образом, видно, что хиральные препараты занимают большую часть рынка лекарственных средств.

Все вышесказанное свидетельствует о том, что хиральность является одним из ключевых свойств молекулы, которое необходимо учитывать при разработке и использовании лекарственных средств. Учитывая важность вопроса хиральности лекарственных препаратов нами была составлена подборка, включающая в себя 100 хиральных лекарств, для которых на основании большого количества литературных источников была проведена классификация энантиомеров по их биоактивности. Проведенный анализ лекарственных препаратов с позиции хиральности позволил установить, что для 55 препаратов из 100 терапевтически активным является S-энантиомер. Также было установлено, что среди изомеров, вызывающих побочные эффекты, чаще встречаются R-энантиомеры лекарственных средств: 12 R-энантиомеров из 100 и 4 S-энантиомера из 100 ответственны за побочные эффекты.

В результате данной классификации нами было установлено соответствие между энантиомерами препаратов и их биоактивностью. Следующим этапом исследования является поиск причины получившихся соответствий. Важно установить, чем обусловлено различие в биоактивности энантиомеров: их взаимодействием

с мишенью препарата, с ферментами метаболизма или с иными факторами. Основная сложность состоит в том, что в настоящий момент нет возможности установить соответствие между хиральностью активного энантиомера и хиральностью белка, с которым взаимодействует лекарство, так как оценка хиральности всей белковой глобулы пока невозможна в силу отсутствия метода.

В работе представлен расчет энергии связывания противоположных энантиомеров с макромолекулами-мишенями, а также рассмотрены метаболические пути хиральных лекарственных препаратов для более ясного понимания причины различия в биоактивности энантиомеров. В дальнейшем результаты данного исследования могут быть использованы в разработке лекарственных средств.

1. Hancu G., Modroiu A. Chiral Switch: Between Therapeutic Benefit and Marketing Strategy // *Pharmaceuticals* (Basel), 2022, vol. 15, no. 2, doi: 10.3390/ph15020240.

2. Lin G.-Q., Zhang J.-G., Cheng J.-F. Overview of Chirality and Chiral Drugs // *In Chiral Drugs* (eds G.-Q. Lin, Q.-D. You and J.-F. Cheng), 2011, doi: 10.1002/9781118075647.ch1.

ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТЬ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ АЛАНИНА И ВАЛИНА, ПРИГОТОВЛЕННЫХ ИТЕРАЦИОННЫМ МЕТОДОМ РАЗБАВЛЕНИЯ С ПОСЛЕДУЮЩИМ ИНТЕНСИВНЫМ МЕХАНИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ

Conductivity of Aqueous Solutions of Alanine and Valine Prepared by the Iterative Dilution Method Followed by Intensive Mechanical Impact

Семенова Е.В., Лобышев В.И.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ, lobyshev@yandex.ru

Работа является развитием решения проблемы влияния малых и сверхмалых концентраций на биологические системы в части изучения физико-химических особенностей растворов, приготовленных по технологии многократных последовательных разбавлений с интенсивным механическим перемешиванием на каждой стадии разбавления [1]. Ранее на примере широко распространенного противовоспалительного и анальгезирующего средства – диклофенака было обнаружено существование немонокотонной зависимости электропроводности разбавленных водных растворов диклофенака от числа итераций при последовательных сотенных разбавлениях, сопровождающихся активным встряхиванием. Немонотонная зависимость наблюдалась также при числе итераций разбавления по этой технологии растворов, в которых понятие концентрации исходного вещества теряет смысл [2]. Электропроводность и диэлектрическую проницаемость измеряли с помощью прецизионного анализатора импеданса Wayne Kerr 65120 BD1 в широком диапазоне частот 20 Гц – 10 МГц. Важно отметить, что релаксационные процессы, а также инкремент диэлектрической проницаемости в исследованных растворах не наблюдали, что говорит об отсутствии самоорганизующихся мезочастиц с большими дипольными моментами. Измерения электропроводности на низких частотах определяется свойствами двойного электрического слоя на границе раздела металл-электролит даже в дистиллированной воде, но не объемной характеристикой жидкости, поэтому дальнейшие измерения электропроводности проводили на частоте 100 кГц, где влияние двойного слоя пренебрежимо мало.

По вышеописанной технологии готовили растворы аминокислот от Sigma-Aldrich: L-аланин (A7627), D-аланин (A7377), L-валин (V0500), D-валин (V1255). Использовали воду MQ с удельным сопротивлением 18,2 МОм·см. Сначала готовили раствор аминокислоты с концентрацией 0,01 М, затем из этого образца отбирали 0,1 мл, помещали в стеклянный флакон объемом 20 мл и добавляли 9,9 мл воды. Затем этот образец сотенного разбавления подвергали интенсивному встряхиванию и присваивали итерационный номер С1. Следующий образец готовили разбавлением образца С1 с последующей механической обработкой, получая образец С2. Эту процедуру повторяли многократно и получили ряд N раз (до N=33) разбавленных потенцированных образцов в закрытых флаконах, хранившихся в закрытой картонной коробке в комнатных условиях. Для корректного сравнения электрических характеристик L- и D- аминокислот готовили две параллельных серии образцов, т.е. LC1 и DC1, затем LC2 и DC2, и т.д., поскольку, как было показано ранее [3], немонотонные паттерны электропроводности параллельно приготовленных рядов разбавлений одного и того же вещества хорошо коррелируют друг с другом. Хранившиеся образцы повторно измеряли для определения длительной эволюции характеристик растворов, связанных с процессами самоорганизации в растворе.

Как и в случае растворов диклофенака обнаружена сложная немонотонная зависимость проводимости вплоть до N=33, где уже при $N \geq 10$ понятие концентрации растворяемого вещества теряет смысл, что означает несомненную роль технологии приготовления образцов. Отсутствует также инкремент диэлектрической проницаемости во всем диапазоне разбавлений, а вариации диэлектрической проницаемости образцов во времени не превышают 0.1% и являются случайными. Между паттернами проводимости образцов L и D аминокислот наблюдается достоверная корреляция, соответствующая уровню значимости 0,01, что говорит об отсутствии различий электрических характеристик при использованной технологии разбавления. Существенное отличие от всех предыдущих исследований [2-4] состоит в качественно иной эволюционной траектории образцов с растворами аминокислот. Среднее значение электропроводности не возрастало со временем, как в образцах

растворов диклофенака, чистой воды, тяжелой воды, растворов глицерина, но уменьшалась, что полностью противоречит возможности растворения ионов стекла в хранящихся образцах. Обсуждается роль активных форм кислорода и других элементов в наблюдаемом феномене.

1. Лобышев В.И. О проблеме влияния малых концентраций на биологическую активность // Актуальные вопросы биологической физики и химии, 2020, т. 5, № 3, с. 390-398.

2. 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, doi: 10.3103/S1541308X19020067.

3. Lobyshev V.I. Evolution of High-Frequency Conductivity of Pure Water Samples Subjected to Mechanical Action: Effect of a Hypomagnetic Field // Physics of Wave Phenomena, 2021, vol. 29, no. 2, pp. 98-101, 2021, doi: 10.3103/S1541308X21020084.

4. Lobyshev V.I. Electrical Properties of Heavy Water Samples Subjected to Vigorous Shaking During Successive Dilutions // Physics of Wave Phenomena, 2022, vol. 30, no. 3, pp. 141-144.

ВОЗМОЖНОСТИ ТРАНСПОРТИРОВКИ МАГНИТНЫХ МИКРООБЪЕКТОВ РЕШЕТКОЙ ПОЛОСОВЫХ ДОМЕНОВ ПЛЕНКИ ФЕРРИТА-ГРАНАТА Possibilities of Transporting Magnetic Micro-Objects by Lattice of Stripe Domains of Ferrite-Garnet Film

Сирюк Ю.А.¹, Безус А.В.¹, Капшуков Р.А.¹, Кононенко В.В.²

¹ Донецкий национальный университет, г. Донецк, ДНР, juliasiryuk@gmail.com

² Донецкий физико-технический институт им. А.А.Галкина, г. Донецк, ДНР

В последние годы появилось много работ в которых исследуется контролируемый перенос парамагнитных коллоидных частиц по поверхности магнитоодноосных пленок феррита-граната [1].

В данной работе изучены возможности транспортировки магнитных микрообъектов по поверхности полосовой доменной структуры пленки феррита-граната под действием магнитных полей: постоянного, индукция которого нормальна плоскости пленки, и переменного с пилообразным сигналом.

Полосовая доменная структура (ПДС) представляет собой решетку полосовых доменов с антипараллельной намагниченностью, разделенных доменными границами [2]. В силу своей структуры доменные границы генерируют сильные локальные градиенты магнитного поля. В результате этого магнитные микрообъекты притягиваются к доменным границам и визуализируют решетку полосовых доменов.

Для исследования выбрана магнитоодноосная пленка с развитой поверхностью $\langle 111 \rangle$ состава $(YSmLuCa)_3(FeGe)_5O_{12}$, выращенная методом жидкофазной эпитаксии на гадолиний-галлиевой подложке. В качестве микробиологических объектов используются дрожжевые клетки (*Saccharomyces cerevisiae*), магнитомаркированные частицами Fe_3O_4 . Суспензия с магнитомаркированными микрообъектами наносится на поверхность пленки.

Под действием постоянного магнитного поля нормального к поверхности пленки, ширина полосовых доменов изменяется, доменные границы перемещаются, а вместе с ними перемещаются и магнитные микрообъекты.

При определенных параметрах постоянных и переменных магнитных полей наблюдается направленная транспортировка магнитных микрообъектов. Вектор скорости перемещения перпендикулярен длине полосовых доменов.

Актуальность этой работы в том, что исследования могут быть использованы при создании микроустройств, применяемых в разных областях (медицине, химии, биологии, физике и т.д.).

1. Tierno P., Jokansen T.H., Fischer M. Localized and delocalized motion of colloidal particles on a magnetic bubble lattice // Physical Review Letters, 2007, vol. 99, doi: 10.1103/PhysRevLett.99.038303.

2. Сирюк Ю.А., Безус А.В., Капшуков Р.А., Кононенко В.В. Фазовые переходы в полосовой доменной структуре магнитоодноосной пленки феррита-граната // ЖЭТФ, 2021, т. 159, вып. 3, doi: 10.31857/S004445102103010X/

ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ МАГНИТНЫХ МИКРООБЪЕКТОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ОДНООСНОЙ ПЛЕНКИ ФЕРРИТА-ГРАНАТА

Peculiarities of the Behavior of Magnetic Micro-Objects on the Surface of Uniaxial Ferrite-Garnet Film

Сирюк Ю.А.¹, Безус А.В.¹, Капшуков Р.А.¹, Кононенко В.В.²

¹Донецкий национальный университет, г. Донецк, ДНР, juliasiryuk@gmail.com

²Донецкий физико-технический институт им. А.А.Галкина, г. Донецк, ДНР

В настоящее время активно исследуются процессы переноса магнитных частиц над поверхностью доменных структур магнитоодносных пленок феррита-граната [1]. Такие исследования актуальны. Контролируемая транспортировка микрообъектов может быть использована в разных областях: биологии, медицине, химии, физике и т.д.

В данной работе исследуются особенности поведения магнитомаркированных микрообъектов над поверхностью решетчатых цилиндрических магнитных доменов (ЦМД) пленки феррита-граната при изменении внешних магнитных полей. Для исследования выбрана магнитоодноосная пленка с развитой поверхностью <111> состава $(YSmLuCa)_3(FeGe)_5O_{12}$, выращенная методом жидкофазной эпитаксии на гадолиний-галлиевой подложке. Решетка ЦМД создается импульсным магнитным полем, перпендикулярным плоскости пленки. В качестве микробиологических объектов используются дрожжевые клетки (*Saccharomyces cerevisiae*), магнитомаркированные частицами Fe_3O_4 .

Доменные границы ЦМД генерируют сильные локальные градиенты магнитного поля. Магнитные микрообъекты притягиваются к доменным границам и визуализируют гексагональную решетку ЦМД.

В зависимости от параметров внешнего управляющего магнитного поля, вектор индукции которого прецессирует вокруг оси, нормальной к поверхности пленки, в доменной структуре происходят индуцированные фазовые переходы [2]. В связи с этим можно реализовать несколько режимов движения магнитомаркированных клеток над поверхностью пленки с решеткой ЦМД: 1– режим локализованного движения, при котором клетки вращаются вблизи границ ЦМД; 2– режим диффузионного движения, при котором клетки хаотически переходят от одного домена к другому. Параметры как локализованного, так и диффузионного движения зависят от частоты и соотношения нормальной и тангенциальной составляющей внешнего прецессирующего поля.

1. Tierno P., Jokansen T.H., Fischer M. Localized and delocalized motion of colloidal particles on a magnetic bubble lattice // *Physical Review Letters*, 2007, vol. 99, doi: 10.1103/PhysRevLett.99.038303.

2. Сирюк Ю.А., Безус А.В., Бондарь Е.Д., Кононенко В.В. Фазовые переходы в жесткой доменной структуре феррит-гранатовой пленки // *Физика твердого тела*, 2019, т. 61, № 7, doi: 10.21883/FTT.2019.07.47833.338.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЯМР С ПАРАМАГНИТНЫМ ДОПИНГОМ ДЛЯ ОЦЕНКИ АПОПЛАСТНОГО ПЕРЕНОСА ВОДЫ В КОРНЯХ ИНТАКТНЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ

Application of the NMR Method with Paramagnetic Doping to Estimation the Apoplastic Water Transfer in the Roots of Intact Plants under Impact of Abiotic Stresses

Суслов М.А.

Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ Казанский научный центр РАН, г. Казань, РФ,
makscom87@mail.ru

Транспорт воды в растениях является одним из ключевых биофизических процессов, определяющих рост и продуктивность. Согласно композитной модели транспорта воды в корне растений, имеются три параллельных пути транспорта воды и растворенных в ней веществ: апопластный, симпластный и трансклеточный [1]. Предполагается, что в ходе адаптации растений к изменению условий внешней среды и действию абиотических стрессов вклад этих путей в суммарный водный перенос может изменяться. В связи с этим актуальной задачей внутри проблемы исследования транспорта воды в растениях является поиск методов и подходов для неинвазивной оценки вклада путей водного переноса в корне непосредственно при воздействии абиотических стрессов. В настоящей работе предложен методический подход на базе ЯМР с применением парамагнитного комплекса GdDTPA для качественной оценки транспорта воды по апопластному (внеклеточному) пути в корнях интактных растений пшеницы. Данный подход заключается в измерении времён спин-спиновой релаксации намагниченности воды в корне при одновременном инкубировании корней в растворе парамагнитного комплекса Gd-DTPA и воздействии на растения стрессового фактора. В ходе инкубирования корней данный комплекс распространяется только по апопластной системе корня и укорачивает времена релаксации воды апопласта, но при этом GdDTPA не проникает во внутрь клеток и, соответственно, не изменяет времена релаксации

внутриклеточной воды [2]. Таким образом, по скорости снижения времён релаксации намагниченности апопластной воды, которая прямо зависит от интенсивности водного переноса по апопласту, можно определить относительный вклад водного переноса по апопласту корня в ходе стрессового воздействия. В качестве абиотического фактора, предположительно влияющего на перенос воды по апопласту корня, было использовано двукратное повышение концентрации углекислого газа в надземной части растений. С использованием данного методического подхода было показано, что повышение концентрации углекислого газа в зоне листьев растений пшеницы до 800 ppm приводит к снижению скорости водного переноса по апопласту корня в 2-2,5 раза по сравнению с контролем при 400 ppm.

Очевидным преимуществом представленного в работе методического подхода по сравнению с имеющимися методами является то, что данный подход не предполагает повреждение растений, позволяет проводить измерения в динамике непосредственно при действии абиотических стрессов и при этом является менее трудоёмким. В дополнение к этому метод позволяет осуществлять параллельное измерение физиологических параметров в листовой зоне растений, например, скорости транспирации и фотосинтеза, что может представлять ценность при исследовании координации корней и листьев растений в ходе адаптации к абиотическим стрессам.

1. Kim Y.X, Ranathunge K, Lee S., Lee Y., Lee D., Sung J. Composite transport model and water and solute transport across plant roots: an update // *Frontiers in Plant Science*, 2018, vol. 9, no. 193, doi: 10.3389/fpls.2018.00193.

2. Anisimov A.V., Suslov M.A. Estimating the MRI contrasting agents effect on water permeability of plant cell membranes using the 1H NMR gradient technique // *Applied Magnetic Resonance*, 2021, vol. 52, no. 3, pp. 235-246, doi: 10.1007/s00723-021-01313-6.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МОДИФИКАЦИИ ИЗОТОПНОГО D/H СОСТАВА СРЕДЫ НА ПРИРОСТ БИОМАССЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ SHEWANELLA ONEIDENSIS MR-1

Investigation of the Effect of Modification of the Isotopic D/H Composition of the Medium on the Biomass Growth of the Bacterial Culture Shewanella Oneidensis Mr-1

Талько А.А.¹, Волченко Н.Н.¹, Самков А.А.¹, Худокормов А.А.¹, Чоба В.А.¹, Барышев М.Г.^{1,2}

¹ Кубанский государственный университет, г. Краснодар, РФ, talko.alexander@gmail.com

² ФИЦ Южный научный центр РАН, г. Ростов-на-Дону, РФ

Модификация изотопного состава биологических систем может вызывать эффекты, которые сопровождаются изменением метаболизма [1]. Ранее была обнаружена зависимость влияния изотопного состава воды на концентрацию клеточной биомассы нефтеокисляющей актинобактерии *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д при культивировании на жидких питательных средах [2].

При изменении отношения D/H в среде, биологические системы выдают отклик на новый изотопный состав. Часто, при повышении концентрации до 600-800 ppm, биологические объекты показывают ускоренный рост, повышенное деление клеток в целом и т.д. [3]. Эти эффекты рассмотрены с точки зрения теории изотопного резонанса [4]. Изотопный резонанс наблюдается с D/H составом 350-370 ppm [3].

Целью данной работы являлось исследование влияния модификации изотопного D/H состава среды на прирост биомассы бактериальной культуры *Shewanella oneidensis* MR-1. Способность *Shewanella* к восстановлению ионов металлов, дает возможность широкого применения этой бактерии для очистки сточных вод и почв от загрязнений.

Для определения оптической плотности использовался фотометр «MultiscanFC для ИФА-исследований в микропланшетах» при длине волны поглощения 570 нм.

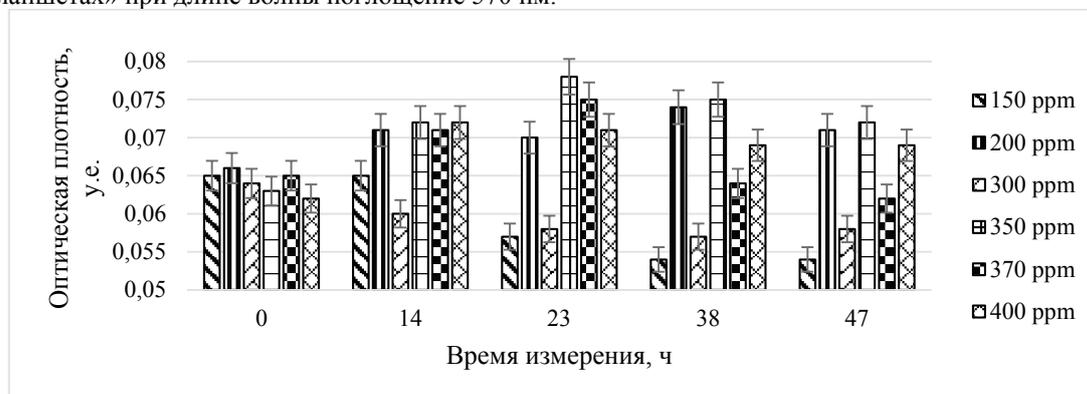


Рисунок 1. Оптическая плотность кювет с *Shewanella* для прироста биомассы, в зависимости от соотношения D/H для основных резонансных концентраций, культивируемой в бульоне «Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-бульон)» в диапазоне от 0 до 47 часов после начала измерений

В результате проведённых исследований можно заметить, что в диапазоне концентраций дейтерия от 150 до 400 ppm в питательной среде микроорганизмов наблюдается немонотонная зависимость отклика бактерий. На полученных графиках видно, что наибольший прирост биомассы наблюдали при концентрации дейтерия в питательной среде с 350 и 370 ppm, что является подтверждением теории изотопного резонанса [3].

Работа выполнена в рамках государственного задания ЮНЦ РАН 122020100351-9.

1. Елкина А.А., Тумаев Е.Н., Басов А.А., Моисеев А.В., Малышко В.В., Барышева Е.В., Чуркина А.В., Джимаков С.С. Механизмы взаимодействия стабильных изотопов с биологическими объектами с учетом нескомпенсированного нейтрона в химических связях // Биофизика, 2020, т. 65, вып. 5, с. 1034-1040.

2. Samkov A.A., Dzhimak S.S., Barishev M.G., Volchenko N.N., Khudokormov A.A., Samkova S.M., Karaseva E.V. The effect of water isotopic composition on *Rhodococcus erythropolis* biomass production // Biophysics, 2015, vol. 60, no. 1, pp. 107-112, doi: 2-s2.0-84928781742.

3. Rodin S., Rebellato P., Lundin A., Zubarev R. Isotopic resonance at 370 ppm deuterium negatively affects kinetic of luciferin oxidation by luciferase // Scientific Reports, 2018, vol. 8, p. 16249, doi: 10.1038/s41598-018-34704-0.

4. Zubarev R. Early life relict feature in peptide mass distribution // Central European J Biol., 2010, vol. 5, pp. 190-196.

НАРУШЕНИЕ СИММЕТРИИ – ФИЗИЧЕСКАЯ ОСНОВА СОВЕРШЕНИЯ «ПОЛЕЗНОЙ РАБОТЫ» БИОЛОГИЧЕСКИМИ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ МАШИНАМИ

Symmetry Breaking is the Physical Basis for the Performance of "Useful Work" by Biological Molecular Machines

Твердислов В.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ, tverdislov@mail.ru

Физической основой функционирования живых систем являются молекулярные машины. Выполнение «полезной работы» составляет существо их биологических функций. Молекулярные машины являются хиральными иерархически организованными устройствами (конструкциями). Они циклически осуществляют преобразование формы энергии за счет смены или переключений симметрий в её хиральных структурных элементах, которые как раз и реализуют в них выделенные «квазимеханические» степени свободы. Феномен хиральности позволяет формировать дискретные хирально знакопеременные иерархии структур в макромолекулярных машинах в процессе фолдинга: начиная с уровня асимметричного углерода в дезоксирибозе и аминокислотах. Ранее нами была выявлена и проанализирована тенденция чередования знака хиральности внутримолекулярных структурных уровней D-L-D-L для ДНК и L-D-L-D для белков. Проявлениями хиральности выступают также спиральность и суперспиральность внутримолекулярных и надмолекулярных структур. Также, в рамках развиваемых представлений, хиральное расщепление свойств элементов структур обеспечивает однонаправленное движение машин по энергетическому циклу за счет нелинейных вентильных свойств спиральных структур. Спиральные структуры могут служить несимметричными, нелинейными, механическими, в том числе переключающими, элементами конструкций молекулярных машин (подобно устройству «храповик-собачка») по вращательным степеням свободы. Предложено определение: «Молекулярная машина есть иерархическое устройство, циклически сопрягающее преобразование формы энергии, необходимое для совершения полезной работы, и череду преобразований или переключений симметрии в её регулярных структурных хиральных элементах, реализующих выделенные «квазимеханические» степени свободы и контролирующих движение системы по заданному направлению цикла».

ИЗМЕНЕНИЯ ЗРИТЕЛЬНОГО ВНИМАНИЯ У ОБЕЗЬЯН ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОТОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОЙ ЭНЕРГИИ

Changes in Visual Attention Induced by High-Energy Proton Irradiation in Monkeys

Терещенко Л.В.¹, Жиганов Л.С.^{1,2}, Кадочникова М.А.¹, Красавин Е.А.³, Латанов А.В.¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ, ltter@mail.ru

² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва, РФ

³ Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, РФ

Модельное исследование воздействия галактических космических лучей на организм человека в дальних космических полетах проведено в экспериментальной модели выполнения обезьянами инструментальной задачи, воспроизводящей простейшие компоненты операторской деятельности человека, после однократного краниального протонного облучения. У двух обезьян *Macaca mulatta* исследовали выполнение зрительно-

моторной задачи, включающей совершение зрительно вызванных саккад в парадигме смены зрительных стимулов Gap-Overlap. Использование этой парадигмы позволяет исследовать высокоуровневые процессы переключения премоторного зрительного внимания в подготовке выполнения саккадических движений глаз и оценить их сохранность после облучения.

В условнорефлекторной инструментальной задаче животных обучали выполнять зрительновызванные саккады к периферическим стимулам в одном из 34-х положений в прямоугольном зрительном поле 39x26 угловых градусов. Время задержки (ВЗ, Gap-интервал) между выключением центрального и предъявлением периферического стимула задавали от 0 до 400 мс с шагом 100 мс – В30, В3100, В3200, В3300 и В3400. Двух предварительно обученных обезьян (О1 и О2) подвергли краниальному облучению протонами (170 МэВ, 3 Гр) на фазотроне ОИЯИ (г. Дубна, Московская обл.). На протяжении трёх месяцев после облучения О1 и четырёх месяцев после облучения О2 три раза в неделю в течение каждого экспериментального дня обезьяны выполняли 600-1000 проб инструментальной задачи с разными комбинациями временных и пространственных параметров предъявления стимулов. По результатам экспериментов анализировали поведенческие показатели работы животных в инструментальной задаче, в т.ч. латентные периоды (ЛП) саккад.

Изменения ЛП саккад у обезьян в зависимости от ВЗ носили индивидуальный характер. У О1 в контрольный период (до облучения) ЛП саккад при В30 составлял 207 ± 40 мс (величина среднего значения \pm стандартное отклонение величины), достигал минимальных значений 147 ± 45 мс при В3200, и опять увеличивался до 175 ± 43 мс при В3400. ЛП саккад у О2 в контрольный период составлял 194 ± 28 мс при В30, затем резко уменьшался до 156 ± 39 мс при В3100 и далее с увеличением ВЗ постепенно снижался до 144 ± 42 мс при В3400.

После протонного облучения обе обезьяны продолжали успешно работать в инструментальной задаче (90-95% правильных реакций) на протяжении всего периода наблюдений. Наибольшие изменения у О1 наблюдались для ЛП саккад при В30 – с 32-го дня после облучения средние значения изменялись в диапазоне 215-243 мс, достоверно ($p < 0,05$, t -критерий) превышая значения контроля. В интервале между 60-м и 73-м днями после облучения наблюдалось общее ухудшение выполнения саккад, что выражалось во временном увеличении средних ЛП саккад для всех величин ВЗ на 15-25 мс. К концу периода наблюдения через три месяца после облучения ЛП саккад только при В30 демонстрировали достоверное превышение контрольных величин у О1. Иной характер изменений наблюдался у О2. ЛП саккад с разными ВЗ на протяжении длительного периода после облучения у неё менялись немонотонно, временами достоверно превышая контрольные значения. После 103-110-го дня и до конца периода наблюдения ЛП саккад всех ВЗ у О2 увеличились на 15-49 мс, достоверно превышая контрольные значения.

Полученные результаты свидетельствуют об устойчивости инструментального поведения обезьян к протонам высоких энергий используемой дозы. При этом мы выявили негативные эффекты протонной радиации на временные характеристики зрительно вызванных саккад, что свидетельствует о нарушении процессов сброса и активации премоторного зрительного внимания в саккадической деятельности обезьян. Предположительно, такие эффекты могут проявиться в ухудшении временных параметров операторских действий человека, что может быть критично для сложной и разнообразной деятельности человека в условиях дальних космических экспедиций.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-29-01027 офи_м), в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500080-8 и частично при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект».

ТЕМПЕРАТУРНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА А Hemoglobin A Temperature Behavior

Тимченко Н.Н., Головченко И.В.

Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ, timchenko_n@list.ru

Широкое применение методов низкотемпературного хранения биологических объектов требует изучения механизмов влияния температуры на молекулярном уровне. С помощью метода спектрофотометрии [1] мы получили в области температур от 6 до 38 °С S-образную температурную зависимость интенсивности в максимуме температурно-пертурбационных дифференциальных спектров при 286 нм гемоглобина донорской крови (HbA) (температура сравнения 10 °С), нормированной на интенсивность спектра поглощения при 10 °С, на которой первый излом наблюдается при 25 °С, второй при 35 °С. Аналогичные S-образные зависимости, по данным других авторов, связаны с наличием конформационного перехода в молекуле белка. Данные наших исследований могут быть применены в модели, использующей альгинатные микросферы для изучения гемоглобина [2]. Наши данные, предположительно свидетельствующие об изменении структуры HbA человека при температуре около 25 °С, вероятно, подтверждаются и другими исследованиями, согласно которым наблюдается изменение коэффициента трансляционной диффузии при 27 °С и времени местожительства между прыжками в прыжковой диффузии при 26,9 °С HbA человека в красных кровяных клетках, определённые с помощью метода динамического светорассеяния. Согласно данным авторов, можно предположить, что до 27 °С

трансляционное движение больше и до 26,9 °С прыжковое движение меньше, а после 27 °С трансляционное движение меньше и после 26,9 °С прыжковое движение больше, возможно, после 26,9 °С движение более локализовано. Вероятно, на трансляционное и прыжковое движение гемоглобина человека в красных кровяных клетках может влиять пространственная организация молекул гемоглобина, способствуя им, или наоборот, мешая им. Например, более компактные молекулы могли бы двигаться более свободно, чем молекулы в более разрыхленном состоянии, если это действительно так, то можно сделать вывод, что после 26,9-27 °С пространственное устройство молекулы гемоглобина А изменяется. Кроме того, изменяется характер увеличения среднеквадратичного отклонения, т.е. гибкости HbA человека при 26 °С, что определено авторами с помощью метода некогерентного нейтронного рассеяния. Также увеличивается изменение энтальпии во время конформационных переходов, демаскирующих внутренние пептидные атомы водорода (PHs) HbA человека между температурами 10-30 °С и 30-40 °С в исследованиях авторов с помощью IR-спектроскопии. Наблюдается изменение аккумуляции общего глобина в синтезе гHb1.1 в *Escherichia coli*. при 24 °С в исследованиях авторов. Также определено изменение структуры гемоглобина земляных червей HbGr между 25 °С и 38 °С для pH 9,0 и 9,3. Для внутриэритроцитарного гемоглобина А донорской крови 5-ти дней хранения нами получены данные о том, что уменьшение содержания оксигемоглобина А менее выражено в интервале температур 6-25 °С, чем в интервале температур 25-43 °С, другими авторами получены результаты об уменьшении содержания оксигемоглобина А при 55 °С по сравнению с 37 °С. Так как после 25 °С происходит более выраженное уменьшение содержания оксигемоглобина А и оксигенация молекулы гемоглобина связана с её конформационным состоянием, то, возможно, при 25 °С начинает проявляться изменение конформационного состояния молекулы гемоглобина А, которое может способствовать более выраженному уменьшению содержания оксигемоглобина А. Особенные свойства HbA, определяющие наличие специальной температуры 25 °С на температурных зависимостях различных параметров гемоглобина, вероятно, связаны с электронной конфигурацией атомов, составляющих молекулу гемоглобина и с их энергией активации.

1. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. К.: Наукова думка, 1981, 208 с.
2. Dessy A. Hemoglobin loaded alginate particles // *J Biomim Biomater Tissue Eng*, 2013, no. 18, p. 102.

ГИДРОГЕЛЕВЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МИКРОЧИПЫ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ - НОВЫЙ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДНК-ФЕНОТИПИРОВАНИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИЧНОСТИ

Hydrogel Biological Microchips of Low Density - A New Highly Sensitive Tool for Dna Phenotyping and Genetic Identification of a Person

Фесенко Д.О.

Институт молекулярной биологии ИМБ РАН, г. Москва, РФ, deferos@yandex.ru

Предложены два новых метода получения поисковой и идентифицирующей информации из следовых количеств ДНК с мест преступлений. Методы основаны на российской оригинальной технологии биологических микрочипов, позволяют анализировать образцы с сильно деградированной ДНК в низкой концентрации, что дает возможность проводить исследование древней ДНК человека.

Поисковый биочип «Phenotype Expert» провести одновременное генотипирование 60 SNP в ходе одностадийной ПЦР с последующей гибридизацией на гидрогелевом биочипе. Пул анализируемых полиморфизмов состоит из 41 SNP, входящих в панель NIrisPlex-S, 4 SNP гена *ABO* (261G>Del, 297A>G, 657C>T, 681G>A), маркеры генов *AMELX* и *AMELY* и 14 SNP-маркеров гаплогрупп Y-хромосомы: В (M60), С (M130), D (CTS3946), Е (M5388), G (P257), Н (M2920), I (U179), J (M304), L (M185), N (M231), О (M175), Q (M1105), R (P224) и Т (M272). Получаемая генетическая информация позволяет прогнозировать фенотип искомого лица по признакам цвета глаз, волос, кожи, группе крови *ABO*, половой принадлежности, геногеографического происхождения по мужской линии. Использование данной фенотипической информации дает возможность составить ориентировку, сформировать круг подозреваемых лиц, определить этническую специфику фамилии преступника (Y-хромосома, как и фамилия, наследуется по мужской линии), ранжировать подозреваемых по вероятности причастности к преступлению и сократить затраты на доказательную идентификацию личности (в случае большого числа подозреваемых, идентификация проводится, начиная с лиц, наиболее соответствующих искомому фенотипу).

В ходе исследовательских испытаний установлено распределение частот аллелей исследуемых полиморфизмов, групп крови *ABO* и гаплогрупп среди Y-хромосомы славян, происхождением преимущественно из центральной России (N=482). Система реагентов «Phenotype Expert» разработана с учетом требований к исследованию сложных объектов и является уникальной по своему потенциалу. Тест-система является открытой и может дополняться новыми генетическими маркерами, связанными с другими поисковыми признаками (рост, возраст, форма мочки ушей и т.д.).

Вторая разработка посвящена созданию метода получения идентифицирующей информации о преступнике с помощью InDel полиморфизмов. Биочип «ChipInDel» позволяет идентифицировать личность и определять кровное родство по 96 локусам в геноме человека, и имеет расчетный дискриминирующий потенциал порядка 10^{-46} . Однонуклеотидные и инсерционно-делеционные полиморфизмы представляют собой альтернативу STR-маркерам, используемым в настоящее время для генетической идентификации личности. Они обладают рядом преимуществ, таких как малый размер, что позволяет успешно анализировать деградированную ДНК, а также на 3-4 порядка более низкую частоту мутирования, что снижает риск ошибок при определении родства. Мы проанализировали распределение аллелей всех известных InDel полиморфизмов в пяти крупнейших мировых популяциях (Европейская, Восточно-Азиатская, Южно-Азиатская, Африканская и Американская), и отобрали маркеры, отвечающие следующим критериям: частота минорного аллеля более 0,30, физическое расстояние между маркерами более 3 млн. п.н., отсутствие во фланкирующих последовательностях полиморфизмов, тандемных повторов и палиндромов, близость AT/GC-соотношения к 1. В результате была получена панель из 106 полиморфизмов со средней частотой минорной аллели для всех пяти популяций 0,39 и вероятностью случайного совпадения 10^{-46} , что на 30 порядков превышает судебные требования к методам генетической идентификации личности. На базе этих полиморфизмов была создана тест-система, состоящая из реагентов для одностадийной ПЦР и биологического микрочипа «ChipInDel». Чувствительность тест-системы составляет менее 50 пг ДНК (5-8 геном-эквивалентов ДНК человека). Метод рассчитан на генотипирование деградированных образцов, что позволяет использовать его для исследования древней ДНК.

ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА КОМПОНЕНТЫ АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ

The Effect of an Impulse Magnetic Field on the Components of the Amylolytic Reaction

Цай А.А., Васильева Т.И., Глушечков В.А., Роденко Н.А.

Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, г. Самара, РФ,
annatsay2001@mail.ru

В настоящее время изучается влияние магнитного поля на биологические системы [1,2]. Механизм воздействия может быть выявлен при действии магнитного поля на изолированные молекулы. Известны данные о влиянии импульсного магнитного поля (ИМП) на ферменты [3] и вещества, обладающие сродством к активному центру [4]. Поскольку ферменты широко применяются в разных областях промышленности и медицины, обработка магнитным полем может использоваться для повышения эффективности биотехнологических процессов. Одним из наиболее важных промышленных ферментов является амилаза.

α -амилазу грибную и картофельный крахмал, представленные порошком, обрабатывали ИМП на магнитно-импульсной установке (МИУ-15), сконструированной в Самарском университете. Крахмал (30 мг) в пенициллиновом флаконе обрабатывали ИМП с напряженностями $0,09 \cdot 10^6$, $0,30 \cdot 10^6$ и $0,45 \cdot 10^6$ А/м, амилазу (10 мг) обрабатывали на той же установке напряженностями $0,03 \cdot 10^6$, $0,09 \cdot 10^6$ и $0,45 \cdot 10^6$ А/м.

Активность α -амилазы определяли стандартным методом [5], используя реакцию Сакса. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью критерия Стьюдента, уровень значимости $P \leq 0,05$.

Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1. Активность амилазы при взаимодействии с облученным и необлученным субстратом (крахмалом) и активность облученной и необлученной амилазы при различных напряженностях импульсного магнитного поля

| Облученный компонент реакции | | Крахмал | | | Амилаза | | |
|--|----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Напряженность магнитного поля, А/м $\cdot 10^6$ | | 0,09 | 0,30 | 0,45 | 0,03 | 0,09 | 0,45 |
| Активность амилазы (г крах/мин $\times 1$ г амилазы) | Опыт | 15,786 \pm 0,017 | 15,046 \pm 0,093 | 15,955 \pm 0,031 | 14,810 \pm 0,120 | 15,517 \pm 0,262 | 15,470 \pm 0,138 |
| | Контроль | 15,884 \pm 0,034 | 14,886 \pm 0,211 | 15,855 \pm 0,281 | 15,056 \pm 0,242 | 15,175 \pm 0,403 | 14,884 \pm 0,765 |

Показано отсутствие достоверных отличий активности амилазы в отличие от контроля при воздействии ИМП на порошок крахмала напряженностями $0,09 \cdot 10^6$, $0,30 \cdot 10^6$ и $0,45 \cdot 10^6$ А/м, а также отсутствие достоверных отличий активности облученной амилазы в отличие от необлученной при воздействии ИМП напряженностями $0,03 \cdot 10^6$, $0,09 \cdot 10^6$ и $0,45 \cdot 10^6$ А/м. Таким образом, крахмал и амилаза устойчивы к действию импульсного магнитного поля при исследуемых параметрах. Устойчивость амилазы к действию магнитного поля предположительно можно объяснить входящими в ее состав ионами кальция.

1. Shine M.B. Guruprasad K.N., AnandAnjali. Enhancement of Germination, Growth, and Photosynthesis in Soybean by Pre-Treatment of Seeds With Magnetic Field // Bioelectromagnetics, 2011, no. 32, pp. 474-484.
2. Минникова Т.В., Денисова Т.В., Колесников С.И. Влияние совместного воздействия переменных магнитных полей промышленной частоты 50 Гц и загрязнения никелем на ферментативную активность и фитотоксичность чернозёма Керченского полуострова // Научный журнал КубГАУ, 2015, № 112(08).
3. Чеботарева Е.Г. и др. Влияние магнитного поля на активность фермента лактатдегидрогеназы // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Серия «Естественные науки», 2006, № 4, с. 80-83.
4. Васильева Т.И., Беляева И.А., Глушечков В.А., Роденко Н.А. Магнитные эффекты антибактериального действия облученного бензилпенициллина натриевой соли // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2018, т. 20, № 5(2), с. 307-316.
5. Кленова Н.А. и др. Спецпрактикум по биохимии животных, растений и микроорганизмов. Учебное пособие. Самара: Изд-во «С-Принт», 2013, 148 с.

ОЦЕНКА ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА МИКРОВОДОРСЛИ *PORPHYRIDIVM PURPUREUM* ПО СПЕКТРУ ПОГЛОЩЕНИЯ КУЛЬТУРЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТАБЛИЧНОГО ПРОЦЕССОРА

Calculation Pigment Composition *Porphyridium Purpureum* Microalgae from the Absorption Spectrum of the Culture using a Spreadsheet Processor

Чернышев Д.Н., Ключкова В.С., Лелеков А.С., Серяк Е.С.

Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ, chernishev@gmail.com

Развитие современных информационных систем позволило существенно сократить сроки проведения экспресс анализов. Определение содержания основных пигментов биомассы микроводорослей достаточно сложная и трудоемкая задача. Актуальна разработка экспресс методов определения содержания пигментов в клетках микроводорослей. Достаточно информативен нативный спектр поглощения культуры, в котором сосредоточена информация о пигментном составе клеток водорослей. Для получения данных сведений необходима математическая обработка спектров. Оптическая плотность культуры – аддитивная величина, общий спектр поглощения складывается из отдельных спектров пигментов. Спектры пигментов представляют собой сумму нескольких максимумов, форма и положение которых определяется хромоформными группами. Поглощение хромоформной группы, относительно максимума соответствует нормальному распределению. Данное свойство дает возможность описать спектр пигмента одной или несколькими кривыми нормального распределения (кривыми Гаусса).

Одним из решений проблемы идентификации и разделения пигментов является разделение нативного спектра математическими методами. В настоящей работе выполнен анализ и разделение перекрывающихся полос пигментов в нативном спектре поглощения культуры с использованием табличного процессора.

В работе использовали культуру *Porphyridium purpureum* (Bory.) Ross, полученную из коллекции ФИЦ Института морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь. Спектры поглощения нативной культуры регистрировались в диапазоне от 400 до 750 нм на спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible с интегрирующей сферой.

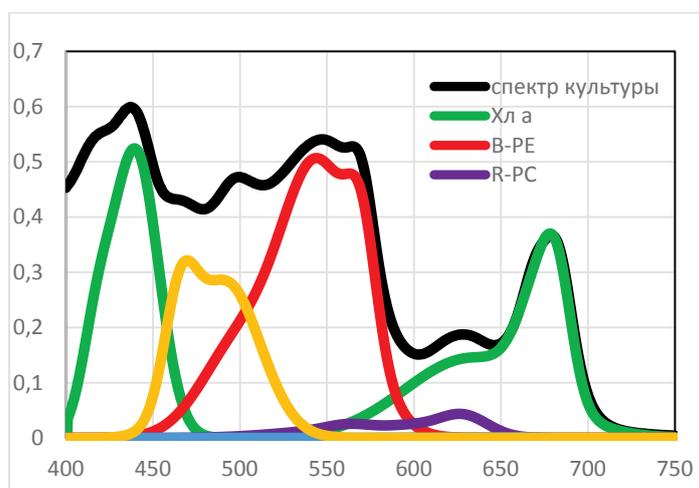


Рисунок 1. Пример разделения спектра поглощения культуры *P. purpureum*.

Спектр поглощения культуры аппроксимировали математической моделью, в которой неизвестными параметрами являются концентрации хлорофилла а, В фикоэритрина, R-фикоцианина, аллофикоцианина и суммарных каротиноидов. Реализация вычислений, выполняющих подбор концентраций пигментов путем минимизации суммы квадратов отклонений между спектром поглощения и его математической моделью, выполнена при помощи табличного процессора с использованием инструмента поиска решения.

Предлагаемый способ математической обработки спектра может быть использован как экспресс метод определения концентрации пигментов в культуре, без выделения пигментов в чистом виде. Так же применение данного метода позволяет быстро оценить вклад пигментов в общий спектр поглощения культуры.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ НЕГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА HMGB1 И HMGB2

Features of Structure and Functions of Non-Histone Chromatin Proteins HMGB1 and HMGB2

Чихиржина Е.В., Старкова Т.Ю., Цимоха А.С., Томилин А.Н., Поляничко А.М.

Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, РФ, *e.chikhirzhina@incras.ru*

Генетический материал эукариотической клетки, хроматин, представляет собой иерархически организованную структуру. Длина ДНК в хроматине составляет примерно 1.5-2 м, в то время как размер ядра – несколько микрон. Вопрос упаковки ДНК в ядре важен не только со структурной точки зрения, но и потому что он тесно связан с функционированием всего генетического аппарата клетки. Несмотря на большое количество работ по этой теме, до сих пор нет полного представления об упаковке ДНК в клеточном ядре. Компактизация молекулы ДНК достигается, в первую очередь, за счет ее взаимодействия с белками. Коровые гистоны (H2A, H2B, H3 и H4) образуют белковую частицу, на которую накручивается ДНК, формируя нуклеосому. Нуклеосомы соединены между собой линкерными участками ДНК, с которыми взаимодействует пятый гистон H1. С этим же участком взаимодействуют белки HMGB1 и HMGB2 - представители большого семейства негистоновых белков с высокой электрофоретической подвижностью. Белки HMGB1 и HMGB2 не обладают специфичностью при взаимодействии с ДНК. Характерной особенностью этих белков является их способность узнавать и связываться с участками ДНК с различными структурными нарушениями. Эти белки активно участвуют не только в регуляции структуры хроматина, но и принимают непосредственное участие во многих клеточных процессах, таких как транскрипция, репарация, рекомбинация и др. Кроме того, в составе многих транскрипционных факторов в качестве ДНК-связывающих элементов были обнаружены HMGB-домены, гомологичные домену белка HMGB1.

На механизм взаимодействия ДНК с ядерными белками влияет, прежде всего, структура белковых молекул, особенности полипептидной цепи каждого белка, связанного с ней. Белки HMGB1 и HMGB2 весьма близки по своей структуре и аминокислотной последовательности. Оба состоят из короткого N-концевого участка, двух ДНК-связывающих доменов А и В, соединенных линкером, и неупорядоченной С-концевой последовательности из остатков глутаминовой и аспарагиновой аминокислот. Проследить за изменениями структуры, как белка, так и самой двойной спирали можно с помощью различных методов, в том числе кругового дихроизма в УФ и ИК диапазоне и спектродетометрического плавления. Наиболее распространенным методом исследования является метод кругового дихроизма в УФ-диапазоне. Этот метод позволяет отслеживать изменения структуры как самих белков, так и их комплексов с ДНК, в том числе оценивать степень α -спиральности белков. Однако этот метод имеет ограниченную применимость для изучения вторичной структуры белков в составе межмолекулярных комплексов. В последние годы все большее внимание привлекает метод ИК-спектроскопии, с помощью которого можно получить более точную и обширную информацию о вторичной структуре белковой молекулы.

В работе исследована первичная и вторичная структуры белков HMGB1 и HMGB2 и особенности их взаимодействия с ДНК. Анализ спектров КД белков показал, что физиологических условиях белок HMGB1 характеризуется более упорядоченной вторичной структурой, чем HMGB2. Вместе с тем, в присутствии спирализующих агентов HMGB2 образует больше α -спиральных участков, чем HMGB1, что указывает на большую конформационную подвижность белка HMGB2. Мы полагаем, что такая подвижность способствует структурной адаптации белка HMGB2 в значительно большей степени, чем для белка HMGB1. Таким образом, несмотря на схожесть их аминокислотной последовательности эти белки существенным образом отличаются друг от друга, что, несомненно, влияет на механизм взаимодействия белков HMGB1 и HMGB2 с их основной мишенью в клеточном ядре – ДНК.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 22-14-00390). Часть работ проводили с использованием оборудования Научного Парка СПбГУ: ресурсных центров «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники» и «Криогенный отдел».

ВЕРИФИКАЦИЯ ТЕОРИИ ИЗОТОПНОГО РЕЗОНАНСА Verification of the Isotope Resonance Theory

Чоба В.А.¹, Талько А.А.¹, Барышев М.Г.^{1,2}

¹ Кубанский государственный университет, г. Краснодар, РФ, lera.choba@mail.ru

² ФИЦ Южный научный центр РАН, г. Ростов-на-Дону, РФ

Стабильные изотопы наиболее важных биологических элементов, влияют на живые организмы [1]. У быстрорастущих видов дейтерий снижает скорость роста. Истощение D₂O отрицательно влияет на скорость биологических процессов. Живые организмы «сопротивляются» изменениям изотопного окружения, предпочитая естественные изотопные содержания. Существование «изотопического резонанса» предполагает, что класс молекул, содержащих С, Н, N и О и подчиняющихся правилу h=2c-n имеет значительно меньшую сложность.

$$\Delta M_m = M_{mono} - M_{nom}$$

где M_{nom} – номинальная (целочисленная) масса: $^{14}\text{N} = 14$.

Изотопический сдвиг массы:

$$\Delta M_{is} = M_{av} - M_{mono}$$

Чтобы устранить зависимость от массы:

$$NMD = 1000 \cdot \frac{\Delta M_m}{M_{nom}}; NIS = 1000 \cdot \frac{\Delta M_{is}}{M_{nom}}$$

где NMD [%] – нормированный моноизотопный дефект, а NIS [%] – нормированный изотопический сдвиг, соответственно. NMD и NIS – массовые параметры для пептидов с произвольным аминокислотным составом.

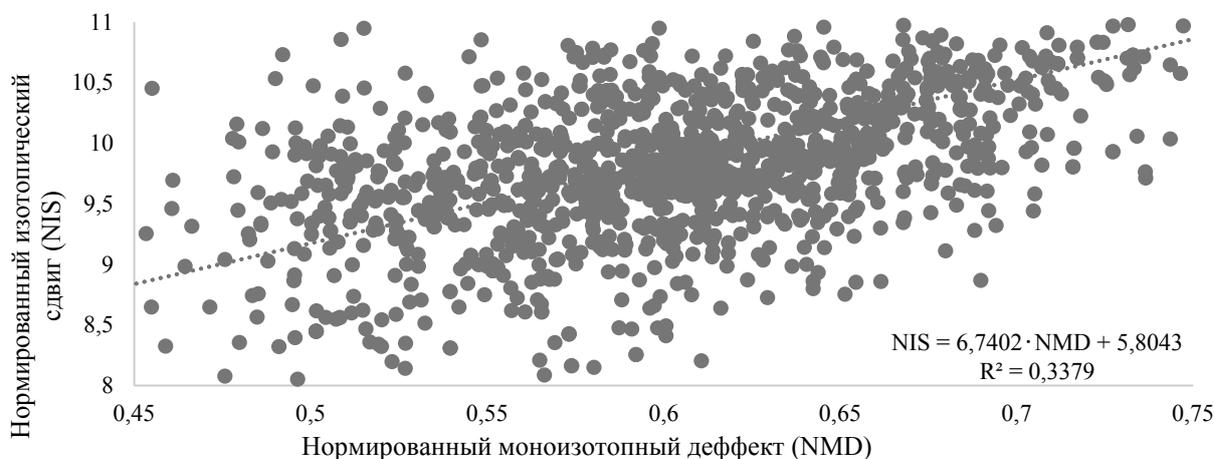


Рисунок 1. Двумерное картирование 1448 наиболее распространённых в естественной среде пептидов

По результатам исследования можно обнаружить закономерность при построении пептидной галактики. Используя метод Зубарева [2], на рисунке 1 было произведено двумерное картирование 1448 наиболее распространённых пептидов, взятых из NCBI [3]. Основные и наиболее распространённые пептиды находятся в центре и не сильно смещены от линии тренда. Однако требуемое изображение получено не было. Для получения характерного распределения [2], необходимо анализировать изотопный состав одного исследуемого организма.

Работа выполнена в рамках государственного задания ЮНЦ РАН 122020100351-9.

1. Basov A., Fedulova L., Vasilevskaya E., Dzhimak S. Possible mechanisms of biological effects observed in living systems during $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotope fractionation and deuterium interactions with other biogenic isotopes // *Molecules*, 2019, vol. 24, no. 22, p. 4101.

2. Zubarev R. Early life relict feature in peptide mass distribution // *Central European J Biol.*, 2010, vol. 5, pp. 190-196.

3. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information: 2021, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (дата обращения: 24.12.2021).

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ММ ЭМВ НА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ НОЕCHST 33258
С БИОМАКРОМОЛЕКУЛАМИ**
Study of MM EMW Effect on Complex-Formation of Hoechst 33258 with Biomacromolecules

Шагинян М.А., Микаелян М.С., Вардеванян П.О.

Ереванский государственный университет, г. Ереван, РА, *m.shahinyan@ysu.am*

В работе исследовано влияние электромагнитных волн миллиметрового диапазона (ММ ЭМВ) на комплексообразование Hoechst 33258 (Н33258) с ДНК тимуса теленка и сывороточным альбумином человека (САЧ) с применением методов абсорбционной и флуоресцентной спектроскопий. Облучение проведено частотой, резонансной для воды. Результаты спектроскопических исследований показали, что при облучении частотой 50,3 ГГц константы связывания Н33258 с ДНК и САЧ уменьшаются, при этом константа связывания Н33258 с ДНК сильным способом уменьшается почти в два раза. По всей вероятности, облучение ММ ЭМВ частотой 50,3 ГГц приводит к структуризации молекул воды вокруг молекулы ДНК, поэтому связывание Н33258 в малом желобке ДНК затрудняется [1]. В случае же САЧ также наблюдается уменьшение константы связывания Н33258. Данные приведены в таблице 1.

Таблица 1. Значения констант связывания Н33258 с необлученными и облученными ДНК и САЧ с частотой 50,3 ГГц

| | | Необлученные образцы ($K \cdot 10^{-5}$) | Облученные образцы частотой 50,3 ГГц ($K \cdot 10^{-5}$) |
|------------|----------------|---|---|
| ДНК-Н33258 | Сильный способ | 105±0,5 | 58±0,2 |
| | Слабый способ | 1,1±0,05 | 0,52±0,05 |
| САЧ-Н33258 | | 0,33±0,02 | 0,15±0,02 |

Аналогическое явление наблюдается и при связывании Н33258 с САЧ, поскольку облучение раствора белка ММ ЭМВ частотой 50,3 ГГц, приводит к уменьшению сродства Н33258. Это обусловлено тем, что возрастание степени упорядоченности молекул воды вблизи САЧ влияет на сродство лиганда, который образует комплекс с протеином за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий [1].

Полученные данные также указывают на то, что при облучении ММ ЭМВ с частотой 50,3 ГГц комплексов САЧ-Н33258, интенсивность флуоресценции уменьшается, оставаясь больше, чем в случае необлученных комплексов. При этом, уменьшается и интенсивность флуоресценции ДНК-Н33258 при облучении, по сравнению с необлученными комплексами, что также обусловлено структурированием гидратной оболочки ДНК под влиянием облучения.

Таким образом, из полученных данных выявлено, что облучение ММ ЭМВ приводит к понижению сродства Н33258 к ДНК и САЧ. Причиной этого изменения является то, что молекулы воды вокруг ДНК и САЧ структурируются и экранируют макромолекулу от молекул лиганда. Это видно из абсорбционных и флуоресцентных данных.

1. Vardevanyan P.O., Shahinyan M.A., Vardanyan A.V., Grigoryan S.V. Study of interaction of Hoechst 33258 with DNA and human serum albumin under the influence of millimeter range electromagnetic waves // Proceedings of The Yerevan State University, Chemistry and Biology, 2021, vol. 55, no. 2, doi: 10.46991/PYSU:B/2021.55.2.136.

**ВРЕМЕННАЯ ДИНАМИКА ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА
НЕЙТРОФИЛАМИ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ В ГИПОМАГНИТНЫХ УСЛОВИЯХ**
Time Dynamics of the Production of Reactive Oxygen Species by Neutrophils after Exposure to Hypomagnetic Conditions

Шаев И.А., Яблокова Е.В., Новиков В.В.

Институт биофизики клетки РАН «ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
г. Пушкино, РФ, *docmag@mail.ru*

На сегодняшний день имеется ряд публикаций об ингибирующем характере воздействия «нулевого» поля на процесс продукции АФК в различных клетках. Ранее нами было показано, что предварительная инкубация суспензии нейтрофилов в «нулевом» магнитном поле (остаточное постоянное магнитное поле менее 20 нТл) приводит к снижению интенсивности флуоресценции в суспензии нейтрофилов продуктов окисления

2,7- дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123 [1], а также к существенному уменьшению люцигенин-зависимой хемиллюминесценции (приблизительно на 30%) [2].

В то же время открытым оставался вопрос о том, какова длительность и зависимость от времени постэффектов, вызванных инкубацией нейтрофилов в гипомагнитных условиях. С целью изучить временную динамику продукции АФК в нейтрофилах в данном эксперименте нами был применен опробованный в предыдущих исследованиях метод активированной хемиллюминесценции с использованием селективного зонда на супероксид-анион – люцигенина [2], который позволяет за небольшой промежуток времени (несколько минут) зафиксировать изменение уровня сигнала и оценить скорость изменения продукции АФК.

В ходе эксперимента контрольные образцы помещались в локальное геомагнитное поле с индукцией постоянной составляющей ~ 44 мкТл и уровнем магнитного фона при 50 Гц в 15–50 нТл. Образцы опытных групп помещались в блок магнитной обработки на 30 минут, после чего в одной группе (0 мин после обработки) измерялась хемиллюминесценция, а другие группы инкубировались в геомагнитном поле 20, 40 и 60 мин с последующей регистрацией хемиллюминесцентного сигнала. Каждая группа опытных образцов инкубировалась одновременно с соответствующей контрольной группой, находящейся в условиях ГМП.

По результатам этого эксперимента было показано, что 30-минутная экспозиция суспензии нейтрофилов в гипомагнитных условиях вызывает существенное снижение интенсивности хемиллюминесцентного сигнала (около 48%) в группе «0 мин после обработки». В группе, которая после выдержки в «нулевом» поле экспонировалась 20 мин в условиях ГМП снижение сигнала было столь же существенным (в районе 49%). В отличие от этого, последние две группы (40 и 60 мин после инкубации) демонстрировали 32% и 22% разницу между контролем и опытом соответственно. При этом с увеличением времени инкубации и в контрольных, и в опытных образцах интенсивность хемиллюминесценции снижается сама по себе, в основе чего может лежать запуск клетками компенсаторных механизмов, направленных на снижение концентраций внутриклеточных АФК.

Полученные данные свидетельствуют о том, что инерционность биологического ответа на гипомагнитные условия сохраняется по крайней мере в течение 20 мин после окончания действия этих условий, что можно использовать в исследованиях по данной тематике для упрощения технической составляющей эксперимента и проводить измерения различных характеристик объекта исследования вне границ блока магнитного экранирования.

1. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Влияние «нулевого» магнитного поля на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах // Биофизика, 2018, т. 63, № 3, с. 484-488.

2. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Шаев И.А., Фесенко Е.Е. Снижение продукции супероксидного анион-радикала в нейтрофилах в результате действия «нулевого» магнитного поля // Биофизика, 2020, т. 65, № 4, с. 735-740.

BACTERIAL NETWORKS OF HORIZONTAL ALLELE TRANSFER

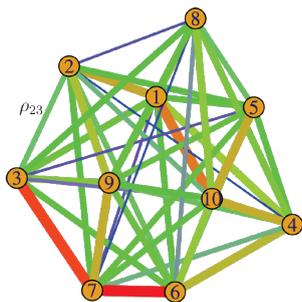
Sheinman M.¹, Massip F.², Arndt P.F.³

¹ Sevastopol State University, Sevastopol, Russia, mshinman@sevsu.ru

² Institut Curie, Paris, France

³ Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany

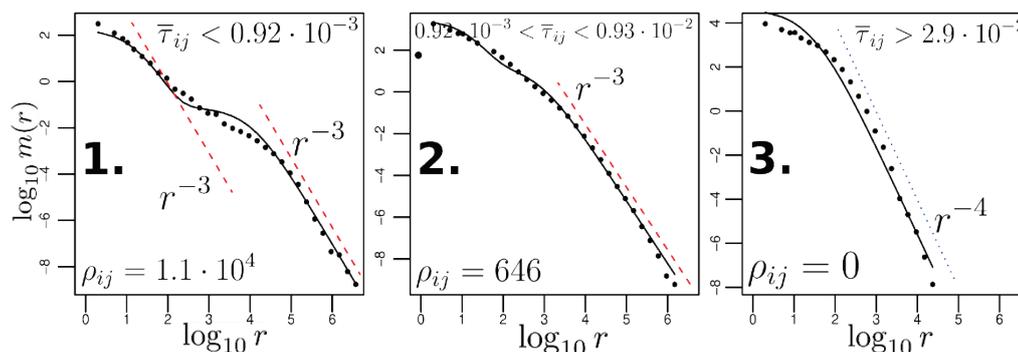
Arguably, the most important concepts in biological evolution, phylogenetic tree [1] and molecular clock [2], cannot be fully applied to the bacterial domain of life. In fact, relations between bacterial taxa are often described as phylogenetic web rather than a tree [3], while genomic divergence between bacteria cannot be satisfactorily calibrated to their speciation time [4]. The reason for both phenomena is the same—horizontal transfer of genes and/or alleles. In particular, frequent horizontal transfer between bacteria maintains their genomic homology [5] and generates long (nearly) identical sequence matches [6]. Such long sequence matches can be found empirically and in this study we use their statistical properties to validate our model of evolution of bacterial genomes.



Our model takes into account that a horizontal transfer event between two bacterial strains, i and j does not have to be direct (like $i \rightarrow j$ or $j \rightarrow i$) to maintain genomic homology between the strains. Many different scenarios are possible: the transfer may pass through a third strain ($i \rightarrow k \rightarrow j$), both i and j may receive the same (or similar if it mutates in-between the two transfer events) allele from k ($i \leftarrow k \rightarrow j$) etc. In general, one can imagine a network of strains which maintain genomic homology by continuous (on the evolutionary time scale) transfer of alleles, as shown in the illustration. Each pairs of nodes ij is assumed to transfer alleles with a direct rate ρ_{ij} .

We analyze steady-state solution of such networks using an effective-medium (mean-field) approach and derive analytically length distribution of exact sequence matches, $m(r)$, between each pair of strains in the network. There are three possible regimes: **1.** Pairs with the transfer rate much higher than the effective-medium transfer rate, ρ , are predicted to have $m(r)$ with two-scales, both with r^{-3} tail. **2.** If the direct transfer rate is comparable to ρ , both scales merge to form $(r + \rho)^{-3}$ dependency. **3.** Finally, if the direct transfer rate is much smaller than ρ , one get $m(r)$ with r^{-4} tail.

We validated these results simulating complex networks and in the figure one can see empirical validation of the effective-medium theory predictions using *E. coli* strains: $m(r)$ of pairs of strains (points) with 1.low/2.medium/3.high mean divergence, $\bar{\tau}_{ij}$, follow the theoretical predictions (solid lines). Other species exhibit similar behavior. For diverging species we used the same model and validated our analytic predictions for different pairs of species. In sum, the developed model sheds light on the evolution of bacteria and allows us to estimate parameters related to horizontal allele transfer between different bacterial organisms.



1. Darwin C. The Origin of Species, 1859.

2. Zuckerkandl E., Pauling L. In Evolving genes and proteins // Elsevier, 1965, pp. 97-166.

3. Doolittle W.F. Phylogenetic classification and the universal tree // Science, 1999, vol. 284, no. 5423, pp. 2124-2128.

4. Ochman H., Elwyn S., Moran N.A. PNAS, 1999, vol. 96, no. 22, pp. 12638-12643.

5. Sakoparnig T., Field C., van Nimwegen E. Elife, 2021, vol. 10, p. e65366.

6. Sheinman M., Arkhipova K., Arndt P.F., Dutilh B.E., Hermsen R., Massip F. Elife, 2021, vol. 10, p. e62719.

ЗАВИСИМОСТЬ СРЕДНЕГО ДИАМЕТРА КЛЕТОК *PORPHYRIDIUM PURPUREUM* (BORY) ROSS ОТ ОСВЕЩЕННОСТИ

The Dependence of the Average Cell Diameter of *Porphyridium Purpureum* (Bory) Ross on Illumination

Шумейко Д.М.¹, Поплавская А.Ю.¹, Доценко В.А.¹, Лелеков А.С.²

¹ Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ, diana_shumeyko25@mail.ru

² ФИЦ "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН", г. Севастополь, РФ, a.lelekov@yandex.ru

Porphyridium purpureum (Bory) Ross – красная одноклеточная водоросль, которая является широко используемым объектом исследования в области гидробиологии. Данная микроводоросль с практической точки зрения представляет интерес благодаря содержанию таких биологически активных веществ, как: фотосинтетические пигменты (хлорофилл-а, каротиноиды, В-фикоэритрин), внеклеточные сульфополисахариды, а также ненасыщенные жирные кислоты, в том числе арахидоновая и эйкозапентаеновая кислоты. *P. purpureum* используется в качестве модельного объекта при проведении биофизических исследований распространения света в рассеивающих средах, так как её клетки имеют форму, близкую к сферической. Одним из важнейших факторов, влияющих на продуктивность микроводорослей, размерную структуру популяции и скорость фотосинтеза, является свет. Цель данной работы – определение зависимости среднего диаметра клеток *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross от количества световой энергии в области ФАР.

Работа выполнялась на базе кафедры "Физика" СевГУ. Объектом исследования являлась красная микроводоросль *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross, полученная из коллекции из ЦКП "Коллекция гидробионтов Мирового океана" ФИЦ ИнБИОМ. Культивирование осуществляли в плоскопараллельных фотобиореакторах толщиной 2 см, с рабочим объёмом 1 л и площадью освещаемой поверхности 0,05 м² при круглосуточном искусственном освещении светодиодными лампами LCD Feron LB-213 мощностью 10 Вт. Освещённость поверхности фотобиореактора определяли люксметром Ю-116 и в среднем она составляла 1 клк, 3 клк, 5 клк, 10 клк. Проведена серия экспериментов в квазинепрерывном режиме культивирования (плотностат) [1], характеризующаяся тем, что в течение эксперимента плотность культуры поддерживалась 0,5 г/л. Культивирование осуществляли на питательной среде для красных морских водорослей [2]. Рост культуры регистрировали оптическим методом, определяя оптическую плотность D₇₅₀ на фотометре КФК-2.

Перед проведением измерений оптической плотности в культиватор добавляли дистиллированную воду с целью компенсации испарения воды. Коэффициент перехода от D_{750} к воздушно-сухому весу составлял 1,4 г/(л·ед.опт.пл). Температуру суспензии измеряли ртутным термометром непосредственно в культиваторе, абсолютная погрешность измерений составляла $\pm 0,5$ °С. Температура среды колебалась в диапазоне 24 – 26 °С. Барботаж культуры *P. purpureum* осуществляли аквариумным компрессором, скорость подачи воздуха составляла 0,5 л/л культуры в минуту. Исследование по определению расчёта размеров клеток проводилось на лазерном анализаторе «Ласка-ТМ» и микроскопе фирмы «ЛОМО» с камерой «МС-6.3». Диаметр клеток на микроскопе определяли с помощью программы «МСview».

В ходе экспериментального исследования установлено, что удельная скорость роста культуры *P. purpureum* увеличивалась с ростом поверхностной освещенности, причем коэффициент пропорциональности для 4 Вт/м², 12 Вт/м², 20 Вт/м² и 40 Вт/м² составлял 0,16 сут⁻¹, 0,27 сут⁻¹, 0,33 сут⁻¹, 0,78 сут⁻¹ соответственно. Показано, что при изменении освещенности в течение 5 суток происходили изменения размерной структуры популяции клеток *P. purpureum*, после чего происходила её стабилизация. Экспериментально доказано, что в результате изменения освещенности от 1 до 10 клк наблюдалось увеличение среднего диаметра клеток микроводоросли *P. purpureum* (см. табл.1).

Таблица 1. Зависимость среднего диаметра клеток *P. purpureum* (d_{cp}) от освещенности (E)

| E , клк | 1 | 3 | 5 | 10 |
|----------------|------|------|------|------|
| d_{cp} , мкм | 8,71 | 8,79 | 9,75 | 9,84 |

Если рассматривать две основные фазы жизненного цикла клетки - интерфазу и фазу деления, то из вышеизложенного можно сделать вывод, что при повышении освещенности уменьшается время длительности интерфазы, что с учетом постоянства времени цитокинеза приводит к увеличению среднего размера клеток. Полученные результаты подтверждаются ранее опубликованными модельными представлениями [3].

1. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 2. Квазинепрерывная культура // Экология моря, 2005, вып. 67, с. 98-110.

2. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н., Сидько Ф.Я. Модель светозависимого роста морских микроводорослей (с учетом фотоингибирования). Красноярск: ИФСО, 1981, 63 с.

3. Тренкеншу Р.П. Связь ростовых характеристик культур микроводорослей с возрастным состоянием клеток в онтогенезе (вероятностная модель) // Морской биологический журнал, 2022. В печати.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРУЕМОЙ ПЕРФУЗИРУЕМОЙ ПЕЧЕНИ

Influence of Magnetite Nanoparticles on the Functional Activity of the Isolated Perfused Liver

Яковлева Ю.А.^{1,3}, Шадрин К.В.², Пахомова В.Г.³, Крюкова О.В.³

¹ Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, РФ, yakovleva.ju@mail.ru

² КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России, shadrin.kv@ksc.krasn.ru

³ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, РФ.

Количество операций по трансплантации печени достигает более 32 тыс. в год по данным на 2021 год [3]. Одним из важных аспектов успешного результата операции является качество трансплантируемого органа, функциональное состояние которого в период его транспортировки от донора к реципиенту поддерживается с помощью *ex vivo* перфузии [1]. Одним из наиболее важных факторов, определяющих длительность сохранения органа, является доставка адекватного количества кислорода, который поддерживает достаточный уровень АТФ в клетках [4, 5]. При этом известно, что печень способна потреблять кислород не только через сосудистое русло, но и через поверхность [6]. Также немаловажным является то, что компонентный состав среды влияет на функциональную активность печени, поэтому удобно использовать добавки в перфузионную среду, поддерживающие жизнеспособность трансплантата. Наиболее обсуждаемыми на сегодняшний день добавками являются магнитные наночастицы, а именно наночастицы магнетита [2]. Данный наноконструкт используется в методе лечения под названием магнитная гипертермия, суть которой заключается в локальном нагреве опухолевых очагов за счет наночастиц, тем самым разрушая опухолевые клетки и продлевая жизнь органа [2]. Однако влияние наночастиц магнетита на поглощение кислорода поверхностью печени в условиях *ex vivo* в литературе не обсуждается.

Влияние наночастиц магнетита на функциональную активность печени оценивали по уровню сосудистого сопротивления, скорости поглощения кислорода через сосудистое русло и через поверхность органа. Концентрации кислорода для расчета удельных скоростей были определены амперометрическим методом с использованием прибора ABL800Flex. Объектом исследований являлась изолированная печень крысы. Эксперимент проведен на крысах-самцах линии Wistar массой 200-320 г. Животные были разделены на 2 группы:

«Контроль» (9 животных), «Опыт» (7 животных). В качестве перфузионной среды использовали физиологический раствор Кребса-Хенселейта в нормотермических условиях (при 37 градусах). Для опытной группы в перфузионную среду перед началом перфузии была добавлена суспензия наночастиц магнетита (концентрация частиц в исходном растворе – 10 мг/мл). Общее время перфузии составило 120 минут.

В процессе перфузии выявлено, что орган был метаболически стабилен в обеих группах по уровню сосудистого сопротивления, который не поднимался выше 12 см.водн.ст. Также не было обнаружено статистически значимых различий между группами по скорости поглощения кислорода органом через сосудистое русло, которое составляло в среднем $1,9 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$, что соответствует данным литературы [6] и свидетельствует о нормальном функционировании печени. Уровень поглощения кислорода через поверхность в обеих группах также стабилен и при добавлении в перфузионную среду наночастиц магнетита статистически значимо не отличается от значений в контрольной группе. Скорость поглощения кислорода изолированным органом через поверхность в среднем составляет $2,10 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ для контрольной группы и $2,80 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ для опытной группы.

Можно заключить, что в процессе перфузии печень была физиологически стабильна и наблюдаемые эффекты не связаны с нестабильностью функционирования метаболической системы органа или его гибелью. Влияние наночастиц магнетита не снижает функциональную активность печени. Добавление наночастиц магнетита в перфузионную среду выглядит перспективным способом для поддержания нормальной жизнедеятельности органа.

1. Shonaka T., Matsuno N., Obara H. et al. Application of Perfusate with Human-Derived Oxygen Carrier Solution Under Subnormothermic Machine Perfusion for Donation After Cardiac Death Liver Grafts in Pigs // *Transplantation Proceedings*, 2018, vol. 50, pp. 2821-2825.

2. Pan J. et al. Mild magnetic hyperthermia-activated innate immunity for liver cancer therapy // *Journal of the American Chemical Society*, 2021, vol. 143, iss. 21, pp. 8116-8128.

3. Aubert O. et al. COVID-19 pandemic and worldwide organ transplantation: a population-based study // *The Lancet Public Health*, 2021, vol. 6, iss. 10, pp. e709-e719.

4. Orman M.A. et al. Metabolic response of perfused livers to various oxygenation conditions // *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, vol. 108, iss. 12, pp. 2947-2957.

5. Bellini M.I., Yiu J., Nozdrin M. et al. The effect of preservation temperature on liver, kidney, and pancreas tissue ATP in animal and preclinical human models // *Journal of Clinical Medicine*, 2019, vol. 8, iss. 9, p. 1421.

6. Шадрин К.В. и др. Особенности транспорта кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени крысы // *Доклады Академии наук*, 2015, т. 464, № 3, с. 369-372.

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ДИСПЕРСНОЙ ФАЗЫ ДИСТИЛЛИРОВАННОЙ ВОДЫ Electron Microscopy of the Dispersed Phase of Distilled Water

Яхно Т.А., Богданов С.А., Санин А.Г., Яхно В.Г.

ФИЦ Институт прикладной физики Российской академии наук, г. Нижний Новгород, РФ, yakhta13@gmail.com

Присутствие микрочастиц неизвестного происхождения в объеме воды, в том числе, высокой степени очистки (бидистиллированной, деионизированной), было продемонстрировано неоднократно с помощью разных методов физического анализа [1]. Многие авторы ограничивались констатацией факта, тогда как другие выдвигали свои версии происхождения этих частиц: массив нанопузырьков [2], кластеры структурированной воды [3]. Мы наблюдали микрочастицы в тонком слое жидкости между предметным и покровным стеклами в разных образцах дистиллированной воды под оптическим микроскопом Levenhuk с видеокамерой, сопряженной с компьютером, с помощью программы TourView, при ширине поля отображения 3 мм. Исследовали также динамику структуры осадков, остающихся на стеклянной подложке после испарения слоя налитой туда дистиллированной воды. По данным оптической микроскопии дисперсная фаза воды представляет собой светлые сферы размером ~ 10 мкм с темной точкой в центре [4]. На основании дополнительных исследований было сделано предположение, что единица дисперсной фазы образована микрокристаллом NaCl (темная точка), окруженным толстым слоем гидратной жидкокристаллической воды – EZ [5]. Предложена схема фазовых переходов воды и соли в процессе полного испарения свободной воды. Известно, что строение EZ подобно губке, стенки которой представлены водой высокой плотности, а ячейки заполнены водой низкой плотности [6].

Цель данной работы – проверка нашей гипотезы о строении единицы дисперсной фазы и ее возможном участии в формировании крупных (до 1 мм) кристаллов хлорида натрия на дне стеклянной подложки и неиспаряющейся гелеобразной воды.

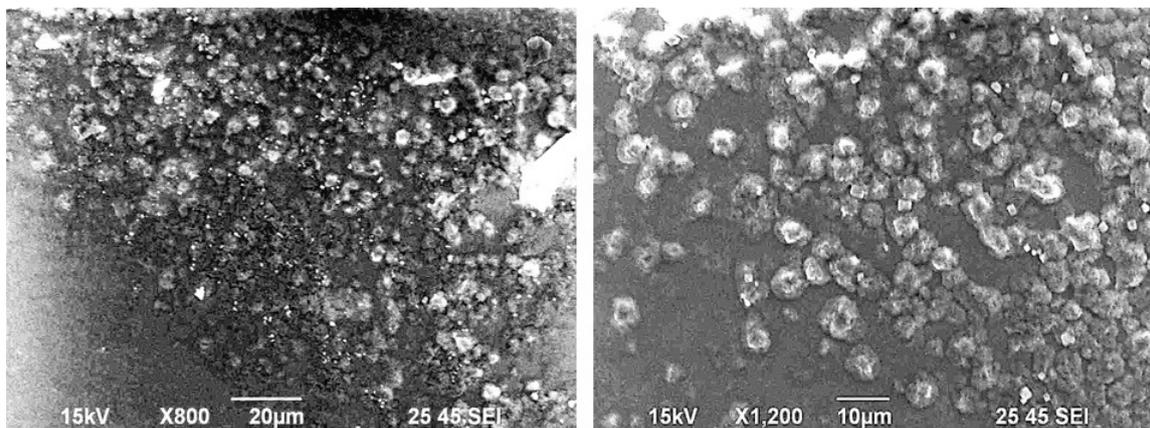


Рисунок 1. Дисперсная фаза воды под трансмиссионным электронным микроскопом JEOL JSM – 6390 LA через сутки после испарения свободной воды со стеклянной поверхности. Слева – множество мелких кристаллов соли (светлые точки) над слоем дисперсной фазы. Справа – кристаллизация хлорида натрия вокруг центральной части единиц дисперсной фазы («темной точки»)

Проведенное исследование дает основание полагать, что наше предположение о строении единицы дисперсной фазы имеет смысл и работа должна быть продолжена. Большой естественнонаучный интерес представляет также исследование взаимодействия кристаллической соли с разными фазами воды.

1. Yakhno T.A., Yakhno V.G. Water as a Microdispersed System. Water “Activation” Mechanism. Water Phases at Room Conditions // WATER SPECIAL EDITION: Evidence of Water Structure, 2022, doi: 10.14294/WATER.2021.S2.
2. James R.T., Seddon, Detlef Lohse. Nanobubbles and micropancakes: gaseous domains on immersed substrates // J. Phys. Condens. Matter, 2011, vol. 23, no. 133001, 22 p.
3. Lo S.Y, Geng X., Gann D. Evidence for the existence of stable-water-clusters at room temperature and normal pressure // Phys. Lett. A, 2009, vol. 373, pp. 3872-3876, doi: 10.1016/j.physleta.
4. Yakhno T., Yakhno V. A study of structural organization of water and aqueous solutions by means of optical microscopy // Crystals, 2019, vol. 9, no. 52, doi: 10.3390/cryst9010052.
5. Yakhno T., Drozdov M., Yakhno V. Giant water clusters: where are they from? // Int. J. Mol. Sci., 2019, vol. 20, p. 1582, doi: 10.3390/ijms20071582.
6. Hwang S.G., Hong J.K., Sharma A., Pollack G.H., Bahng G. Exclusion zone and heterogeneous water structure at ambient temperature // PLoS ONE, 2018, vol. 13, no. 4, p. e0195057, doi: 10.1371/journal.pone.0195057.

СЕКЦИЯ 2. МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЫ БЕТА-ЛАКТОРФИНА Theoretical Conformational Analysis of Beta-Lactorphin Molecule

Агаева Л.Н.¹, Абдинова А.А.², Ахмедова С.Р.³, Ахмедов Н.Ф.¹, Ахмедов Н.А.¹

¹ Бакинский государственный университет, г. Баку, Азербайджан, leylanamig@mail.ru

² Азербайджанский государственный педагогический университет, г. Баку, Азербайджан

³ Азербайджанский технический университет, г. Баку, Азербайджан

Опиоидные пептиды вызывают обезболивание, успокоение и засыпание, также эйфорическое состояние и ряд вегетативных реакций. Эти пептиды бывают животного и растительного происхождения. Ряд экзогенных пептидов, получаемых с пищей, обладают опиоподобными свойствами. Такие пептиды были названы экзорфинами. Открытие опиоидной активности пептидных компонентов пищи послужило основанием предположить, что некоторые виды пищи могут воздействовать на центральную нервную систему подобно опиатным препаратам. Обнаружен ряд молочных экзорфинов, имеющих свойства антагонистов опиоидных рецепторов. К ним относятся казоксины А, В, С, человеческий казоксин D, а также лактоферроксины А, В и С, а также альфа и бета лакторфины. Возможность образования этих пептидов при гидролизе соответствующих белков пептидазами желудочно-кишечного тракта доказана *in vitro*. Представителями экзорфинов являются также цитохрофины и геморфины. Предполагается, что эти пептиды могут образовываться *in vivo* при протеолитическом расщеплении цитохрома b и гемоглобина [1].

Нами были исследованы структурно-функциональные организации опиоидных пептидов, полученных из пищи. В настоящее время исследуется пространственная структура лакторфинов. Эта работа является продолжением наших предыдущих исследований. Молекула бета-лакторфина является представителем этого класса. Методом теоретического конформационного анализа исследованы конформационные возможности молекулы бета-лакторфина Tyr-Leu-Leu-Phe.

Расчет тетрапептидной молекулы выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция энергии молекулы 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 бета-лакторфина изучены в условиях водного окружения, в связи, с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей оценивалась с помощью потенциала Морзе. При изложении результатов расчета использована классификация пептидных структур по конформациям, формам основной цепи и шейпам пептидного скелета.

Трехмерная структура молекулы бета-лакторфина Tyr1-Leu2-Leu3-Phe4 была исследована на основе низкоэнергетических конформаций соответствующих аминокислотных остатков. Расчет пространственной структуры бета-лакторфина показал, что возникает сильная энергетическая дифференциация, возникающая между шейпами, формами основной цепи и конформациями. В широкий энергетический интервал 0–7 ккал/моль попадают конформации восьми шейпов, и они представлены восемью формами основной цепи. Таким образом, в энергетический интервал 0-7 ккал/моль попадают конформации всех возможных шейпов тетрапептидной молекулы.

Проведенный расчет пространственной структуры бета-лакторфина Tyr1-Leu2-Leu3-Phe4 позволили определить низкоэнергетические конформации этой молекулы, значения двугранных углов основных и боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в состав молекул, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Показано, что пространственная структура молекулы бета-лакторфина может быть представлена восемью формами основной цепи. Полученные результаты могут быть использованы для выяснения структурной и структурно-функциональной организации молекул экзорфинов.

Таким образом, пространственную структуру молекулы бета-лакторфина можно представить восемью структурными типами и можно предположить, что молекула свои физиологические функции осуществляет именно в этих структурах. На основе полученных трехмерных структур можно предположить для данной молекулы ее синтетические аналоги. Теоретический конформационный анализ тетрапептидной молекулы бета-лакторфина привел к такой структурной организации молекулы, которая не исключает реализацию этой молекулой целого ряда функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

1. 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.

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРОВ НА АКТИВАЦИЮ РЕЦЕПТОРА NMDA Effect of Modulators on the NMDA Receptor Activation

Аксенова С.В., Батова А.С., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.

Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, РФ, kgyr@mail.ru

Различные модуляторы, мутации и разнообразие состава субъединиц рецепторов NMDA могут привести к изменению функциональных свойств NMDA-рецепторов с точки зрения агонистической активности, проницаемости ионов кальция, гейтинга, кинетики и максимальной вероятности открытия канала [1]. Дисфункция NMDA рецепторов приводит к развитию патологических процессов, лежащих в основе неврологических и когнитивных заболеваний. Гипер- или гиподисфункция рецептора вовлечены в различные психические и неврологические заболевания, включая депрессию, шизофрению, болезнь Альцгеймера и аутоиммунный анти-NMDA-рецепторный энцефалит [2, 3]. Известно, что действие таких анестетиков, как фенциклидин и кетамин, связано с подавлением активности рецепторов NMDA путем блокирования рецепторного канала. Сильнодействующий селективный ингибитор рецепторов NMDA, содержащих субъединицу NR2B, антидепрессант Ro 25-6981, представляет собой модулятор сайта связывания N-концевого домена [4].

Целью настоящей работы является изучение влияния аллостерических модуляторов на активацию рецепторов NMDA с различным составом субъединиц и сетевую активность нейронов гиппокампа. Разработанный вычислительный подход [5] позволяет произвести анализ различных структур рецепторов NMDA, оценить их электрофизиологические свойства на примере моделей нейронных сетей гиппокампа [3, 4] и воспроизвести отдельные ритмы электроэнцефалограммы (ЭЭГ).

В работе было проведено молекулярно-динамическое моделирование активации ионного канала различных типов рецепторов NMDA (GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2A/GluN2B) при действии аллостерических модуляторов. Изучение сетевой активности нейронов с различными типами рецепторов NMDA проводилось в моделях нейронных сетей CA1 и CA3 [6, 7] областей гиппокампа. Исходя из анализа изменения проводимостей ионного канала и связывания ионов магния были выявлены различия в амплитуде тета- и гамма-частотных диапазонов в нейронных сетях с различными модельными структурами NMDA-рецепторов.

При воздействии Ro 25-6981 и кетамина для дигетеромерной модели GluN1/GluN2A NMDA-рецептора наблюдалось падение амплитуды тета-частотных и рост гамма-частотных диапазонов по сравнению с нативными формами рецептора. Для тригетеромера GluN1/GluN2A/GluN2B имеет место возрастание тета-частоты и снижение частоты гамма-диапазона по сравнению с GluN1/GluN2B. В отсутствие кетамина для моделей GluN1/GluN2A и GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA-рецептора наблюдалось возрастание амплитуды тета-частотных и гамма-частотных диапазонов по сравнению с нативными формами NMDA-рецептора.

1. Wang H. et al. Gating mechanism and a modulatory niche of human GluN1-GluN2A NMDA receptors // *Neuron*, 2021, vol. 109, pp. 2443-2456.
2. Cull-Candy S., Brickley S., Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease // *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2021 vol. 11, pp. 327-335.
3. Dalmau J., Armangue T., Planaguma J., Radosevich M., Mannara F., Leypoldt F., Geis C., Lancaster E., Titulaer M.J., Rosenfeld M.R., Graus F. An update on anti-NMDA receptor encephalitis for neurologists and psychiatrists: mechanisms and models // *Lancet Neurol.*, 2019 vol. 18, pp. 1045-1057.
4. Monaghan D.T. et al. Pharmacological Modulation of NMDA Receptor Activity and the Advent of Negative and Positive Allosteric Modulators // *Neurochem. Int.*, 2012. vol. 61, no. 4, pp. 581-592.
5. Batova A.S., Bugay A.N., Dushanov E.B. Effect of mutant NMDA receptors on oscillations in a model of Hippocampus // *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2019, vol. 17, no. 01, doi: 10.1142/S0219720019400031.
6. Grienberger C. et al. Inhibitory suppression of heterogeneously tuned excitation enhances spatial coding in CA1 place cells // *Nature Neuroscience*, 2017, vol. 20, no. 3, pp. 417-426, doi: 10.1038/nn.4486.
7. Neymotin S.A. et al. Ketamine disrupts theta modulation of gamma in a computer model of hippocampus // *J. Neurosci.*, 2011, vol. 31, pp. 11733-11743.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЫ АЛЬФА-ЛАКТОРФИНА Spatial Organization of the Alpha-Lactorphine Molecule

Ахмедов Н.А., Агаева Л.Н., Аббаслы Р.М., Исмаилова Л.И.

Бакинский государственный университет, Институт физических проблем, г. Баку, Азербайджан,
Namiq.49@bk.ru

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. Эти пептиды бывают животного и растительного происхождения. Ряд экзогенных пептидов, получаемых с пищей, обладают опиоподобными свойствами. Такие пептиды были названы экзорфинами. Открытие опиоидной активности пептидных компонентов пищи послужило основанием предположить, что некоторые виды пищи могут воздействовать на центральную нервную систему подобно опиатным препаратам. Предполагается, что эти пептиды могут образовываться *in vivo* при протеолитическом расщеплении цитохрома *b* и гемоглобина. Проведено исследование нейротропных эффектов опиоидных пептидов фрагментов глютена, рубисколина и цитохрома *b*. Показано, что обладающие относительной δ -селективностью экзорфин С и рубисколин-5 характеризуются сходным по направленности действием на поведение детенышей белых крыс. [1].

Нами были исследованы структурно-функциональные организации опиоидных пептидов энкефалинов, эндорфинов, эндоморфинов, динорфинов, неоэндорфинов, адренорфина, а в настоящее время исследуется пространственная структура экзорфинов. Эта работа является продолжением наших предыдущих исследований. Молекула альфа-лакторфина является представителем этого класса. Методом теоретического конформационного анализа исследованы конформационные возможности молекулы альфа-лакторфина Tyr-Gly-Leu-Phe.

Расчет тетрапептидной молекулы выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция энергии молекулы 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 альфа-лакторфина изучены в условиях водного окружения, в связи с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей оценивалась с помощью потенциала Морзе. При изложении результатов расчета использована классификация пептидных структур по конформациям, формам основной цепи и шейпам пептидного скелета.

Трехмерная структура молекулы альфа-лакторфина Tyr1-Gly2-Leu3-Phe4 была исследована на основе низкоэнергетических конформаций соответствующих аминокислотных остатков. В тетрапептидную молекулу входит аминокислотный остаток глицин. Известно, что для глицина четыре формы осной цепи R, B, L, P являются низкоэнергетическими. Поэтому для данной молекулы в восьми шейпах пептидного скелета возможны шестнадцать форм основной цепи. Расчет пространственной структуры альфа-лакторфина показал, что возникает сильная энергетическая дифференциация, возникающая между шейпами, формами основной цепи и конформациями. В широкий энергетический интервал 0–6 ккал/моль попадают конформации восьми шейпов, и они представлены одиннадцатью формами основной цепи. Таким образом, в энергетический интервал 0–6 ккал/моль попадают конформации всех возможных шейпов.

Проведенный расчет пространственной структуры альфа-лакторфина Tyr1-Gly2-Leu3-Phe4 позволили определить низкоэнергетические конформации этой молекулы, значения двугранных углов основных и боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в состав молекул, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Показано, что пространственная структура молекулы альфа-лакторфина может быть представлена одиннадцатью формами основной цепи. Полученные результаты могут быть использованы для выяснения структурной и структурно-функциональной организации молекул экзорфинов.

Таким образом, пространственную структуру молекулы альфа-лакторфина можно представить одиннадцатью структурными типами и можно предположить, что молекула свои физиологические функции осуществляет именно в этих структурах. На основе полученных трехмерных структур можно предположить для данной молекулы ее синтетические аналоги. Теоретический конформационный анализ тетрапептидной молекулы альфа-лакторфина привел к такой структурной организации молекулы, которая не исключает реализацию этой молекулой целого ряда функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

1. 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.

КЛЕТОЧНАЯ ДИНАМИКА СТРУКТУРЫ ЭПИДЕРМИСА В УСЛОВИЯХ ГОМЕОСТАЗА Cellular Dynamics of Epidermal Structure under Homeostasis Conditions

Бескудрова А.С.¹, Пантелеев А. А.², Шинин В.В.², Левашова Н. Т.¹, Сидорова А.Э.¹

¹ Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, г. Москва, РФ

² Национальный исследовательский центр Курчатовский институт, лаборатория «Биосовместимых матриц и тканевой инженерии», *AlexBes17@yandex.ru, a.a.pantel@gmail.com, vshinin@gmail.com, natasha@wanaku.net, ske314bone@mail.ru*

Работа посвящена решению актуальной научной проблемы – оценке факторов, влияющих на динамику клеточной структуры эпидермиса и механизмы поддержания его гомеостаза (стабильности структуры и функций). Актуальность этой проблемы обусловлена необходимостью разработки методов контроля судьбы стволовых клеток эпидермиса.

Промежуточным шагом к достижению этой цели является выявление ключевых факторов, влияющих на активацию стволовой клетки, условия перехода к дифференцировке и движения от базальной мембраны к роговому слою эпидермиса.

Рассматриваются методы оценки влияния различных факторов на динамику клеточной структуры эпидермиса, измерения концентраций веществ и их градиентов в тканях человека [1-3] и моделирования клеточной динамики в эпителиальных тканях [4, 5].

Эффективным инструментом анализа динамики клеточной структуры эпидермиса является математическое моделирование процессов самообновления тканей эпидермиса, в частности, влияние градиента кислорода на дифференцировку и движение клеток эпидермиса в условиях гомеостаза.

1. Falstie-Jensen N., Spaun E., Brøchner-Mortensen J., Falstie-Jensen S. The influence of epidermal thickness on transcutaneous oxygen pressure measurements in normal persons // *Scand J Clin Lab Invest.*, 1988, vol. 48, no. 6, pp. 519-523.

2. Roe D.F., Gibbins B.L., Ladizinsky D.A. Topical dissolved oxygen penetrates skin: model and method // *J. Surg. Res.*, 2010, vol. 159, no. 1, pp. e29-36.

3. Adams M.P., Mallet D.G., Pettet G.J. Towards a quantitative theory of epidermal calcium profile formation in unwounded skin // *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 1, p. e0116751.

4. Zhang H., Hou W., Henrot L., Schnebert S., Dumas M., Heusèle C., Yang J. Modelling epidermis homeostasis and psoriasis pathogenesis // *J. R. Soc. Interface*, 2015, vol. 12, no. 103, p. 20141071.

5. Groenendaal W., Schmidt K.A., von Basum G., van Riel N.A., Hilbers P.A. Modeling glucose and water dynamics in human skin // *Diabetes Technol. Ther.*, 2008, vo. 10, no. 4, pp. 283-293.

ПЕРЕДАЧА КОНФОРМАЦИОННОГО СИГНАЛА ОТ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА К АКТИВНОМУ ЦЕНТРУ В ФЕРМЕНТЕ БЕЛКОВАЯ ТИРОЗИН ФОСФАТАЗА РТР1В ЧЕЛОВЕКА

Transfer of Conformational Signal in Human Protein Tyrosine Phosphatase PTP1B from Allosteric Inhibitor to the Active Center

Чиргадзе Ю.Н.¹, Бражников Е.В.¹, Лихачев И.В.², Балабаев Н.К.²

¹ Институт белка РАН, г. Пущино, РФ

² Институт математических проблем биологии РАН, филиал Института прикладной математики имени М.В. Келдыша РАН, г. Пущино, РФ

Тирозин фосфатаза 1В человека является негативным регулятором метаболизма гормонов инсулина и лептина, что прямо связано с диабетом 2 и ожирением, соответственно. Комплекс фермента с ингибитором приводит к изменению конформации боковых цепей поверхностных остатков, а также главной цепи белка в области активного центра. При этом место контакта ингибитора удалено от активного центра на 18Å. В данной работе изучено, каким образом передается сигнал от аллостерического ингибитора P00058 к активному центру фермента белковой тирозин фосфатазы РТР1В человека. С помощью метода симуляции молекулярной динамики показано, что сценарий изменений в структуре фермента после связывания с ингибитором состоит в следующем. В процессе флуктуации структуры возникают различные варианты молекулы белка с изменениями его конформации. Траектория молекулярной динамики комплекса фермента с ингибитором изучена от 0,2 до 25 наносекунд. Сдвиг α -атомов главной цепи в области каталитической р-Туг петли, остатки 44-50, возникает около 4,0 наносекунд, и в дальнейшем он сохраняется (Рисунок). Таким образом, функционально важное изменение в активном центре обусловлено появлением функционально важного варианта структуры комплекса фермент-ингибитор в растворе в процессе флуктуации молекулы в растворе.

Вычисления молекулярной динамики проведены с помощью гибридного суперкомпьютера К-60, установленного в Центре коллективного пользования Института прикладной математики имени М.В. Келдыша РАН.

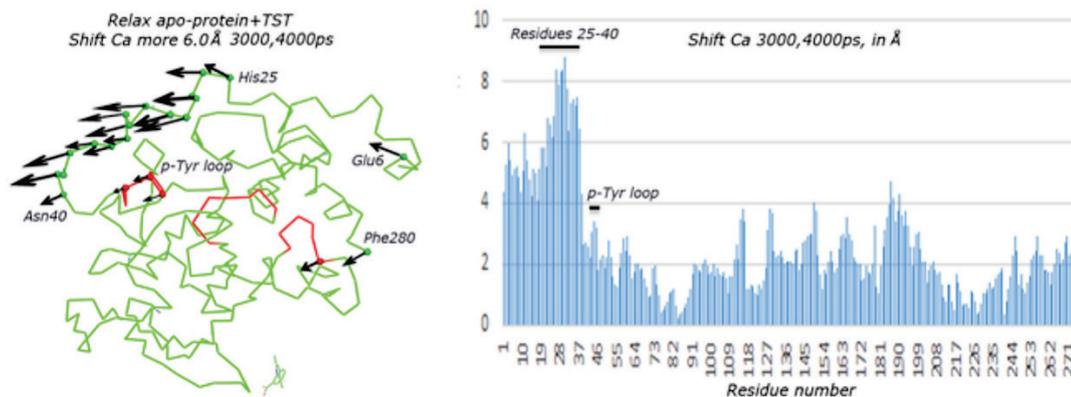


Рисунок 1. Изменения в структуре фермента РТР1В после присоединения ингибитора Р00058 в области каталитической петли р-Тур (слева). Сдвиги α -атомов главной цепи белка в интервал времени около 4,0 наносекунд (справа)

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК, ИНДУЦИРОВАННЫХ ТЯЖЕЛЫМИ ИОНАМИ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ Modelling of DNA Damage Repair Induced by Heavy Ions in Mammalian Cells

Васильева М.А., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.

Объединенный институт ядерных исследований, Лаборатория радиационной биологии, г. Дубна, РФ, mal2008@jinr.ru

Тяжелые заряженные частицы при воздействии на клетку способны индуцировать повреждения ДНК разной степени сложности, включая однонитевые и двунитевые разрывы ДНК, повреждения оснований, а также труднорепазируемые кластерные повреждения ДНК. Образование тяжелых повреждений ДНК влечет за собой нарушения генетических структур, что приводит к гибели клеток, а также появлению мутантных форм белков. Поэтому актуальной задачей современной радиобиологии является изучение систем репарации ДНК, направленных на восстановление и поддержание целостности молекулы ДНК после радиационного поражения.

В рамках настоящего исследования предложено математическое описание основных путей репарации повреждений ДНК (репарация однонитевых разрывов ДНК, эксцизионная репарация оснований (BER), негомологичное воссоединение концов (NHEJ)). Для формализации молекулярных механизмов составлена динамическая система из дифференциальных уравнений, описывающая химическую кинетику белковых взаимодействий в соответствии с современными представлениями молекулярной биологии. Численное интегрирование полученных нелинейных дифференциальных уравнений произведено в программном пакете Wolfram Mathematica, который также был использован для анализа и визуализации полученных результатов.

В ходе работы рассчитана временная динамика формирования и репарации ключевых типов повреждений ДНК (повреждения оснований, однонитевые и двунитевые разрывы, кластерные повреждения) в клетках гиппокампа при действии ионов ^{56}Fe ($E=600$ Мэв/нукл). Проведено сравнение выхода и репарации повреждений ДНК при действии ионов ^{12}C ($E=290$ Мэв/нукл) и ^{56}Fe ($E=600$ Мэв/нукл) в дозе 1 Гр.

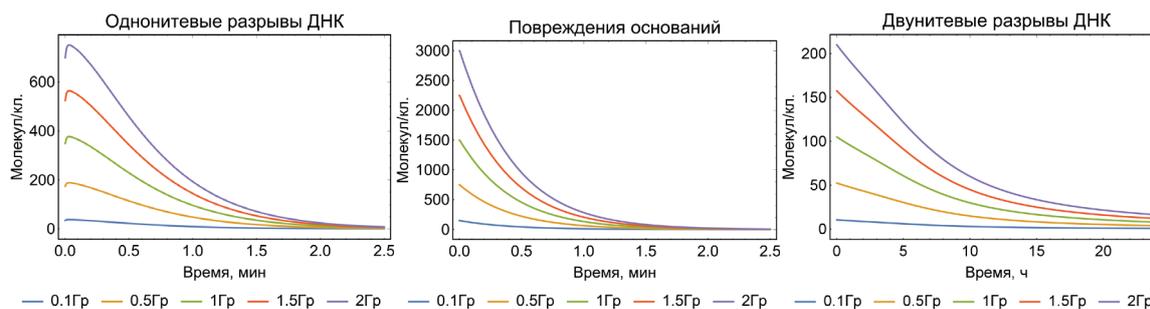


Рисунок 1. Репарация повреждений ДНК, индуцированных при разных дозах ионами ^{56}Fe ($E = 600$ Мэв/нукл)

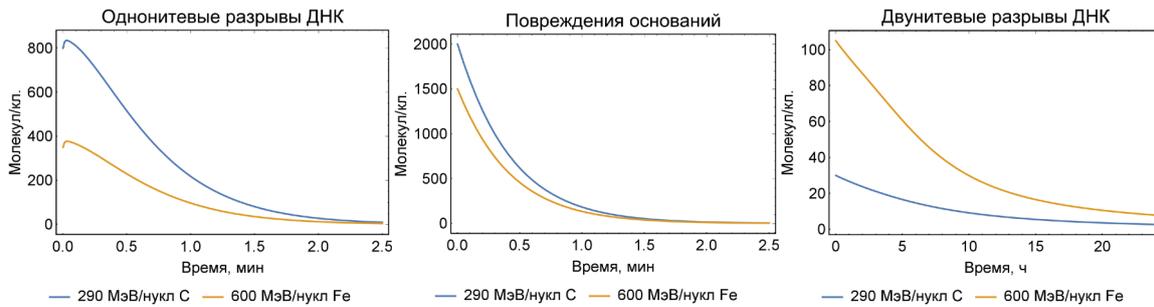


Рисунок 2. Репарация повреждений, индуцированных при дозе 1Гр ионами ¹²C и ⁵⁶Fe

1. Sokhansanj B.A., Wilson D.M. III. Oxidative DNA damage background estimated by a system model of base excision repair // *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, vol. 37, no. 3, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.003.
2. Rouhani M. Modelling the interplay between DNA-PK, Artemis, and ATM in Non-homologous End-joining Repair in G1 Phase of the Cell Cycle // *Journal of Biological Physics*, 2019, vol. 45, no. 2, doi: 10.1007/s10867-018-9519-2.

ЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГЕМОЛИЗЕ И ИХ РЕГУЛЯЦИЯ ОКИСЛИТЕЛЯМИ

Protective Properties of Erythrocytes during Hemolysis and their Regulation by Oxidants

Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г.

Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь, voynarovskiy197@mail.ru

Изучение механизмов адаптации клеток к стрессу и разработка способов регуляции их резистентности к действию физических, химических и биологических повреждающих факторов является актуальной задачей медицинской биофизики. Ключевыми участниками адаптационных процессов клеток являются активные формы кислорода (АФК) – высокореакционные продукты метаболизма кислорода, обладающие широким спектром физиологического и патофизиологического действия [1]. Ранее нами было показано, что при действии пероксида водорода в микромолярных концентрациях наблюдается повышение структурной стабильности мембран и снижение доли гемолизированных эритроцитов [2]. Установлено, что соотношение мембранных комплексов различных окисленных форм гемоглобина определяет гормезисную зависимость ответа эритроцитов на действие пероксида водорода: регуляторное при низких концентрациях и повреждающее при высоких. В настоящем исследовании предложен метод количественной оценки защитных свойств эритроцитов при гемолизе и при их модификации окислителями.

Повышение структурной стабильности мембран эритроцитов, индуцируемое пероксидом водорода, усиливает защитные свойства клеток и, следовательно, уменьшает количество разрушенных при гемолизе клеток. Для количественной оценки защитных свойств использован метод анализа кривых гемолиза эритроцитов на основе обобщенной модели разрушения клеток при действии повреждающего фактора. В предложенной модели гемолиза эритроцитов считается, что скорость разрушения клеток пропорциональна количеству клеток в суспензии (n) и концентрации повреждающего фактора в активном состоянии (c_a). Действие защитных систем клеток в модели учитывается через изменение скорости перехода повреждающего фактора из неактивного состояния (c_n) в активное (c_a). Такой процесс, например, может быть обусловлен скоростью трансмембранного переноса или в случае наночастиц, скоростью высвобождения ими токсичных соединений. Повышение защитных свойств клеток, индуцированное окислителями в концентрации $c_{ок}$ приводит к уменьшению коэффициента активации k_a , что снижает вероятность перехода повреждающего фактора из неактивного состояния (c_n) в активное (c_a). Максимум обусловленного окислителем изменения защитных свойств клеток учитывается путём введения коэффициента защиты k_3 . Скорость достижения максимума определяется коэффициентом k_n , который численно равен концентрации окислителя, при которой эффект достигает половины от максимума. Скорость изменения количества клеток в суспензии регулируется двумя конкурирующими процессами (защиты и разрушения) и может быть описана следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dn}{dt} = -k_p \cdot n \cdot c_a \\ \frac{dc_a}{dt} = (k_a - \frac{k_3 \cdot c_{ок}}{k_n + c_{ок}}) \cdot c_n \\ \frac{dc_n}{dt} = - (k_a - \frac{k_3 \cdot c_{ок}}{k_n + c_{ок}}) \cdot c_n \end{cases} ,$$

где k_p – коэффициент разрушения; k_a – коэффициент активации.

Гемолиз эритроцитов индуцировали наночастицами серебра и нитратом серебра при предварительном инкубировании с пероксидом водорода. Значения коэффициентов определяли на основе экспериментально полученных зависимостей гемолиза эритроцитов с использованием метода наименьших квадратов. Показано, что гемолиз эритроцитов нитратом серебра характеризуется более высокими значениями коэффициентов k_p и k_a и вызывает более быстрое разрушение клеток, чем наночастицы серебра. При этом коэффициенты k_z и k_n не различаются, что свидетельствует об одинаковом механизме увеличения адаптационных свойств.

Предложенный метод анализа защитных свойств клеток позволяет сравнивать адаптационные свойства эритроцитов и определять оптимальные условия для их регуляции внешними факторами.

1. Мартинович Г.Г. Активные формы кислорода в регуляции функций и свойств клеток: явления и механизмы. Минск: БГУ, 2021, 239 с.

2. Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г. Регуляция структурной устойчивости эритроцитов пероксидом водорода: математическая модель и эксперимент // Биологические мембраны, 2022, т. 39, № 1.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСЛОВНОГО ВОЗРАСТА ЭРИТРОЦИТОВ С УЧЕТОМ ПРОЦЕССА ВЕЗИКУЛЯЦИИ

Age Determination of Red Blood Cells Based on Vesiculation

Гисич А.В., Ястребова Е.С., Мальцев В.П.

Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, РФ, a.gisich@g.nsu.ru

В течение своего срока жизни эритроцит циркулирует в кровотоке 100–120 дней. Старение эритроцита приводит к уменьшению многих его морфологических и физиологических параметров: форма эритроцита изменяется с двояковогнутого дискоцита на сфероцит, объем и содержание гемоглобина уменьшаются на 30% и 20% соответственно, а концентрация гемоглобина увеличивается на 14%. В дополнении к уменьшению содержания гемоглобина площадь поверхности и содержание липидов в равной степени уменьшаются на 20%, в то время как отношение поверхности к объему увеличивается. Старые эритроциты также обладают пониженной деформируемостью за счет повышения концентрации гемоглобина и, возможно, повышения жесткости мембраны. Данные изменения эритроцитов происходят главным образом за счет процесса везикуляции, который тесно связан со старением, жизнеспособностью и гибелью клеток. Известно, что у здоровых людей везикулы быстро удаляются из кровотока, тогда как при некоторых патологиях концентрация везикул может изменяться.

Таким образом, построение возрастных распределений является важным инструментом для диагностики заболеваний, связанных как с морфологическими, так и физиологическими нарушениями эритроцитов. К сожалению, существующие методы определения возраста эритроцитов недоступны в качестве простого и быстрого инструмента для скрининга состояния здоровья. В большинстве из них используется флуоресцентная или радиоактивная изотопная метка, что является долгим и довольно сложным методом, который особенно неудобен в случаях срочной необходимости анализа возрастных показателей. Более того, возрастное распределение, полученное с помощью методов меченя, не имеет зависимости с важными морфологическими изменениями эритроцита в процессе старения или процессом везикуляции.

Целью данной работы являлся поиск оптимального алгоритма расчета возраста эритроцитов, основанного на модели старения эритроцитов, включающей в себя изменения морфологии эритроцитов при везикуляции. Для достижения данной цели были выполнены следующие задачи:

1. Проанализирована морфология эритроцитов с помощью, сканирующей проточной цитометрии, позволяющей измерить основные морфологические характеристики одиночных эритроцитов;
2. Разработан оригинальный алгоритм оценки условного возраста одиночных эритроцитов;
3. Алгоритм применен на симулированных и экспериментальных данных для 50 условно здоровых доноров.

В результате работы был предложен новый методологический подход к измерению возраста одиночных эритроцитов, построены возрастные распределения для 50 доноров и вычислены референсные значения восьми эритроцитарных показателей категории старения; данные приведены в таблице 1.

Таблица 1. Возрастные эритроцитарные показатели (50 доноров)

| № | Название показателя | | Индекс | Среднее (SD) | Референсный интервал |
|---|--------------------------|--------------|---------|--------------|----------------------|
| 1 | Возраст эритроцитов, дни | Среднее | MCAg | 68, (7,4) | 53,5 – 81,6 |
| 2 | | SD | AgD-SD | 35,3 (3,0) | 29,6 – 39,7 |
| 3 | | Симметрия, % | AgD-SYM | 55 (15) | 26 – 80 |

| № | Название показателя | Индекс | Среднее (SD) | Референсный интервал |
|---|---|-----------|--------------------------------|----------------------------------|
| 4 | Среднесуточные акты везикуляции, день ⁻¹ | M_d | 6,8 (2,1) | 2,4 – 11,3 |
| 5 | Средняя потеря объема эритроцитов, фл | V_{add} | 0,053 (0,016) | 0,015 – 0,081 |
| 6 | Переходный возраст, дни | AgR | 66 (19) | 35 – 93 |
| 7 | Начальный индекс сферичности | SI_0 | 0,611 (0,051) | 0,525 – 0,691 |
| 8 | Суточные акты везикуляции всеми эритроцитами, (мл × день) ⁻¹ | TN_d | 32,4 (10,4) × 10 ¹⁰ | (13,8 – 51,7) × 10 ¹⁰ |

ВЛИЯНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ТРИПТОФАНА В СОСТАВЕ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА БЫКА НА ЕГО СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ В ОБЛАСТИ ДЛИН ВОЛН 130-230 НМ

Influence of the Features of the Spatial Structure of Tryptophan in the Composition of Bois Serum Albumin on the Spectral Characteristics in the 130-230 nm Wavelength Region

Глаголева Е.П., Артюхов В.Г. Лесных И.Е. Колтаков И.А.

Воронежский государственный университет, г. Воронеж, РФ, koltakov@bio.vsu.ru

Аминокислоты, относящиеся к наиболее важным органическим соединениям, будучи структурными единицами белков, являются предметом пристального внимания исследователей. К таким, например, относится бычий сывороточный альбумин, состоящий из 607 аминокислотных остатков.

Так, электронный спектр поглощения БСА представляет собой суперпозицию рассчитанных электронных спектров аминокислотных остатков. При подробном изучении белка было установлено, что основные спектральные полосы поглощения белка обусловлены такими аминокислотами как тирозин, триптофан, фенилаланин, пролин, гистидин, глицин, метионин.

Множественные исследования влияния этих аминокислот на состояние белковых макромолекул проводились в пределах видимого света, длинно- и средневолнового УФ-излучения. Актуальность данной работы основывается на необходимости выяснения вклада отдельных аминокислот под влиянием вакуумного УФ-излучения с длиной волны квантов менее 200 нм, что имеет важное значение для выяснения физико-химических основ и закономерностей его биологического действия.

Пространственная структура молекулы альбумина была взята из базы PDB.org, после чего было проведено картирование расположения тирозина в составе его полипептидной цепи.

Было установлено, что 20 остатков тирозина локализуются в виде 3-х ядер в составе доменов молекулы белка. Особенностью изученной нами пространственной структуры является факт расположения 2-х остатков тирозина близко к поверхности белка.

При вычислениях стартовой геометрии трипептидов основанием выбран метод молекулярной механики (BIO+ / CHARMM). Выбор метода BIO+ обоснован тем, что он разработан для органических молекул, учитывает потенциальные поля, формируемые всеми атомами рассчитываемой системы, и позволяет гибко модифицировать параметры расчета в зависимости от конкретной задачи. Для квантово-химических методов расчета молекулярных характеристик использовался полумпирический метод PM3 (на основе метода Хартри–Фока). Он позволяет создавать пространственные трехмерные модели молекул полимеров, оптимизировать их конформации в вакууме и выполнять расчеты необходимых молекулярных параметров. Электронные спектры вычислены в рамках спектрального приближения ZINDO/S. Это параметризованный метод для воспроизведения УФ и видимых оптических переходов при учете конфигурационных взаимодействий.

В каждом из показателей наблюдается смещение интенсивности и максимумов поглощения за счет смещения электронной плотности внутри аминокислоты, что доказывается изменением длин связей $C\alpha$ – бензольное кольцо, бензольное кольцо-ОН-радикал (табл. 1).

Таблица 1. Динамика изменения длин связей ключевых функциональных групп трипептидов

| Трипептид | Y | EYA | NYA | CYA | YYA | FYA |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Ca - бензол | 2,5148 | 2,6929 | 2,5147 | 2,5101 | 2,5064 | 2,5098 |
| бензол - OH | 1,3673 | 1,3664 | 1,3662 | 1,367 | 1,3663 | 1,3675 |

Таким образом, можно предположить, что вакуумное УФ-излучение оказывает существенное влияние на структуру молекул сывороточного альбумина. Изменения оптической плотности в области 140-200 нм свидетельствует о том, что под действием квантов используемого нами участка спектра УФ-диапазона электромагнитного излучения происходит серия конформационных изменений, затрагивающих как структуру, так и локализацию исследуемого нами потенциального хромофора.

1. Нгуен В.Х., Артюхов В.Г., Колтаков И.А. Исследование спектральных характеристик тонких пленок сывороточного альбумина быка в условиях воздействия вакуумного УФ-излучения // Вестник Воронежского Государственного Университета: Серия Химия Биология Фармация, 2018, № 2, с. 197-204.

2. Reiher W.E. Theoretical studies of hydrogen bonding: PhD Thesis/dissertation, Manuscript. Harvard University, 1985, 413 p.

БЕЛКИ КАПСИДА ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА НОВЫХ ВИРУСОВ, КАК ОБЪЕКТЫ ДЛЯ КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Capsid Proteins of Potentially Pathogenic for Humans New Viruses as Objects for Crystallographic Investigation by the Synchrotron Radiation

Гладышева А.В.¹, Гладышева А.А.^{1,2}, Терновой В.А.¹, Агафонов А.П.¹

¹ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, РФ

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, РФ, gladyшева_av@vector.nsc.ru

В последние десятилетия проблема появления новых вирусных инфекций стала представлять серьезную угрозу для общественного здравоохранения. По оценке специалистов, в настоящее время вирусологам известно не более 0,01% всего вирусного разнообразия. Для создания эффективных вакцин и терапевтических противовирусных препаратов необходимо знать тонкое устройство вириона и специфику взаимодействия вирусных белков с различными клеточными структурами. Рентгеноструктурный анализ является преимущественным методом, используемым для получения трехмерных структур вирусных белков. На июнь 2022 года база данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) содержит ~ 4,4 миллиона полногеномных вирусных последовательностей, а база данных белковых структур PDB (<https://www.rcsb.org>) содержит ~ 5,3 тысячи вирусных белков. Разрыв между количеством известных белков и количеством известных структур огромен. Во многих случаях могут помочь методы компьютерного моделирования пространственных структур, но для получения надежных результатов необходимо иметь гомологичную структуру с уровнем идентичности более 30%, полученную экспериментально, что невозможно, когда речь идет о недавно открытых новых вирусах.

В ходе данной работы были проанализированы геномы 4-х новых вирусов *Beiji nairovirus*, *Yezo virus*, *Sulina virus* и *Iguape virus*. Первые полногеномные последовательности этих вирусов в международной базе данных GenBank появились только в 2021, а информация о структурных особенностях вириона и вирусных белков на данный момент отсутствует. В качестве объектов для кристаллографического исследования были выбраны структурные белки вириона этих вирусов. На первом этапе работы был произведен поиск имеющихся гомологичных структур по базе данных PDB в BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Все выбранные объекты не превышали уровень идентичности по аминокислотной последовательности 30%. При помощи программы PROTOMENAL (<https://protomenal.com>) были предсказаны предполагаемые вирусные домены и отобраны однодоменные структуры. Таким образом, для *Beiji nairovirus* был взят полноразмерный белок нуклеокапсида (552 аминокислоты); для *Yezo virus* – полноразмерный белок нуклеопротеина (502 аминокислоты); для *Sulina virus* – полноразмерный белок нуклеопротеина (503 аминокислоты); для *Iguape virus* – домен нуклеокапсида длиной 223 аминокислоты. Далее было произведено моделирование трехмерных структур отобранных вирусных белков в программе AlphaFold (Рисунок 1). Все модели являлись высокоструктурированными. Коэффициент достоверности построения моделей rLDDT варьировал от 51,67 до 86,85 для разных вирусов. Это свидетельствует о том, что предсказательный метод не дает точных результатов, чтобы модели можно было использовать для детального аннотирования функциональных вирусных районов и данные объекты требуют непосредственно экспериментальных методов в решении структуры данных вирусных. Таким образом, белки капсида *Beiji nairovirus*, *Yezo virus*, *Sulina virus* и *Iguape virus* являются хорошими объектами для кристаллографического исследования методом синхротронного излучения.

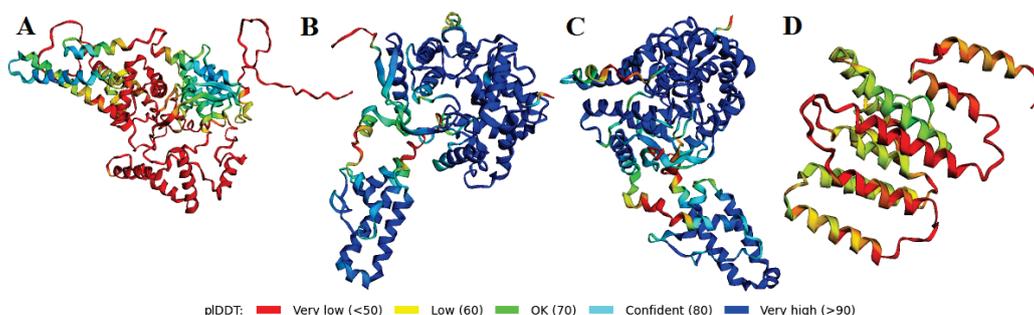


Рисунок 1. Трехмерные структуры вирусных белков капсида с цветовым кодированием коэффициента достоверности моделей pLDDT. А – Beiji nairovirus. В – Yezo virus. С – Sulina virus. D – Iguape virus

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355), в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019-2027 годы.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУР ВИРУСНЫХ БЕЛКОВ И ПОИСК ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ РЕГИОНОВ НОВОГО МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ВИРУСА KINDIA TICK VIRUS

Simulation of Viral Proteins Structures and Search for Functionally Significant Regions of a New Multicomponent Kindia Tick Virus

Гладышева А.А.^{1,2}, Гладышева А.В.¹

¹ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, РФ,

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, РФ, glastas707@gmail.com

Kindia tick virus (KITV) – новый сегментированный флавиподобный вирус группы Jimgenvirus (JMV), переносимый клещами. Его принципиальное отличие от «классических» флавивирусов – наличие многокомпонентного сегментированного (+) ssRNA генома, представленного 4-мя отдельными сегментами, предположительно располагающихся в отдельных вирусных частицах. Сегменты 1-3 несут по одной протяженной открытой рамки считывания (ORF) и кодируют белки NS5, VP1, NS3 соответственно, а сегмент 4 обладает двумя ORF и кодирует белки VP2, VP3.

На сегодняшний день сегментированные флавиподобные вирусы распространены почти на всех континентах Земли. Более того, показана их патогенность для человека. Однако данных о пространственном устройстве генома этих потенциально опасных вирусов крайне мало. Так, в базе данных PDB можно найти информации только о структуре хеликазного домена белка NS3 вируса Alongshan. Экспериментальное получение пространственных структур белков до сих пор остается достаточно трудоемкой и часто непредсказуемой работой. Но с помощью современных методов моделирования, можно получить их модели, анализ которых приблизит нас к пониманию функций вирусных белков KITV.

В данном исследовании с помощью программы AlphaFold2 было выполнено моделирование пространственных структур и поиск функционально значимых регионов вирусных белков двух штаммов KITV: KITV/2018/1 и KITV/2018/2, обнаруженных в клещах на территории Гвинейской республики в 2018 году.

Исходя из высоких значений коэффициентов достоверности полученных моделей неструктурных белков, они были отобраны для дальнейшего анализа, в ходе которого был установлен их высокий уровень топологического сходства с пространственными структурами белков NS3 и NS5 вируса Зика при низком уровне гомологии между их аминокислотными последовательностями. У белка NS5 были обнаружены домены метилтрансферазы и РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp). В RdRp были определены субдомены пальцев, ладони и большого пальца, а также мотивы А, В, С, Е. У белка NS3 был идентифицирован домен DEXHc_viral_Ns3 и мотивы I (Walker A), Ia, II (Walker B), III, IV, IVa, V, VI. Также были картированы обнаруженные аминокислотные замены в белках NS5 и NS3 между штаммами KITV. Установлено, что они локализируются у белка NS5 в положениях: 135 – альфа спираль 5 (α -5); 217 – петля между α -8 и бета листом 7 (β -7); 233 – α -9; 674 – α -27; 908 – α -37; у белка NS3 в положениях: 476 – петля между β -7 и β -8; 625 – петля между α -10 и β -16; 673 – α -13.

Низкие коэффициенты достоверности для моделей белков VP1, VP2, VP3 свидетельствовали о нецелесообразности дальнейшего анализа их моделей и необходимости применения экспериментальных методов изучения, в частности метода синхротронного излучения, требующего кристаллизации вирусных белков. В качестве объекта для кристаллизации был выбран фрагмент VP1, соответствующий b домену VP1

(251 аминокислотный остаток). Для получения плазмиды, позволяющей проводить наработку рекомбинантного белка фрагмента VP1, в эукариотической культуре клеток, в плазмиду рсDNA3 был клонирован синтетический фрагмент VP1 длиной 753 нуклеотида. После отбора клонов, содержащих целевую вставку фрагмента VP1, была получена челночная плаزمиды рсDNA-KITV-VP1, которая в дальнейшем будет использована для получения вирусных белков.

Таким образом в ходе данной работы, с помощью современных методов моделирования, еще до экспериментального получения пространственных структур, были получены трехмерные модели вирусных белков NS3 и NS5. Проведены их анализ и сравнение со структурами белков «классических» флавивирусов, выявившие высокий уровень топологического сходства и наличие функциональных регионов характерных для «классических» флавивирусов. Дальнейший углубленный анализ может приблизить нас также к разработке вакцин и противовирусных препаратов против сегментированных флавиподобных вирусов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355), в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019-2027 годы.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТОРСИОННОГО МОМЕНТА НА ДИНАМИКУ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ПУЗЫРЯ В ПЛАЗМИДЕ рPF1 СО ВСТАВКАМИ ПРОМОТОРСОДЕРЖАЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ИЗ *E. COLI*

Mathematical Modeling of the Influence of Torsion Torque on the Dynamics of Transcription Bubble in the рPF1 Plasmid with Insertions of Promoter Containing Sequences from *E. coli*

Гриневиц А.А., Масулис И.С., Якушевич Л.В.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пушкино, РФ, grin_aa@mail.ru

Плазмиды рPF1, полученная из плазмиды рЕТ-28b, содержит три гена: ген зеленого белка Egfp, расположенный на комплементарной нити, ген красного белка mCherry, расположенный на основной нити, и ген устойчивости к канамицину Kan, расположенный на основной нити, а также нефункциональные области, разделяющие гены. Плазмиды позволяют одновременно регистрировать транскрипцию РНК в двух направлениях, инициированную на участках последовательности между генами флуоресцентных белков. Экспериментально было показано, что среди предсказанных с помощью текстового анализа множественных стартов транскрипции на фрагменте из регуляторной области гена *arrY* последовательности генома *E. coli*, вставленной в рPF1 в область между генами флуоресцентных белков, работают только по 1 промотору на каждой из нитей (P1 и P2). Это было показано для прямой и обратно комплементарной вставки исследуемого фрагмента. Известно, что торсионный момент (ТМ) играет важную роль в инициации транскрипции РНК. Физические механизмы и роль динамических параметров нуклеотидов в участии локального или глобального ТМ в процессе транскрипции остается не ясной. Поэтому целью работы было изучить воздействие ТМ на динамические характеристики транскрипционного пузыря в плазмиде рPF1, формируемого в области между генами флуоресцентных белков с использованием фрагмента ДНК *E. coli*.

Для моделирования конформационной подвижности ДНК и динамики транскрипционного пузыря использовался аппарат нелинейной математики и, в частности, свойства нелинейного уравнения синус-Гордона и его одно-солитонных решений – кинков. Динамика кинка рассматривалась в трех областях: ген Egfp (r1), промежуточная область (r2), ген mCherry (r3). Моделировалось два случая вставки в r2 фрагмента ДНК *E. coli*: прямая – “Red”, обратно комплементарная – “Green”. Были рассчитаны энергетические профили модифицированной плазмиды и получены траектории кинка с начальной точкой возбуждения в середине r2. В модели кинк двигался в сторону mCherry по основной нити и в сторону Egfp по комплементарной. В конфигурации “Red” промотор P1 располагался на основной нити, а P2 на комплементарной. В конфигурации “Green” их положение менялось: P1 располагался на комплементарной нити, а P2 на основной.

Расчеты показали следующие результаты. В случае “Red” для P1 для преодоления энергетического барьера и перехода кинка из r2 в r3 необходимый пороговый ТМ был $M_{\tau} = 16.50 \times 10^{-23}$ Дж. Для той же вставки, но для P2 необходимый пороговый ТМ для перехода из r2 в r1 был $M_{\tau} = 21.25 \times 10^{-23}$ Дж. Траектории для пороговых ТМ показали, что кинк сильно снижал свою скорость на границах r2, а после преодоления барьеров, снова увеличивал скорость, которая стремилась к соответствующему стационарному значению. Поведение кинка для P1 с таким же пороговым ТМ как для P2 показало, что кинк быстрее достигал границы r2, а его скорость на границе увеличивалась в 3.9 раза. В случае вставки “Green” с изменением положений промоторов пороговые торсионные моменты, необходимые для преодоления энергетических барьеров на границах, изменялись. Для кинка на основной нити с P2 пороговый ТМ был выше, чем ТМ для обоих промоторов в конфигурации “Red” $M_{\tau} = 23.25 \times 10^{-23}$ Дж. Наоборот, для комплементарной нити с P1, значение порогового ТМ $M_{\tau} = 14.50 \times 10^{-23}$ Дж

было ниже, чем аналогичный для обоих промоторов в конфигурации "Red". Приложение такого же высокого порогового ТМ как для кинка на основной нити с P2 к кинку на комплементарной нити с P1, приводило к сокращению времени достижения границы r_2 и многократному в 8.6 раза увеличению скорости ее преодоления. Поведение кинков в конфигурациях "Red" и "Green", но для одинаковых промоторов и одинаковых максимальных значений порогового ТМ показало, что в конфигурации "Green" кинк на комплементарной нити с P1 под воздействием ТМ, являющегося пороговым в конфигурации "Red", быстрее достигал границы r_2 и в 2,5 раза увеличивал скорость на ней по сравнению с кинком в конфигурации "Red" на основной нити с тем же промотором и ТМ. Аналогичная ситуация наблюдалась в конфигурации "Red" для кинка, двигающегося по комплементарной нити с P2. Там скорость преодоления границы увеличивалась в 4,9 раза по сравнению с основной нитью в конфигурации "Green".

Сравнение теоретических данных и экспериментальных по анализу силы промоторов показало, что, в целом, более сильным промоторам соответствуют более низкие ТМ. Это свидетельствует об их большей конформационной эффективности в процессе инициации транскрипции.

Таким образом, разработанная и использованная нами математическая модель конформационной динамики транскрипционного пузыря показала значимую роль динамических свойств нуклеотидов и их соотношений для промоторных и генсодержащих участков генома в транскрибировании генетической информации под воздействием локальной или глобальной суперскрученности.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ ДИПЕПТИДА КАРНОЗИНА МЕТОДОМ DFT

Theoretical Quantum Chemical Modeling of the Structure and Properties of Carnosine Dipeptide by DFT Method

Демухамедова С.Д.

Институт проблем физики, Бакинский государственный университет, г. Баку, Азербайджан,
svetlanabest@mail.ru

Объектами нашего исследования на протяжении многих лет являются молекула карнозина (β -аланил-L-гистидин), ее производные анзерин и гомокарнозин и их комплексы с переходными металлами. Карнозин - природный дипептид, два аминокислотных остатка которого связаны пептидной связью. Он играет значимую биологическую и функциональную роль в организме человека, выполняя важные физиологические функции и защищая клетки и ткани организма от окисления активными формами кислорода [1]. Антиоксидантные свойства карнозина обеспечивают его успешное применение при лечении различных воспалительных процессов, протекающих на фоне повреждения клеточных мембран. За последнее десятилетие выявлено много новых свойств карнозина, пригодных для терапевтического применения, расширены доказательства положительной роли карнозина в замедлении процессов старения, при неврологических болезнях, заболеваниях печени и почек, при диабете. В настоящее время имеются сведения об использовании карнозина в терапии онкологических заболеваний и нарушениях иммунной системы. Карнозин не токсичен и не накапливается в органах [1], открывая перспективы в создании новых лекарственных препаратов на его основе.

Многообразие биологических функций карнозина определяется его пространственным и электронным строением. Механизм действия карнозина на молекулярном уровне до сих пор окончательно не выяснен. Все вышесказанное подтверждает целесообразность дальнейшего исследования структуры карнозина. Квантово-химические расчеты являются хорошим инструментом для проектирования новых материалов с заранее заданными свойствами.

В данной работе квантовохимическим методом в рамках теории функционала электронной плотности DFT с гибридным трехпараметрическим функционалом B3LYP исследовано пространственное и электронное строение и колебательные спектры природного дипептида карнозина в таутомерной форме N^3H его имидазольного кольца в газовой и в водной средах. Для расчета использовался достаточно надежный и экономичный по времени расчета расширенный базисный набор с учетом поляризационных и диффузных функций 6-31+G (d, p). Все вычисления выполнены с использованием пакета прикладных компьютерных программ Gaussian 09 [2]. Для визуализации полученных результатов использована программа GaussView 6.0.16 [3]. Расчеты проводились с целью исследования структурных, электронных и колебательных свойств дипептида карнозина.

В работе изложены результаты оптимизации дипептида карнозина – геометрические параметры, значения электронной энергии, энергии HOMO и LUMO орбиталей и энергетический зазор между ними, значения дипольных моментов, величины парциальных зарядов на атомах. На основе значений энергий граничных орбиталей вычислены глобальные дескрипторы реакционной способности карнозина, коррелирующие с его конкретными физико-химическими свойствами – электроотрицательность, химическая жесткость, электрофильность, максимальный перенос заряда и др. Отсутствие мнимых частот при расчете колебательных спектров карнозина подтверждает нахождение глобальных минимумов при оптимизации структуры. Получены частоты, интенсивности и построены теоретические ИК спектры карнозина для газовой и водной сред. Расчеты

показывают, что предложенная модель молекулы образует стабильную структуру. Стабилизация полученной структуры обеспечена за счет образования нековалентных взаимодействий и водородных связей в дипептиде. Карты молекулярного электростатического потенциала МЕР построены для определения потенциальных сайтов связывания. Для исследования внутримолекулярных взаимодействий, определяющих образование водородных связей и стабильность молекулы был проведен анализ орбиталей естественных связей (NBO). Проанализированы структурные перестройки и изменения различных параметров в зависимости от диэлектрической проницаемости среды.

1. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine // *Physiological Reviews*, 2013, vol. 93, no. 4, pp. 1803-1845, doi: 10.1152/physrev.00039.2012.
2. Frisch M.J. et al. Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.
3. Dennington, R., Keith, T., and Millam, J. Gauss View, Version 6.0.16. Shawnee, Kansas: Semichem Inc., Shawnee Mission, 2016.

ВОЗНИКНОВЕНИЕ ЗОН ОТКРЫТЫХ СОСТОЯНИЙ В МОЛЕКУЛЕ ДНК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЛОКАЛИЗАЦИИ И ВЕЛИЧИНЫ ТОРСИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ Appearance of Zones of Open States in a DNA Molecule Depending on Localization and Value of Torsion Influence

Елкина А.А.^{1,2}, Дроботенко М.И.¹, Джимаков С.С.^{1,2}

¹ Кубанский государственный университет, г. Краснодар, РФ

² Южный научный центр РАН, г. Ростов-на-Дону, РФ, 013194@mail.ru

Образование и динамика открытых состояний двухцепочечной молекулы ДНК в значительной степени определяются ее механическими параметрами. Основным из них является торсионный момент. Однако, экспериментальное исследование динамики ДНК и возникновения открытых состояний ограничено пространственным разрешением доступных биофизических инструментов. Поэтому в данной работе на основе механической математической модели ДНК были проведены расчеты влияния торсионного момента на процесс возникновения и динамики открытых состояний для гена интерферона альфа 17 [1-3]. Показано, что торсионное воздействие приводит к возникновению вращательных движений азотистых оснований. Это влияние нелинейно и увеличение амплитуды торсионного воздействия не приводит к автоматическому увеличению амплитуды вращательных движений и увеличению зон открытых состояний (рис. 1).

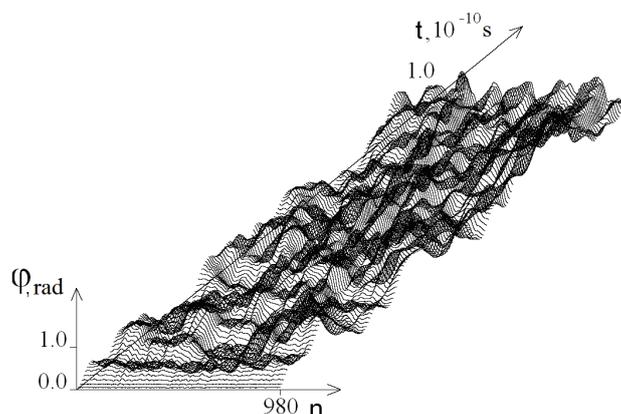


Рисунок 1. График угловых отклонений 1-й цепочки молекулы ДНК при $M_0 = 13,172$ на отрезке времени $[0, T_0]$.

Расчеты с постоянным торсионным моментом показывают, что зоны открытых состояний чаще образуются на границах молекулы ДНК и на участках с преобладанием пар А - Т. Показано, что для возникновения открытых состояний в части гена, в которой содержится малое количество пар А - Т требуется большая величина торсионного момента. При воздействии торсионного момента на определенный участок гена вероятность образования открытых состояний зависит от содержания пар А - Т на этом участке, от размера этого участка и от времени воздействия. Для данной математической модели зоны открытых состояний могут закрываться при прекращении торсионного воздействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Кубанского научного фонда (проект Н-21.1/11), гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (проект МК-2366.2022.1.4) и государственного задания ЮНЦ РАН № 122020100351-9.

1. Якушевич Л.В., Краснобаева Л.А. Вынужденные колебания оснований ДНК // Биофизика, 2016, т. 61, № 2, с. 286-296.
2. Svidlov A.A., Drobotenko M.I., Basov A.A., Elkina A.A., Gerasimenko E.O., Malyshko V.V., Baryshev M.G., Dzhimak S.S. Influence of the $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotope composition of the water environment on the probability of denaturation bubble formation in a DNA molecule // Physics of Wave Phenomena, 2021, vol. 29, no. 2, pp. 180-185.
3. Елкина А.А., Яковенко Н.А., Барышев М.Г., Малышко В.В., Лясота О.М., Джимак С.С. О механизмах, обуславливающих влияние модификации изотопного состава сред на физические параметры гетерогенных систем // Экологический вестник научных центров Черноморского экономического сотрудничества, 2020, т. 17, № 4, с. 33-42.

МОДЕЛИ, ОПИСЫВАЮЩИЕ ПРОВЕДЕНИЕ НЕРВНОГО ИМПУЛЬСА Models Describing Nerve Pulse Transaction

Эрнандес Касерес Х.Л.¹, Джимак С.С.^{2,3}, Дроботенко М.И.², Свидлов А.А.^{2,3}, Кудрявцев Д.И.²,
Нечипуренко Ю.Д.^{4,5}

¹ Кубинский Центр Нейронаук, г. Гавана, Куба

² Кубанский государственный университет, г. Краснодар, РФ, *mdrobotenko@mail.ru*

³ Южный научный центр РАН, г. Ростов-на-Дону, РФ

⁴ Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ

⁵ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, г. Москва, РФ

Проблема возбудимости и проведения нервного импульса – одна из центральных в биофизике. Попытки ее решить сопровождались разработкой передовых экспериментальных и теоретических подходов и методик. Несмотря на бесспорные успехи в этой области, еще не разработана теория, способная описать с единых позиций все экспериментально наблюдаемые процессы, протекающие при генерации и распространении нервного импульса. В последние 70 лет в этой области доминировала теория Ходжкина–Хаксли, благодаря которой удалось описать большинство электрических явлений, сопровождающих потенциал действия. Подход, предложенный Ходжкиным и Хаксли, привел к внедрению таких методов, как измерение «воротных» токов смещения, пэтч-кламп, исследование функциональной активности нервной ткани, развитию оптогенетики, а также методов моделирования активности мозга «снизу вверх» [1].

Однако существует ряд фактов и данных, которые не укладываются в теорию Ходжкина–Хаксли (например, адиабатическое и обратимое изменение температуры нерва, изменение упругости липидного бислоя вместе с обратимым утолщением нерва, фазовый переход в липидном бислое, а также наличие кооперативных явлений между ионными каналами. Появление таких данных привело к разным реакциям среди биофизиков – от предложения альтернативных теорий, отождествляющих потенциал действия с механическим солитоном, при котором ионные каналы играют лишь второстепенную роль, до необходимости пересматривать молекулярные механизмы ионной проницаемости мембраны. Разработка полноценной (универсальной) модели для нервного импульса будет зависеть от корректного понимания сопровождающих его биофизических процессов. В то же время от успеха в построении такой модели будет зависеть успех многих конкретных задач нейрофармакологии и других нейронаук [2, 3]. Здесь мы обсуждаем «сильные» и «слабые» стороны различных подходов и намечаем возможные пути к универсальной биофизической модели нервной возбудимости, а также уделяем внимание идеям С.Э. Шноля о механизмах возбудимости с точки зрения биологической эволюции.

Модель Ходжкина–Хаксли стимулировала разработку новых экспериментальных и теоретических подходов в биофизике мембран. В свете новых результатов, было предложено несколько модификаций оригинальной модели. В то же время группа авторов разработала модель механического солитона, согласно которой нервный импульс и есть неубывающая механическая волна, ассоциированная с фазовым переходом в липидном бислое. Мы считаем, что многие из аргументов сторонников теории механического солитона могут найти рациональное объяснение и в рамках подхода Ходжкина–Хаксли. Не отрицая возможности возникновения солитонов при проведении нервного импульса, мы считаем, что электрические проявления нервного импульса остаются главными. Возможно, что унифицированную модель для генерации и распространения нервного импульса, учитывающую все доселе известные экспериментальные данные, удастся получить путем дальнейшего развития модели Ходжкина–Хаксли. При этом следует учитывать: 1) зависимость емкости мембраны от мембранного потенциала; 2) кооперативные взаимодействия как между активирующими/инактивирующими частицами внутри одного канала, так и между разными каналами; 3) влияние сжатия/растяжения мембраны при изменении мембранного потенциала на разные аспекты белково-липидных взаимодействий и на фазовые переходы в бислое. Такой подход в моделировании может привести и к новым идеям экспериментов, и к новым результатам.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (тема 121052600299-1) и государственного задания ЮНЦ РАН (№ 122020100351-9).

1. Huxley A.F. The quantitative analysis of excitation and conduction in nerve: Nobel Lecture, December 11, 1963. In: Nobel Lectures: Physiology or Medicine 1963-1970. Elsevier: Amsterdam.
2. Kravtsov A., Kozin S., Basov A., Baryshev M., Elkina A., Dzhimak S., Malyshko V., Butina E., Moiseev A. Reduction of deuterium level supports resistance of neurons to glucose deprivation and hypoxia: study in cultures of neurons and on animals // *Molecules*, 2022, vol. 27, no. 1, p. 243.
3. Kozin S., Skrebitsky V., Kondratenko R., Kravtsov A., Butina E., Moiseev A., Malyshko V., Baryshev M., Elkina A., Dzhimak S. Electrophysiological Activity and Survival Rate of Rats Nervous Tissue Cells Depends on D/H Isotopic Composition of Medium // *Molecules*, 2021, vol. 26, no. 7, p. 2036.

ВЛИЯНИЕ ВНЕШНЕГО СИЛОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНОЙ ЧАСТОТЫ НА ДИНАМИКУ МОЛЕКУЛЫ ДНК

Influence of External Force Influence of Different Frequency on the Dynamics of a DNA Molecule

Елкина А.А.^{1,2}, Дроботенко М.И.¹, Свидлов А.А.^{1,2}

¹ Кубанский государственный университет, г. Краснодар, РФ, 013194@mail.ru

² Южный научный центр РАН, г. Ростов-на-Дону, РФ

Механические модели играют важную роль для теоретического исследования внутренней подвижности молекулы ДНК. В этом случае основания ДНК представляют в виде маятников, а взаимодействия между основаниями описывают с помощью замены водородных связей на упругие связи. Такой подход был предложен в работе, последующие исследования позволили развить механическую модель описания динамики ДНК с учетом разнообразных форм внешнего воздействия, различными эффектами диссипации и неоднородностью самой макромолекулы [1-3].

В настоящей работе в рамках механической модели без упрощений исследовано влияние различной частоты внешнего периодического воздействия на динамику молекулы ДНК. Для моделирования динамики молекулы ДНК будем использовать математическую модель, описывающую вращательное движение азотистых оснований вокруг сахара-фосфатной цепочки. Для построения такой модели используется аналогия между молекулой ДНК и механической системой, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников.

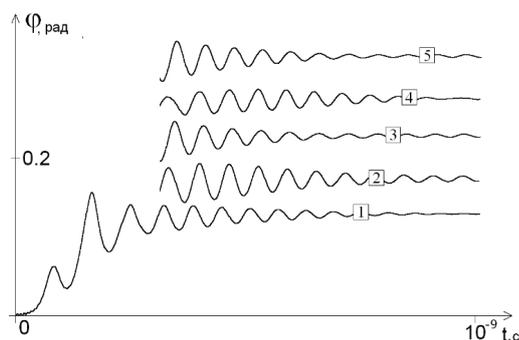


Рисунок 1. График (со сдвигом по вертикали) средних угловых отклонений 1-й цепочки ДНК при $p=6$ исходной ДНК (1) и фрагменты графиков для ДНК с заменой: 2 – с заменой 40А, 3 – 40Т, 4 – 40С, 5 – 40С.

Прежде всего данные, представленные в работе, демонстрируют зависимость частоты и амплитуды собственных колебаний молекулы ДНК как от специфичной последовательности нуклеотидов (на примере гомологичных участков каждого типа азотистых оснований), так и от различной длины гомологичных последовательностей. При этом на рисунке 1 показано, что величина средних угловых отклонений 1-й цепочки возрастает в молекуле ДНК, имеющей замену в них азотистых оснований в середине (с 470-го по 510-й нуклеотид) для участков длиной 40 нуклеотидов в следующем ряду: $40С > 40С > 40Т > 40А$. Кроме того, все они превышают величину средних угловых отклонений исходной молекулы ДНК, имеющей гетерогенную последовательность азотистых оснований. В целом, эти данные свидетельствуют как о меньшей (на 24 % и более) чувствительности гетерогенных последовательностей молекулы ДНК к внешним периодическим силовым воздействиям, так и большей уязвимости участков, имеющих азотистые основания с тремя водородными связями (цитозин и гуанин) по сравнению с последовательностями сформированными из аденина и тимина, средних угловых отклонений которых были в 1,2–1,9 раза ниже, чем у молекул с заменой 40 подряд азотистых оснований исключительно на цитозин и гуанин, содержащие по 3 водородные связи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Кубанского научного фонда (проект Н-21.1/11), гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (проект МК-2366.2022.1.4) и государственного задания ЮНЦ РАН № 122020100351-9.

1. Якушевич Л.В., Краснобаева Л.А. Вынужденные колебания оснований ДНК // Биофизика, 2016, т. 61, № 2, с. 286-296.
2. Дроботенко М.И., Джимаков С.С., Свидлов А.А., Басов А.А., Лясота О.М., Барышев М.Г. Математическая модель двухцепочечной молекулы ДНК с учетом открытых состояний // Биофизика, 2018, т. 63, № 2, с. 258-264.
3. Svidlov A., Drobotenko M., Basov A., Gerasimenko E., Elkina A., Baryshev M., Nechipurenko Y., Dzhimak S. Influence of Environmental Parameters on the Stability of the DNA Molecule // Entropy, 2021, vol. 23, no. 11, p. 1446.

ВЛИЯНИЕ АЛЬБУМИНА ЯИЧНОГО БЕЛКА НА БИОМИНЕРАЛИЗАЦИЮ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

The Effect of Egg Albumin on Calcium Carbonate Biomineralization in Water Solutions

Захаров Н.А.¹, Коваль Е.М.¹, Гоева Л.В.¹, Шелехов Е.В.², Алиев А.Д.³, Киселев М.Р.³, Матвеев В.В.³,
Захарова Т.В.⁴

¹ Институт общей и неорганической химии РАН, г. Москва, zakharov@igic.ras.ru

² НИТУ «МИСиС», г. Москва

³ Институт физической химии и электрохимии РАН, г. Москва

⁴ Российский университет транспорта «МИИТ», г. Москва, РФ

Приведены результаты моделирования биоминерализации карбоната кальция (CaCO_3 , КК) с участием альбумина яичного белка (АЛБ) в условиях осаждения из водных растворов в системе $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{CO}_3\text{-АЛБ-H}_2\text{O}$ и проведена оценка влияния содержания АЛБ в растворе на образование в составе продуктов синтеза фаз кальцита (К), арагонита (А) и ватерита (В) - перспективных материалов для использования в медицинской практике.

В природе КК имеет шесть известных кристаллических полиморфных модификаций, три из которых являются безводными кристаллами (кальцит, арагонит и ватерит) (табл. 1), две – гидратированными фазами КК (моно- и гексагидрат КК: $\text{CaCO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCO}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) и одна – является гидратированной аморфной (аморфный КК (АКК)).

Таблица 1. Кристаллографические характеристики безводных полиморфных модификаций КК.

| | Кальцит | Арагонит | Ватерит |
|---------------------------|---|--|---|
| Кристаллическая структура | Тригональная | Орторомбическая | Гексагональная |
| Пространственная группа | $R\bar{3}2/c$ | $Pm\bar{c}n$ | $P6_3/mmc$ |
| Параметры решетки | $a = b = 4.990 \text{ \AA}$ $c = 17.061 \text{ \AA}$ | $a = 4.9598 \text{ \AA}$ $b = 7.9641 \text{ \AA}$ $c = 5.7379 \text{ \AA}$ | $a = b = 7.16 \text{ \AA}$ $c = 2.547 \text{ \AA}$ |

КК известен как дешевый доступный коммерческий материал. Внимание к изучению особенностей кристаллизации КК вызвано широко распространенными природными процессами кальцификации и биоминерализации: от бактерий до млекопитающих. Среди биологических минералов КК занимает особое место, поскольку он входит в состав костей и панцирей животных. При этом неорганический материал (КК) оказывается связанным с биополимерами.

На образование определенной полиморфной модификации КК, происходящее в ходе осаждения из водных растворов кристаллов КК, способны оказывать влияние такие условия синтеза, как тип прекурсоров, характер их взаимодействия в ходе синтеза, а также внешние воздействия – температура, давление, скорости перемешивания и потока газа (CO_2) в растворе. Оценка влияния органических добавок на образование КК из водных растворов перспективно в том отношении, что оно, как известно, эффективно для управления фазовым составом продуктов синтеза.

Синтез КК проводили при 20°C путем сливания растворов Na_2CO_3 и CaCl_2 с последующим перемешиванием смеси. Добавление АЛБ осуществляли по каплям его водного раствора в количестве, соответствующем получению продуктов синтеза, содержащих 4,9%, 9,8% и 19,6% масс. % АЛБ. Полученную смесь отстаивали и отфильтровывали образовавшийся в осадке продукт синтеза.

Идентификацию образцов проводили с использованием методов химического и рентгенофазового анализов (РФА), инфракрасной спектроскопии (ИК), сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии (СЭМ, ПЭМ).

Показано, что содержание наиболее растворимой и наименее устойчивой фазы ватерита имеет место при наибольшем содержании АЛБ в ходе синтеза. При этом размеры кристаллов ватерита в меньшей степени подвержены влиянию содержания АЛБ при синтезе.

Полученные результаты

- будут способствовать разработке методов направленного синтеза КК в ходе осаждения из водных

растворов в системе $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{CO}_3\text{-АЛБ-H}_2\text{O}$ с регулируемыми параметрами содержания различных фаз (кальцит, арагонит, ватерит), частиц различных размеров и определенной морфологии в продуктах синтеза;

- представляют несомненный интерес для создания биосовместимых препаратов на основе КК с различными физико-химическими и медико-биологическими характеристиками.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИОИХ РАН в области фундаментальных научных исследований.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ КРУПНОЗЕРНИСТЫХ
СТЕПЕНЕЙ СВОБОДЫ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК, ОТВЕЧАЮЩИХ ЗА
КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ ИЗ В- В А- И С- ФОРМЫ**
**Determination from Experimental data of the DNA Double Helix's Coarse-Grained Degrees of Freedom
Responsible for Conformational Transitions from the B- into the A- and C-Forms**

Стрельников И.А., Ковалева Н.А., Зубова Е.А.

Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н.Семенова РАН, г. Москва, РФ,
zubova@chph.ras.ru

Несмотря на непрерывное увеличение доступных вычислительных мощностей, крупнозернистое моделирование биологических систем, таких, как ДНК и белки, развивается также очень активно. Причина состоит не только в возможном ускорении расчетов сложных систем на больших временах. Адекватность крупнозернистой модели означает, что верны принципы, на которых она основана, и упрощения, принятые при её построении. И наоборот, непонимание функционирования биологической системы не позволяет предложить её крупнозернистую модель.

Для ДНК существует около 30 крупнозернистых моделей с разной степенью детализации для моделирования разных физических процессов. В большинстве случаев они предложены для процессов, не требующих перехода двойной спирали ДНК в другую конформацию. Однако такие переходы в клетке происходят как раз в критически важных биологических процессах. Формирование нуклеосомы требует перехода около 20% фосфатов в ВП-конформацию. Спираль ДНК с большим количеством таких фосфатов имеет не стандартную В-, а неканоническую С-форму, отличающуюся узкой малой бороздкой. В комплексах с полимеразам или транскрипционными факторами ДНК часто локально переходит в А-форму с узкой большой бороздкой. Этот переход, как правило, сопровождается изменением конформации дезоксирибоз с южной на северную. В лабораторных условиях А-ДНК появляется в спиртовых растворах или сухих волокнах. Для адекватного крупнозернистого моделирования взаимодействия ДНК с белками при наличии резких изгибов в ту или другую сторону требуется модель, воспроизводящая оба этих типа конформационных изменений.

Мы разработали крупнозернистую «сахарную» модель ДНК [1], позволяющую моделировать переход в А-форму, например, при уменьшении доступного для ионов объема [2], как это происходит при формировании сухих волокон. Предложенная модель основана на введении одного двухмяного и одного трехчастичного потенциалов. Трехчастичный потенциал вводит корреляцию между конформацией дезоксирибозы, описываемой двухмяным потенциалом, и геометрией спирали. Добавить в модель аналогичную конструкцию для конформации фосфата оказывается нетривиальной задачей и требует скрупулёзного анализа экспериментальных данных.

Мы провели сравнение (по структурам из PDB, <https://www.rcsb.org/>) геометрии сахаро-фосфатного остова ДНК при связывании с белками, в кристаллической форме и растворах. Были определены «ортогональные» крупнозернистые степени свободы, аналогичные двум вышеуказанным главным степеням свободы остова (псевдоротационному углу τ_0 дезоксирибозы и торсионным углам ϵ/ζ , отвечающим за переход фосфата в ВП конформацию). А именно, в комплексах ДНК с белками изменение одного из углов $\text{C3}'\text{C1}'\text{N}^*$ или $\text{C4}'\text{C3}'\text{P}(2)$ происходит при постоянном (как правило, каноническом) значении другого угла — в точности, как для пары τ_0 и $(\zeta-\epsilon)$. Для случая ортогональных крупнозернистых степеней свободы введение соответствующих двухчастичных потенциалов и необходимых корреляций с геометрическими характеристиками спирали оказывается уже решаемой задачей.

Доклад был подготовлен за счёт субсидии, выделенной ФИЦ ХФ РАН на выполнение государственного задания, тема FFZE-2022-0009.

1. Kovaleva N.A., Koroleva (Kikotx) I.P., Mazo M.A., Zubova E.A. The “sugar” coarse-grained DNA model // Journal of Molecular Modeling, 2017, vol. 23, no. 2, p. 66, doi: 10.1007/s00894-017-3209-z.

2. Kovaleva N.A., Strelnikov I.A., Zubova E.A. Kinetics of the Conformational Transformation between B- and A-Forms in the Drew–Dickerson Dodecamer // ACS Omega, 2020, vol. 5, no. 51, pp. 32995-33006, doi: 10.1021/acsomega.0c04247.

3. Strelnikov I.A., Kovaleva N.A., Zubova E.A. Variability of the DNA Backbone Geometry in DNA-Protein Complexes: Experimental Data Analysis // Journal of Chemical Information and Modeling, 2021, vol. 61, no. 9, p. 4783, doi: 10.1021/acs.jcim.1c00506.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ГЛИПРОЛИНОВОГО ПЕНТАПЕПТИДА Spatial Structure of the Glyproline Pentapeptide

Исмаилова Л.И., Аббаслы Р.М., Ахмедов Н.А.

Бакинский государственный университет, Институт физических проблем, г. Баку, Азербайджан,
lara.ismailova.52@mail.ru, ranaabbasli54@mail.ru

Известно, что в живом организме регуляторные пептиды контролируют все биохимические процессы. В настоящее время роль этих пептидных молекул активно исследуется. К регуляторным пептидам относятся и глипролины - короткие пептидные молекулы, состоящие из аминокислотных остатков глицина и пролина. Они привлекают внимание ученых, так как являются источниками фармацевтических препаратов, которые поставляют сам организм. Глипролины – это нейрхимические молекулы психотропного действия, регулируют систему свертывания крови, влияют на работу иммунной и нервной систем. Создание новых лекарственных препаратов на основе глипролинов – современное направление фармакологии. Понять механизмы действия этих биомолекул можно, если решить задачу их структурно-функциональной организации. Целью данной работы является определение трехмерной структуры глипролиновой пентапептидной молекулы с аминокислотной последовательностью Arg-Glu-Arg-Gly-Pro. Эта молекула обладает ярко выраженным противосвертывающим действием и проявляет защитное действие при тромбозах [1,2].

Компьютерное моделирование, основанное на использовании метода теоретического конформационного анализа и программ, позволяющих получать графическое изображение пространственной структуры молекулы, было выполнено для молекулы семейства глипролинов Arg-Glu-Arg-Gly-Pro. Метод теоретического конформационного анализа дает возможность рассчитывать трехмерную структуру пептидных молекул исходя из известной аминокислотной последовательности. Расчет выполнялся в рамках механической модели молекул с учетом невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей.

Определение пространственной структуры пентапептида мы начали с выяснения конформационных возможностей трипептида Arg-Glu-Arg. Боковые цепи этих аминокислот являются объемными, лабильными и заряженными (Arg имеет положительно заряженную боковую цепь, а Glu- отрицательную). Трипептид включал в себя 69 атомов и 21 переменный двугранный угол основной и боковых цепей. Было составлено свыше 1500 начальных приближений, которые принадлежали 4 шейпам ee , ef , fe и ff . Расчет обнаружил наличие резкой энергетической дифференциации конформаций, форм основной цепи и шейпов. В энергетический интервал 0–4 ккал/моль попадают 26 конформаций, а в интервал 0 – 3 ккал/моль попадают 16 конформаций шейпов ef , fe и ff . Низкоэнергетическими из них являются конформации BRB, BRR, RBB, RRB и RRR, которые имеют полусвернутую и свернутую формы основной цепи.

Расчет дипептидной молекулы выполнялся на основе стабильных конформаций монопептидов N-ацетил-L-глицина и L-пролина. Для аминокислоты пролин учитывались R и B формы основной цепи. Остаток глицина в расчетах имел четыре формы основной цепи R,B,L и P. Учитывая специфику боковых цепей аминокислотных остатков глицина и пролина, важно подчеркнуть, что остаток Glu лишен боковой цепи (в боковой цепи находится один атом водорода), а боковая цепь остатка Pro представляет жестко фиксированное кольцо. Так же для глицина в расчет были включены граничные начальные приближения углов ϕ, ψ . Для дипептида Gly-Pro, содержащего 27 атомов и 6 переменных двугранных углов, возможны 2 шейпа и 8 форм основной цепи. Низкой энергией для дипептидной молекулы обладают конформации PR,RR,RB, которые имеют свернутую форму основной цепи.

Для пентапептидной молекулы Arg-Glu-Arg-Gly-Pro было рассчитано свыше 250 конформаций 20 форм основной цепи, принадлежащих 18 возможным шейпам. Все они были проминимизированы по энергии, оценены их геометрические и энергетические параметры. Найдены 9 низкоэнергетических конформаций для этого пентапептида, значения двугранных углов основной и боковых цепей, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Расчет показал, что низкоэнергетическими для пентапептида Arg-Glu-Arg-Gly-Pro являются полусвернутые формы основной цепи. Боковые цепи аминокислот Arg и Glu в низкоэнергетических конформациях осуществляют эффективные взаимодействия и являются конформационно лабильными аминокислотами, они сближают участки основной цепи и боковые цепи аминокислот, входящих в пентапептидную молекулу.

1. Рогозинская Э.Я., Ляпина Л.А., Шубина Т.А., Мясоедов Н.Ф., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Андреева Л.А. Тромбоэластографическое исследование аргининсодержащих, лейцинсодержащих и лизинсодержащих пептидов. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины // Фармакология и токсикология. 2020, т. 169, № 6, с. 165-171.

2. Григорьева М.Е., Ляпина Л.А. Пептиды глипролинового ряда и их роль в регуляции сосудисто-тромбоцитарного и плазменного гемостаза // Успехи физиологических наук, 2020, т. 51, № 2, с. 27-36.

ОСОБЕННОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ТРИПИНА В НАТИВНОМ СОСТОЯНИИ И ПРИ ФОТОМОДИФИКАЦИИ КОРОТКОВОЛНОВЫМ УФ-ИЗЛУЧЕНИЕМ

Features of the Spatial Structure of Tripin in the Native State and After Photomodification with a Vacuum UV Radiation

Карташова Ю.С., Артюхов В.Г., Глаголева Е.П., Колтаков И.А.

Воронежский государственный университет, г. Воронеж, РФ, koltakov@bio.vsu.ru

Изучение физико-химических закономерностей воздействия высокоэнергетических излучений на биосистемы представляет не только фундаментальный, но и определенный практический интерес.

В качестве объекта исследования нами был выбран простой белок – трипсин. Отсутствие каких-либо дополнительных включений и простетических групп позволило нам существенным образом упростить анализируемую систему, исключив возможности взаимодействия с ними апоелка. Основными хромофорами изучаемого биополимера в области спектра 230 – 400 нм являются ароматические аминокислоты, серосодержащие аминокислоты, а также пролин и гистидин. Переход же в спектральный диапазон излучения электромагнитной природы с энергией кванта от 2,8 до 11,4 эВ (менее 220 нм), выводит на первое место фенилаланин, тирозин и аминокислотные остатки с алифатическим радикалом.

В связи с этим, особый интерес вызывает изучение влияния на белки ВУФ – излучения с энергией кванта 7,2 эВ, что соответствует длине волны 172 нм.

Для получения представлений о физико-химических свойствах трипсина нами была проанализирована электрофоретическая активность белка. Учитывались абсолютные значения показателя, так как знак указывает направление движения от анода к катоду или обратно. Электрофоретическая подвижность контрольных образцов составила $0,53 \pm 0,02$ мкм*см/V*с. Облучение белка в дозах 7,4 и 37 кДж/м² способствовало уменьшению исследуемого параметра до величин $0,470 \pm 0,002$ и $0,449 \pm 0,018$ мкм*см/V*с.

Для понимания возможных изменений пространственной структуры исследуемого белка, нами была проведена серия исследований возникновения ее дефектов (образование пор, полостей и туннелей) методами компьютерной химии в программе MOLE.

Было установлено, что в структуре исследуемой молекулы есть всего 1 туннель, не содержащий в своем составе ароматических аминокислотных остатков и 5 внутренних полостей, не сообщающихся с поверхностью молекулы (табл. 1).

Таблица 1. Перечень аминокислотных остатков внутренних полостей трипсина

| № | Объем Полости, Å ³ | Аминокислотные остатки |
|---|-------------------------------|---|
| 1 | 359,84 | CYS 22 A, ALA 23 A, ASN 25 A, SER 26 A, ILE 27 A, PRO 28 A, TYR 29 A, GLN 30 A, VAL 31 A, SER 32 A, LEU 46 A, ARG 66 A, LEU 67 A, GLY 69 A, GLU 70 A, HIS 71 A, GLN 81 A, ILE 83 A, ALA 112 A, ARG 117 A, VAL 118 A, TRP 141 A, LEU 155 B |
| 2 | 288,42 | ILE 16 A, VAL 17 A, ILE 138 A, LEU 158 B, ALA 160 B, VAL 183 B, GLY 184 B i:A, PHE 184 B, GLY 187 B, LYS 188 B, GLY 188 B ASP 189 B, SER 190 B, GLN 221 B, ALA 221 B i:A, ASN 223 B, LYS 224 B, PRO 225 B, GLY 226 B, TYR 228 B |
| 3 | 287,94 | ILE 47 A, VAL 53 A, ILE 103 A, LEU 105 A, LEU 123 A, PRO 124 A, LEU 209 B, ILE 212 B, THR 229 B, VAL 231 B, TYR 234 B, VAL 235 B, ILE 238 B |
| 4 | 148,91 | ILE 16 A, GLN 30 A, VAL 31 A, HIS 40 A, GLY 43 A, ILE 138 A, SER 139 A, GLY 140 A, TRP 141 A, SER 190 B, GLY 193 B, ASP 194 B, GLY 197 B, PRO 198 B, VAL 213 B |
| 5 | 134,50 | LEU 99 A, ASP 100 A, ASN 101 A, ASP 102 A, ASN 179 B, MET 180 B, SER 214 B, TRP 215 B, VAL 227 B, TYR 228 B, THR 229 B, TYR 234 B |

Таким образом, в ходе проведенных исследований мы показали, что в структуре молекулы трипсина присутствуют дефекты пространственной укладки полипептидной цепи, которые обеспечивают лабильность молекул трипсина в процессе фотомодификации белка.

1. Михальчук В.Н. Трипсиноподобные протеиназы в физиологии и биологии человека // Актуальные проблемы транспортной медицины, 2008, т. 14, № 4, с. 134-139.

2. Суханова С.М., Петручук Е.М., Генералов А.А. Трипсин. Свойства и применение в производстве биологических лекарственных препаратов // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 2018, т. 18, № 2, с. 106-111.

ДИМЕРИЗАЦИЯ ФТАЛОЦИАНИНА АЛЮМИНИЯ В ОРГАНИЧЕСКОЙ И ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКОЙ СРЕДАХ**Dimerization of Aluminum Phthalocyanine Chloride in Organic and Aqua-organic Media**Клименко И.В.¹, Астахова Т.Ю.¹, Тимохина Е.Н.¹, Лобанов А.В.^{1,2,3}¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва, РФ, *inna@deom.chph.ras.ru*² ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, г. Москва, РФ³ Московский педагогический государственный университет, г. Москва, РФ

Фталоцианинам (Фц), как объектам исследования, в последнее время уделяется большое внимание благодаря постоянному расширению областей их применения. Они, в том числе, используются в качестве фотосенсибилизаторов (Фс) в фотодинамической терапии, механизм которой основан на способности Фс накапливаться избирательно в целевых тканях-мишенях и генерировать синглетный кислород или кислородсодержащие свободные радикалы при локальном воздействии излучения определенной длины волны, соответствующей максимальному поглощению Фс. Фталоцианины представляют собой отдельную группу макрогетероциклических красителей, которые относятся к тетраазобензопорфиринам. Молекула Фц представляет собой структуру, состоящую из четырех бензопиррольных фрагментов, связанных через –N= мостики. Фц металлов содержат тетракоординированный центральный ион металла. В случае трехвалентного центрального иона Al^{3+} его избыточные валентные электроны могут быть использованы для образования химической связи с внеплоскостными атомами, например, Cl.

Фталоцианин алюминия ($AlClФц$) – фотосенсибилизатор II поколения, обладающий в мономерной форме высокой фотоактивностью и фотостабильностью, большим коэффициентом поглощения в области 650–680 нм («терапевтическое окно») и высоким квантовым выходом синглетного кислорода. Однако гидрофобные свойства $AlClФц$ препятствуют его широкому применению в различных фармакологических композициях из-за его склонности к агрегации в водных растворах, что приводит к образованию нефлуоресцирующих агрегатов и снижению фотодинамической активности [1].

При разработке способов контроля над агрегационным состоянием $AlClФц$ необходимо понимание механизмов межхромомформного взаимодействия, приводящего к самотушению возбужденных состояний в агрегатах. В связи с этим, квантово-механическим методом функционала электронной плотности (DFT) были изучены геометрия и электронная структура $AlClФц$ в мономерном и димеризованном (H- и J-агрегаты) состояниях в средах N,N-диметилформамида (ДМФА) и ДМФА-вода. Расчеты проводились в программном пакете ORCA 4.2.1. При образовании димера возможны разные типы ориентации составляющих молекул $AlClФц$: «спина к спине», «голова к голове», «голова к спине», а также смешанно-ориентированные типы. Оказалось, что как в ДМФА, так и в системе ДМФА-вода предпочтительной ориентацией является «спина к спине». При этом молекулы $AlClФц$ сохраняют мономерную геометрию. В среде ДМФА молекулы сдвинуты относительно друг друга так, что атом алюминия одной молекулы располагается над одним из атомов азота другой молекулы, в результате чего образуется «скользящая» кофациальная агрегационная форма с перекрыванием π -орбиталей ароматических макроциклов и обеспечивается стабильность димера благодаря межмолекулярной координации атома азота одной молекулы $AlClФц$ и положительно заряженного алюминия другой молекулы $AlClФц$. Угол сдвига молекул составляет 5° , что позволяет отнести димеры в ДМФА к H-агрегатам. Расстояние между молекулами составляет $\sim 3.70 \text{ \AA}$. Оказалось, что в водно-органическом растворителе молекула $AlClФц$ легко гидратируется с образованием координационной связи между атомом Al молекулы $AlClФц$ и атомом O молекулы воды. Длина связи составляет 2.23 \AA , а энергия гидратации -16.84 ккал/моль . Гидратирование способствует образованию димеров, в которых две молекулы воды играют роль «мостиков» между двумя молекулами $AlClФц$. В таком димере каждая молекула воды имеет две связи: одну координационную связь между своим атомом O и атомом Al одной из молекул $AlClФц$ и одну водородную связь между своим атомом H и атомом N другой молекулы $AlClФц$. Расстояние между молекулами составляет $\sim 3.15 \text{ \AA}$. Угол сдвига молекул составляет 62° , что позволяет отнести димеры в среде ДМФА-вода к J-агрегатам. Для мономеров и димеров в форме H- и J-агрегатов также были рассчитаны спектры поглощения и флуоресценции.

Полученные данные квантово-механических расчетов агрегационных состояний $AlClФц$ в различных средах позволяют создать предпосылки для научного прогнозирования и контроля на молекулярном уровне межхромомформных взаимодействий фталоцианинов в органических и водно-органических средах.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ИБХФ РАН (№ гос. регистрации 01201253304) и в рамках Программы фундаментальных научных исследований РФ (Госзадание FFZE-2022-0009, ФИЦ ХФ РАН). Расчеты выполнены с использованием вычислительных ресурсов МСЦ РАН.

1. Klimenko I.V., Trusova E.A., Shchegolikhin A.N., Lobanov A.V., Jurina L.V. Surface modification of graphene sheets with aluminum phthalocyanine complex // Fullerenes, Nanotubes and carbon nanostructures, 2022, vol. 30, no. 1, doi: 10.1080/1536383X.2021.1976754.

ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МОДЕЛИРОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Approaches to the Analysis of Data Obtained Using Molecular Dynamics Simulations

Кобчикова П.П., Ефимов С.В., Клочков В.В.

Казанский федеральный университет, г. Казань, РФ, *pollymoon@ya.ru*

Моделирование молекулярной динамики (МД) часто становится ключевым инструментом для изучения биофизических систем благодаря увеличивающейся вычислительной мощности и доступности программного обеспечения. Метод МД позволяет детально исследовать подвижность молекул, как их основных цепей, так и боковых. В результате моделирования возникает большой объем данных. Поток данных, сгенерированных при запуске МД-симуляции длительностью даже в микросекунды, крайне труден для восприятия человека. Отсюда возникает потребность адаптировать уже известные методы или же придумать новые инструменты для лучшего понимания результатов моделирования. В данной работе для этих целей были предприняты попытки применить методы машинного обучения. Текущей задачей являлся углубленный анализ большого объема данных, полученных в результате моделирования, для получения ценной информации и выявления общих тенденций.

В качестве объекта использовался циклоспорин D – аналог циклоспорина А, один из семейства циклических пептидов, состоящих из 11 аминокислотных остатков. Наиболее вариативным среди них является второй остаток.

В настоящей работе предварительно была проведена расшифровка ЯМР спектров высокого разрешения, а затем проведено МД моделирование молекулы циклоспорина D. Первой поставленной задачей стало разбиение на кластеры полученных данных по двугранным углам ϕ и ψ , так как они являются одним из параметров, описывающих конформацию молекулы. В качестве языка для реализации задумки был выбран Python, в котором мы использовали встроенный метод библиотеки *sklearn* – K-средних. На рисунке 1 можно видеть предварительный результат такой кластеризации.

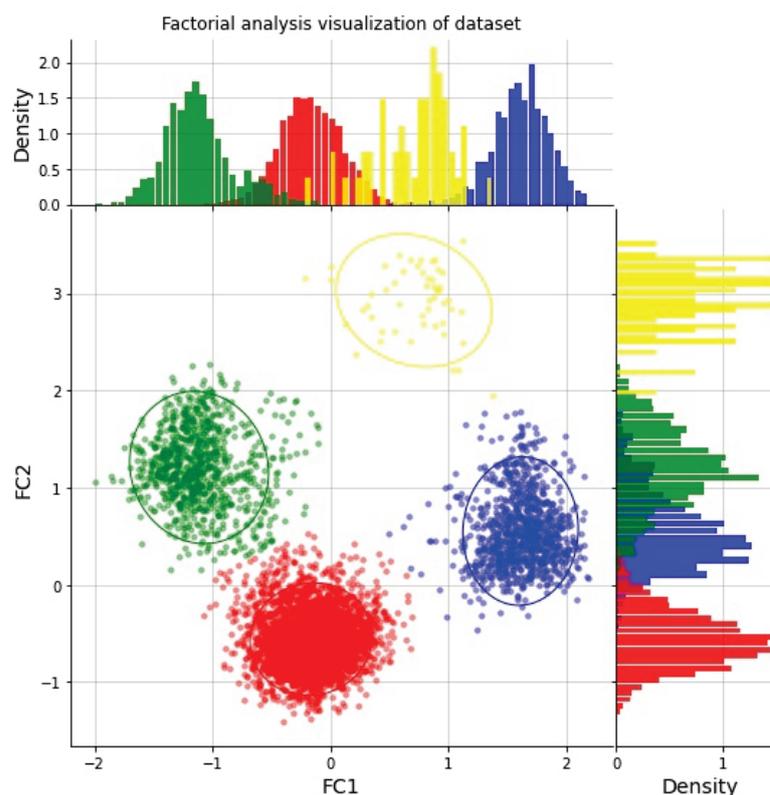


Рисунок 1. Разбиение пространства валентных углов циклоспорина D на кластеры.

1. Häse F., Galván I., Guzik A., Lindh R., Vacher Me. How machine learning can assist the interpretation of ab initio molecular dynamics simulations and conceptual understanding of chemistry // *Chemical Science*, 2019, doi: 10.1039/C8SC04516J.

2. Wang Y., Ribeiro J.M.L., Tiwary P. Machine learning approaches for analyzing and enhancing molecular dynamics simulations // *Current Opinion in Structural Biology*, 2020, vol. 61, pp. 139-145, doi: 10.1016/j.sbi.2019.12.016.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ ПОЛОС
ПОГЛОЩЕНИЯ ФЕНИЛАЛАНИНА В ДИАПАЗОНЕ
ДЛИН ВОЛН 140–270 НМ**
**Investigation of the Influence of Peptide Bonds on the Formation of Phenylalanine Absorption Bands in the
Wave Range 140–270 Nm**

Колтаков И.А., Артюхов В.Г., Луковиков. Д.А.

Воронежский государственный университет, г. Воронеж, РФ, koltakov@bio.vsu.ru

Изучение физико-химических закономерностей воздействия высокоэнергетических излучений на различные биологические и химические системы представляет не только фундаментальный, но и определенный практический интерес. Пытаясь выйти за пределы радиационных поясов Земли, человечество оказывается один на один с различными видами жестких высокоэнергетическими излучений. Обладая значительной энергией квантов от 5 эВ, они способны вызывать ионизацию биологических молекул, сопровождающуюся дозозависимыми структурными перестройками молекул биополимеров и, как следствие, приводящую к изменению их функциональной активности.

Поскольку в исследуемой области спектра фенилаланин имеет коэффициент молярной экстинкции около 60 000, то он, потенциально, будет выступать в качестве основного хромофора при воздействии на структуру белка ВУФ-излучения.

При вычислениях геометрии остатков фенилаланина в свободном состоянии и в составе ди- и трипептидов был использован метод молекулярной механики (BIO+ / CHARMM). Для квантово-химических методов расчета молекулярных характеристик использовался полуэмпирический метод PM3 (на основе метода Хартри–Фока). Электронные спектры поглощения исследуемой аминокислоты были вычислены в рамках спектрального приближения ZINDO/S.

Было установлено, что фенилаланин в свободном состоянии имеет 9 ярко выраженных полос поглощения: 269,52 нм, 267,35 нм, 209,90 нм, 196,99 нм, 183,79 нм, 182,60 нм, 180,81 нм, 149,49 нм и 147,34 нм. Однако в составе белковых молекул (то есть при формировании пептидных связей) его состояние может быть изменено вследствие того, что соседние аминокислотные остатки могут воздействовать на ключевые параметры, влияющие на величину энергетического барьера для осуществления электронных переходов.

Были выделены 4 типа полос поглощения: исчезающие полосы пептидных связей (277,72; 274,09; 266,63 и 166,17 нм) исчезающие полосы фенилаланина (269,52; 267,35; 209,90 и 182,60 нм). К этим группам были отнесены полосы поглощения, которые исчезали при проведении расчетов, при образовании пептидной связи фенилаланином с другими аминокислотными остатками.

К третьей группе были отнесены полосы поглощения, которые существовали как непосредственно у фенилаланина, так и у пептидных связей (180,08–180,81 нм и 149,49–149,88 нм). Для этих полос поглощения не удалось идентифицировать с достаточным уровнем точности локализацию хромофорной группировки.

К четвертой группе были отнесены, так называемые, независимые полосы – те полосы поглощения (196,99–204,49 нм; 182,04–183,79 нм и 147,34–147,89 нм), на интенсивность которых не влияло изменение локального микроокружения фенилаланина.

Таким образом, нами было установлено, что пептидные связи, сформированные фенилаланином с другими аминокислотными остатками, оказывают существенное влияние на поглощение света этой аминокислотой в участке спектрального диапазона от 140 до 270 нм. Расширение спектрального диапазона исследований в области вакуумного ультрафиолета позволит получить информацию о фундаментальных механизмах биологического действия ионизирующих излучений при их взаимодействии с белковыми системами.

1. Гилл Ф., Мюррей У., Райт М. Практическая оптимизация. Москва: Мир, 1985, 510 с.
2. Orozco-Gonzalez Y., Kabir M.P., Gozem S. Electrostatic Spectral Tuning Maps for Biological Chromophores // The Journal of Physical Chemistry B, 2019, vol. 123, pp. 4813-4824.

МУТАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ДРОЖЖЕВОЙ АРГИНИН ПЕРМИАЗЫ CAN1
Mutational Analysis of Yeast Arginine Permease CAN1

Колтовая Н.А., Душанов Э.Б.

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, РФ, koltovaya@jinr.ru

Включение аминокислот в клетки дрожжей опосредуются плазмо-мембранными пермиазами, принадлежащими к семейству транспортеров, найденных во всех живых организмах. Пермиазы по структуре аналогичны и состоят из 12 трансмембранных спиралей, фланкирующих гидрофильный хвост, направленный в цитоплазму. Аргининовая пермиаза – гомодимер, состоящий из 590 а.о. Пермиазы проявляют разный

субстратный диапазон, так Can1 транспортирует аргинин и менее эффективно лизин. Включение аргинина зависит от протонного насоса. Can1 катализирует H^+ /аргинин симпорт.

Поскольку мутации в гене *CAN1* приводят к устойчивости к аналогу аргинина фунгициду канаванину и мутанты легко отбирать на среде с канаванином, то ген *CAN1* многие годы используется для изучения закономерностей мутагенеза. Огромное количество накопленных мутаций позволяет провести детальный функциональный анализ пермиазы. Среди ~3000 мутаций удалось выделить missense мутации, вызывающие замены ~150 аминокислотных остатков. В базе данных PDB имеется несколько структур пермиаз для разных организмов: 1PV6, 1PV7, 3L1L. Используя их, мы построили модельную структуру дрожжевой пермиазы Can1 [1]. Молекулярная динамика показала устойчивость построенной структуры в течение 40 нс, однако наблюдаются изменения в распределении поверхностного заряда.

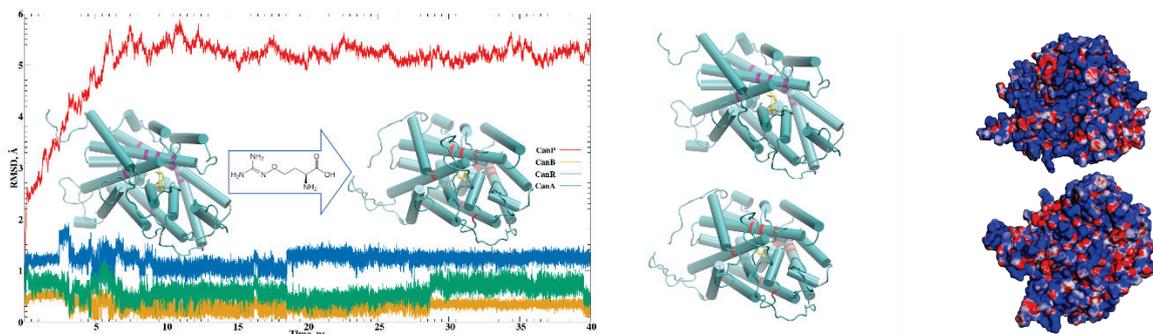


Рисунок 1. Молекулярно-динамические расчёты Can1 пермиазы. Белковая структура (CanP) стабилизируется примерно через 5 нс (левый рисунок, RMSD[N,CA,C,O] ~ 5,5 Å). Канаванин и его части стабильны в течение моделирования: база (CanB), RMSD[N,CA,C,O] ~ 0,1-0,4 Å; радикал (CanR), RMSD[NE,OXT,CZ,NH1,NH2] ~ 0,7-0,9 Å; вся молекула (CanA), RMSD ~ 1,3 Å. Красным (после моделирования) и фиолетовым (до моделирования) цветами в трехмерном изображении пермиазы указаны локализация аминокислотных остатков Gly118, Trp177, Thr180, Glu184, Gly224, Glu227, Gly229, Arg327, Ala389, Arg399 и Gly460. Внутри схематической стрелки изображена молекула канаванина. На среднем рисунке указаны молекула пермиазы до и после моделирования, справа – соответствующие распределения поверхностного заряда.

Локализация отобранных мутаций на 3Д-структуре белка показывает, что они разбиваются на несколько классов – предположительно ответственных за взаимодействие с мембраной, за транспорт аргинина и с неизвестной функцией. Среди аминокислот можно выделить девять, любая замена которых инактивирует белок. По-видимому, они играют ключевую роль в функционировании пермиазы. Локализация crucial аминокислот отмечена на рисунке цветными кольцами. Видно, что они принимают участие в формировании центрального канала. Полученные результаты показывают перспективность используемого подхода для изучения функционирования транспортеров.

1. Колтовая Н.А., Душанов Э.Б. Распределение мутаций в молекуле белка дрожжевой аргинин пермиазы CAN1 // Актуальные вопросы биологической физики и химии, 2020, т. 5, № 4, с. 644-651.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА ОЛИГОМЕРОВ ЛИЗОЦИМА В КРИСТАЛЛИЗАЦИОННЫХ РАСТВОРАХ С РАЗЛИЧНЫМИ ОСАДИТЕЛЯМИ

Molecular Dynamics of Lysozyme Oligomers in Crystallization Solutions with Different Precipitants

Кордонская Ю.В.^{1,2}, Тимофеев В.И.², Дьякова Ю.А.¹, Марченкова М.А.², Писаревский Ю.В.², Ковальчук М.В.¹

¹ НИЦ Курчатовский институт, г. Москва, РФ

² Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, г. Москва, РФ, yukord@mail.ru

В настоящей работе с помощью метода молекулярной динамики (МД) моделировалось поведение димеров и октамеров лизоцима в кристаллизационных растворах с различными осадителями (LiCl, NaCl, KCl и CuCl₂). Ранее с помощью малоуглового рассеяния (МУРР) было установлено, что кристаллизационные растворы белков содержат определенные олигомеры, являющиеся строительными элементами кристалла. Для лизоцима таким кластером служит октамер, кроме того, в его кристаллизационном растворе присутствуют димеры. По результатам вычислительного эксперимента были посчитаны значения RMSF (Root Mean Square Fluctuations, среднеквадратичные флуктуации), RMSD (Root Mean Square Deviations, среднеквадратичные отклонения) и R_g (радиус гирации), исходя из которых оценивалась стабильность олигомеров, их структурные трансформации и

изменение компактности, соответственно.

Таблица 1. Сравнение концентрации, RMSF, RMSD и Rg димеров, усреднённых по 3-м независимым моделированиям и по всем атомам Са. Приведённые концентрации получены из экспериментов по МУРР [1].

| Осадитель | Концентрация димеров, % | Среднее значение RMSF, нм | Среднее значение RMSD, нм | Среднее значение Rg, нм |
|-------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| LiCl | 13.1 | 0.116 | 0.21 | 2.00 |
| NaCl | 10.6 | 0.116 | 0.25 | 2.02 |
| KCl | 10.5 | 0.138 | 0.25 | 2.03 |
| CuCl ₂ | 3.5 | 0.137 | 0.31 | 2.06 |

В результате работы было обнаружено, что катионы осадителя оказывают довольно заметное влияние на поведение олигомеров: чем выше атомная масса катиона, тем сильнее изменения в структуре димера в процессе его динамики, и, согласно данным экспериментов по МУРР, ниже концентрация димеров (табл. 1 [2]).

Таблица 2. Сравнение концентрации, RMSF, RMSD и Rg октамеров, усреднённых по 3 независимым моделированиям и по всем Са-атомам. В случаях, когда октамеры диссоциировали на олигомеры меньшего размера, в скобках приведены значения RMSF усреднённые только по двум моделированиям, при которых октамеры оставались целыми.

| Осадитель | Концентрация октамеров, % | Среднее значение RMSF, нм | Среднее значение RMSD, нм | Среднее значение Rg, нм |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| CuCl ₂ | 1.7 | 0.166 | 0.32 | 3.29 |
| LiCl | 1.9 | 0.185 | 0.34 | 3.28 |
| NaCl | 2.2 | 0.272 (0.224) | 0.50 | 3.36 |
| KCl | 2.4 | 0.257 (0.19) | 0.45 | 3.34 |

Однако устойчивость октамеров увеличивается при изменении катиона осадителя в следующем порядке: Na, K, Li и Cu, что не совпадает с зависимостью концентрации октамеров от типа катиона (табл. 2). Таким образом, молекулярная динамика позволила изучить тонкости и детали взаимодействия белковых молекул в кристаллизационных растворах и механизмы формирования олигомеров. Интересно отметить, что температурный B-фактор (параметр анизотропного смещения) для димеров хорошо коррелирует с RMSF, чего не наблюдается для октамеров.

1. Dyakova Y.A., Boikova A.S., Pina K.B. et al. Study of the Influence of a Precipitant Cation on the Formation of Oligomers in Crystallization Solutions of Lysozyme Protein // *Crystallography Reports*, 2019, vol. 64, no. 1, pp. 11-15.

2. Kordonskaia Yu.V., Timofeev V.I., Dyakova Yu.A., Marchenkova M.A., Pisarevsky Yu.V., Kovalchuk M.V. The Role of Cations of the Precipitant in the Interaction of Protein Molecules in the Lysozyme Oligomers in Crystallization Solutions // *Crystals*, 2021, vol. 11, no. 12, p. 1534.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПОЛЯ ПЛАЗМИДЫ pPF1 И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ХАРАКТЕР ДВИЖЕНИЯ НЕЛИНЕЙНЫХ КОНФОРМАЦИОННЫХ ВОЗМУЩЕНИЙ – КИНКОВ

Features of the Potential Field Structure of pPF1 Plasmid and their Influence on the Character of Motion of Nonlinear Conformational Perturbations – Kinks

Краснобаева Л.А.^{1,2}, Якушев Л.В.³

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, РФ

² Томский государственный университет, г. Томск, РФ, kla1983@mail.ru

³ Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пущино, РФ, kind-@mail.ru

Плазмида pPF1, созданная недавно генными инженерами [1], активно применяется для изучения интенсивности и направленности процесса транскрипции в различных последовательностях, которые для этой цели интегрируются в область, расположенную между генами флуоресцентных белков Egfp и mCherry (рис. 1). Хотя большинство исследователей рассматривают плазмиды, в том числе и плазмиду pPF1, только как

инструмент, она и сама по себе представляет научный интерес. Изучение ее структурных и динамических свойств поможет в перспективе прояснить вопрос о том, влияют ли структурные и динамические свойства самой плазмиды на результаты изучения функциональных свойств интегрируемых в нее последовательностей.

В данной работе исследуются динамические свойства нелинейных конформационных возмущений – кинков, активированных в молекуле ДНК. Поведение кинков во многом определяется видом и характером потенциального поля плазмиды. С помощью методов математической и теоретической физики были рассчитаны энергетические профили потенциального поля плазмиды и построены 2D траектории движения кинков в области, расположенной между генами флуоресцентных белков Egfp и mCherry, при этом учитывались эффекты диссипации и воздействия постоянного торсионного поля. Показано, что существуют пороговые значения торсионного поля, ниже и выше которых поведение кинка существенно меняется: происходит переход от циклического движения кинка внутри области, расположенной между генами флуоресцентных белков Egfp и mCherry, к поступательному движению и выходу из этой области. Сделаны оценки пороговых значений. Показано, что они зависят от характера энергетического профиля вблизи области, расположенной между генами флуоресцентных белков Egfp и mCherry.

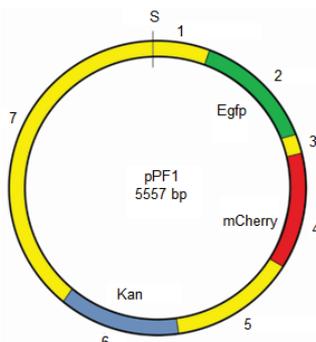


Рисунок 1. Схематическое изображение плазмиды pPF1. Гены Egfp и mCherry показаны зеленым и красным цветом, соответственно. Синим цветом показан ген канамицина Kan. Точка S – начало нумерации нуклеотидной последовательности

1. Masulis I.S., Babaeva Z.Sh., Chernyshov S.V. et al. Visualizing the activity of Escherichia coli divergent promoters and probing their dependence on superhelical density using dual-colour fluorescent reporter vector // Scientific Reports, 2015, vol. 5, p. 11449, doi: 10.1038/srep11449.

КООПЕРАТИВНОСТЬ ГЕМОГЛОБИНА – КЛЮЧЕВАЯ МОДЕЛЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОФИЗИКИ

Cooperativity of Hemoglobin is a Main Model of Molecular Biophysics

Лавриненко И.А.¹, Нечипуренко Ю.Д.²

¹ Воронежский государственный университет, г. Воронеж, РФ, lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва, РФ, nech99@mail.ru

История исследования кислородсвязывающих свойств гемоглобина имеет общий интерес для биофизиков, так как в ней выработывались модели и формировались подходы, которые стали общими для широкого класса задач, описывающих обратимое кооперативное связывание лигандов с макромолекулами. Термодинамические и математические модели, разработанные для этого, позволили биофизике сделать огромный шаг вперед, а предложенные уравнения, в частности уравнение Хилла, оказали влияние на развитие науки в самых разных её областях.

Мы постарались изложить эту историю с позиции формального анализа кооперативного связывания, соединив обзор классических работ с некоторыми из наших исследований. В докладе основное внимание уделяется описанию связывания гемоглобином кислорода и рассмотрены основные математические модели, развитые в этой области. Эволюция моделей связывания прослеживается от подходов Хилла и Эдера, Моно-Уаймена-Шанжэ и Кошланда-Немети-Филмера до современных воззрений.

Представлен обзор наиболее известных регрессионных моделей, описывающих связывание гемоглобина с кислородом и предложен подход, позволяющий на основе формальных критериев находить оптимальные математические и физические модели кооперативного связывания кислорода гемоглобином. Методами регрессионного и кластерного анализа на основе экспериментальных данных диссоциации оксигемоглобина проведено сравнение основных моделей оксигенации, несущих в своей основе степенную и экспоненциальную зависимости. Показано, что модели Эдера, Бернарда и Хилла, соответствующие степенным функциям обладают преимуществом в описании связывания олигомерным белком лиганда по сравнению с моделями, соответствующими экспоненциальным функциям. Установлено, что последовательная четырёхступенчатая

модель Кошланда-Немети-Филмера, которая соответствует уравнению Эдера, позволяет описать экспериментальные данные наилучшим образом.

Предложена модификация уравнения Хилла, описывающего процесс кооперативного связывания макромолекулой лиганда. Вводимый нами в это уравнение параметр «относительный коэффициент кооперативности» позволяет обеспечить сопряжение коэффициента Хилла с числом взаимодействующих субъединиц в олигомере. Это дает возможность прояснить физический смысл данного коэффициента и объясняет природу его нецелочисленных значений.

Представлена модель оксигенации, основанная на уравнении Хилла, где одноименный коэффициент представляет собой функцию от парциального давления кислорода (концентрации лиганда). Показано, что уравнение Хилла с четырьмя параметрами хорошо аппроксимирует экспериментальную кривую диссоциации оксигемоглобина. Данные параметры, а также выводимые из них критерии оценки оксигенации позволяют охарактеризовать положение максимума кооперативности, а также границы минимальных и максимальных значений парциального давления кислорода, при котором значение коэффициента Хилла не выходит за установленный предел. Максимумы кооперативности для рассмотренных наборов экспериментальных данных лежат в области больших парциальных давлений кислорода относительно значения p_{50} . Предлагаемый параметр кооперативности и модифицированное уравнение Хилла могут быть полезны при решении широкого круга задач, связанных с описанием согласованного взаимодействия элементов на всех уровнях пространственной организации белков, нуклеиновых кислот, их комплексов, а также такого взаимодействия для рецепторов и их медиаторов.

Более подробно результаты исследований изложены в цикле работ, опубликованных в журнале «Биофизика».

1. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Сулин В.Ю., Нечипуренко Ю.Д. Анализ моделей кооперативного связывания кислорода гемоглобином // Биофизика, 2021, т. 66, № 6, с. 1065-1073, doi: 10.31857/S000630292106003X.

2. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Нечипуренко Ю.Д. Новая интерпретация коэффициента Хилла // Биофизика, 2022, т. 67, № 2, с. 229-233, doi: 10.31857/S000630292202003X.

3. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Бучельников А.С., Нечипуренко Ю.Д. Кооперативное связывание кислорода гемоглобином как одна из обобщающих моделей в молекулярной биофизике // Биофизика, 2022, т. 67, № 3, с. 421-433, doi: 10.31857/S0006302922030012.

4. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Нечипуренко Ю.Д. Новая математическая модель, описывающая оксигенацию гемоглобина // Биофизика, 2022, т. 67, № 3, с. 444-450, doi: 10.31857/S0006302922030036.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ КМ/ММ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ ВАНАДАТ-ИОНА, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ УРИДИНФОСФОРИЛАЗОЙ ИЗ *V. CHOLERAЕ* QM/MM Study Of The Enzymatic Reaction Catalyzed By Uridine Phosphorylase From *V. Cholerae* With The Vanadate Anion

Лашков А.А.¹, Эйстрих-Геллер П.А.¹, Самыгина В.Н.^{1,2}, Рубинский С.В.¹

¹ Кристаллография и фотоника РАН, г. Москва, РФ, alashkov83@gmail.com

² НИЦ Курчатовский институт, г. Москва, РФ

Уридинфосфорилаза (УФаза) – фермент клеток эу- и прокариот, осуществляющий обратимо реакцию фосфоролитического расщепления пиримидиновых нуклеозидов и их производных. УФаза может использоваться как мишень для противоопухолевых и противопаразитарных препаратов, а так же в качестве биокатализатора при производстве фармакологически активных соединений – производных пиримидиновых нуклеозидов. Описать путь ферментативной реакции и рассчитать энергетические характеристики процесса можно, используя гибридные квантово-механические/молекулярно-механические (КМ/ММ) методы. В работе [1] экспериментально показано, что ортованадат-ион может служить субстратом для УФазы, наравне с фосфат-ионом: ванадат до определённой концентрации является более эффективным субстратом, чем фосфат.

В нашей работе проведено сравнение профилей электронной энергии (рис. 1а), рассчитанных методом эластичной ленты (NEB-CI) на уровне теории B97-3с, реакционного пути нуклеофильного замещения уридина гидроортованадат-ионом в сравнении с гидрофосфат-ионом в активном центре УФазы из патогенной бактерии *V. cholerae*. Профили энергии в начале реакционного пути хорошо соответствуют друг другу, но после точки активационного барьера начинаются существенные расхождения. Разница электронных энергий между субстратами и продуктами отрицательна и по модулю больше, чем для фосфата. Это приводит к смещению химического равновесия в сторону прямой реакции. После оптимизации геометрии переходного состояния методом следования за собственным вектором был выполнен расчёт свободной энергии активации (ΔG_A) на уровне теории DPLNO-CCSD(T)/ma-def2-TZVPP (B97-3с для численного расчёта гессиана). Расчёт колебательных частот атомов для оптимизированного переходного состояния комплексов фермента с субстратами, показал наличие одной мнимой частоты, соответствующей седловой точке переходного состояния.

ΔG_A для реакции с гидроортованадатом оказалось меньше на ~ 2 ккал/моль. Снижение барьера приводит к небольшому увеличению скорости реакции нуклеофильной атаки с участием гидрованадат-иона по сравнению с гидрофосфат-ионом. Следует заметить, что в приведенных расчётах никак не проявляется ингибирующий эффект высоких концентраций ванадат-иона на пиримидинфосфорилазы [1]. По-видимому, этот процесс связан со связыванием ванадата вне моделируемой методом КМ/ММ области молекулы фермента и требует дальнейшего изучения методами экспериментальной структурной биологии. Структура квантовой подсистемы в переходном состоянии комплекса приведена на рисунке 1б.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект No 19-29-12054) и Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН с использованием инфраструктуры ЦКП «Высокопроизводительные вычисления и большие данные» ФИЦ ИУ РАН (ЦКП «Информатика»).

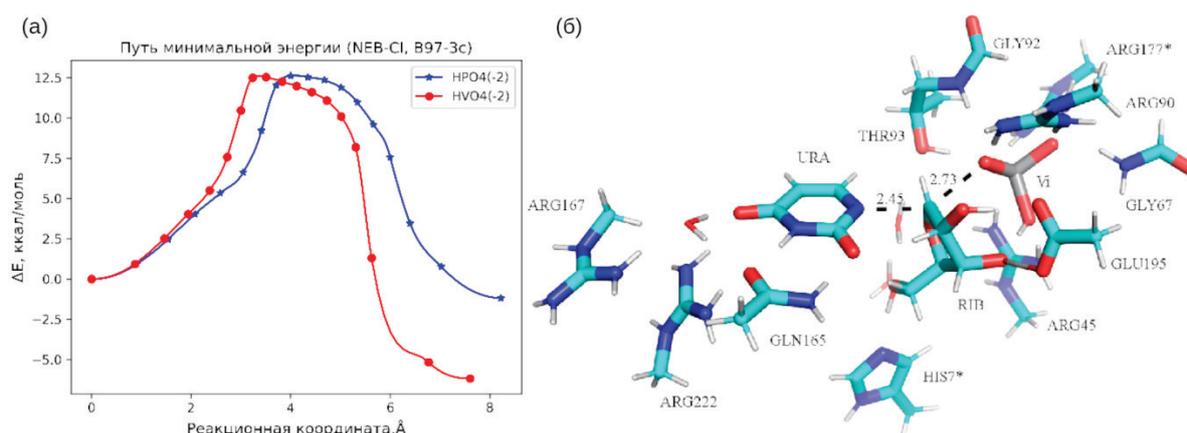


Рисунок 1. Зависимость разницы электронной энергии КМ/ММ-системы от координаты реакции нуклеофильного замещения (а) и структура квантовой подсистемы в переходном состоянии комплекса УФазы из *V.cholerae* с гидроортованадат-ионом (Vi), урацилом (URA) и рибозой (RIB) (б).

1. Antipov A.N., Okorokova N.A., Safonova T.N., Veiko V.P. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry 2022, vol. 27, pp. 221-227.

ОСОБЕННОСТИ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ САМООРГАНИЗАЦИИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Peculiarities of Modelling Self-Organization Processes in Biological Systems

Левашова Н.Т., Сидорова А.Э., Лукьяненко Д.В., Аргун Р.Л., Гараева А.Я., Зуев К.А., Георгиевская Е.П., Белова Е.В.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, г. Москва, РФ
 natasha@wanaku.net., ske314bone@mail.ru, lukyanenko@physics.msu.ru, garaeva.anastasija@physics.msu.ru,
 katyamalyshko@mail.ru

Одним из основополагающих подходов в области развития сложных систем является самоорганизация как общая теория неустойчивостей в системах различной природы [1]. Самоорганизация - «порядка через флуктуации» [2] формируется при наличии обратных связей, обусловлена свойствами системы и составляющих ее элементов и имеет принципиально пороговый характер. Общим принципом, описывающим процессы эволюции сложных систем, могут служить представления о самоорганизации в активных средах и иерархии сопряженных активных сред как согласования регулярных процессов соизмеримого временного и пространственного масштабов на общем уровне (активной среде) и разномасштабных процессов между уровнями в системе иерархии активных сред. Рассматриваются модели процессов самоорганизации в эволюции динамики размера генома прокариот и эукариот, динамики скорости негативных мутаций на популяционном уровне и формирования правой α -спирали на основе двухчастичной модели движения в потенциале Леннарда-Джонса.

В модели эволюционной динамики генома как сообщества самореплицирующихся элементов [3] рассматривается изменение размеров генома и кодирующей части в результате фиксации мутацией, способствующих видообразованию [4]. На горизонтальных уровнях иерархической структуры видообразования (прокариоты и эукариоты) наличие прямых и обратных связей (межгенных и межгеномных [5]) приводит к неустойчивому состоянию неравновесной системы генома и формированию новой структурно-функциональной организации – нового таксона. Модель содержит два стохастических параметра (размеры генома и кодирующей части, скорости мутаций), что приводит к удалению решения от начального состояния за длительный временной

период (4,5 млн лет). Особенностью моделирования является выработка критерия устойчивости решения с использованием устойчивости по Хайерсу-Уламу, при котором модель принимает физически осмысленные значения. Модель демонстрирует флуктуационно-бифуркационную траекторию динамики размера генома и кодирующей части, автокаталитический характер увеличения размера генома в процессе биологической эволюции от прокариот к эукариотам, общее снижение доли кодирующей части. Полученные результаты полностью соответствуют литературным данным.

Для создания модели динамики скорости негативных мутаций на популяционном уровне [6] использованы экспериментальные данные оценки скорости негативных мутаций двух групп мышей при условии отключения корректирующей активности полимеразы δ [7]. Модель представляет собой функцию, которая сначала быстро увеличивается во времени, а затем спадает практически до нуля. Подобное поведение решения может быть описано с помощью системы уравнений, включающей одно автоволновое уравнение (для активатора) и одно обыкновенное дифференциальное уравнение (для ингибитора). Для того, чтобы решение автоволнового уравнения обладало указанными особенностями использовано уравнение с квадратичной нелинейностью, имеющей два положения равновесия, между которыми со временем происходит переключение устойчивости. Показано, что в результате накопления негативных мутаций популяция переходит из состояния автоволновой самоорганизации в критическое состояние - все особи элиминируются. Получены уравнения обратной задачи, позволяющие определить начальные условия накопления негативных мутаций в популяции.

Модель формирования правой α -спирали на основе двухчастичной модели движения в потенциале Леннарда-Джонса [8] основана на ранее разработанном авторами методе оценки хиральности спиральных структур белков [9] и позволяет описать процесс перехода первичной полипептидной цепочки белков - одномерной активной среды с распределенным ресурсом свободной энергии в 3-хмерную α -спираль. В модели рассмотрено движение на дне потенциальной ямы, что позволило упростить алгоритм формирования вторичной белковой структуры, построенный при условии наличия нерегулярного и регулярного участков; расчет проводится только для попарного диполь-дипольного взаимодействия двух соседних частиц; в сформированной части молекулы положение аминокислотных остатков жестко закреплено водородными связями. Эти особенности позволили смоделировать белковые структуры типа «бусы», в то время как в литературе чаще встречаются структуры типа «облако». Развиваемый подход позволяет существенно дополнить физическим содержанием энергетический и геометрический анализ конформационных превращений пептидной цепи при фолдинге. Впервые модель подобного типа основана на принципе хиральности белковых структур. Модель подтверждает концепцию смены знака хиральности при переходе на следующий уровень структурно-функциональной организации белков в ходе самоорганизации.

1. Малинецкий Г.Г. Теория самоорганизации. На пороге IV парадигмы // Компьютерные исследования и моделирование, 2013, т. 5, № 3, с. 315-366.
2. Николис Г., Пригожин И. Самоорганизация в неравновесных системах: От диссипативных структур к упорядоченности через флуктуации. Пер. с англ. 1979, 512 с.
3. Эйген М., Шустер П. Гиперциклы. Принципы самоорганизации макромолекул. 1982, 272 с.
4. Sidorova A.E., Tverdislov V.A., Levashova N.T., Garaeva. A.Ya. A model of autowave self-organization as a hierarchy of active media in the biological evolution // Biosystems, 2020, vol. 198, p. 104234.
5. Patthy L. Genome evolution and the evolution of exon-shuf-fling - a review // Gene, 1999, vol. 238, no. 1, pp. 103-114.
6. Garaeva A.Y., Sidorova A.E., Levashova N.T., Tverdislov V.A. Self-Organized Criticality in the Autowave Model of Speciation // Moscow University Physics Bulletin, 2020, vol. 75, no. 5, pp. 398-408.
7. Uchimura A. et al. Germline mutation rates and the long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice // Genome Research. Cold Spring Harbor Laboratory, 2015, vol. 25, no. 8, pp. 1125-1134.
8. Zuev K.A., Levashova N.T., Malyshko E.V., Sidorova A.E., Tverdislov V.A. A Model of a Protein α Helix Formation Based on the Two-Particle Model of Motion in the Lennard-Jones Potentia // Moscow University Physics Bulletin, 2021, vol. 76, no. 4, pp. 226-232.
9. Sidorova A.E., Malyshko E.V., Kotov A.R., Tverdislov V.A., Ustinin M.N. Quantitative Criteria of Chirality in Hierarchical Protein Structures // Biophysics, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 155-166.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ РАЗЛИЧИЙ В РАЗВИТИИ
ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА ПУТЕМ КЛАСТЕРИЗАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
АЛГОРИТМА kMEANS, НА ПРИМЕРЕ МЫШЕЙ С ПЕРЕВИТОЙ КАРЦИНОМОЙ ЛЬЮИС**
The Research of The Possibility to Identify Differences in The Development of The Tumor Process by
Clusterization with The Help of the kMeans Algorithm on The Example of Mice with Lewis Carcinoma

Марнаутов Н.А., Елфимов А.Б., Комиссарова Л.Х.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва, РФ, nmarnautov@gmail.com

В работе исследована возможность кластеризации мышей на основе динамики развития опухолевого процесса. Задача кластеризации – классическая задача обучения без учителя, позволяющая группировать объекты, на основе различных признаков, что часто является важнейшим шагом для дальнейшего анализа данных [1, 2]. Исследование проводили на мышах линии C57Bl/6, с перевитой карциномой Льюис. Контрольной группе (группа №1) введение препаратов не осуществляли. Опытным группам проводили химиотерапию с использованием рубомицина (группа №2) / магнитолипосомального рубомицина (группы №3 - №4) [3]. Группу №4 дополнительно подвергали воздействию внешнего магнитного поля на область опухоли в течение 1 часа после введения препарата. Введение препаратов осуществляли на 10, 14, 18 сутки после перевивки опухоли. Достоверность различий между группами определяли с использованием U-критерия Манна-Уитни. Кластеризацию полученных данных осуществляли с использованием алгоритма k-средних (kMeans). Было обнаружено, что при кластеризации уверенно выделяется кластер мышей, не получавших химиотерапию. Так же было обнаружено, что при кластеризации на три кластера, большая часть мышей из групп №3 и №4 были отнесены к одному кластеру, не смотря на то, что на 21 сутки после перевивки опухоли между данными группами наблюдаются статистически достоверные различия ($p < 0.05$).

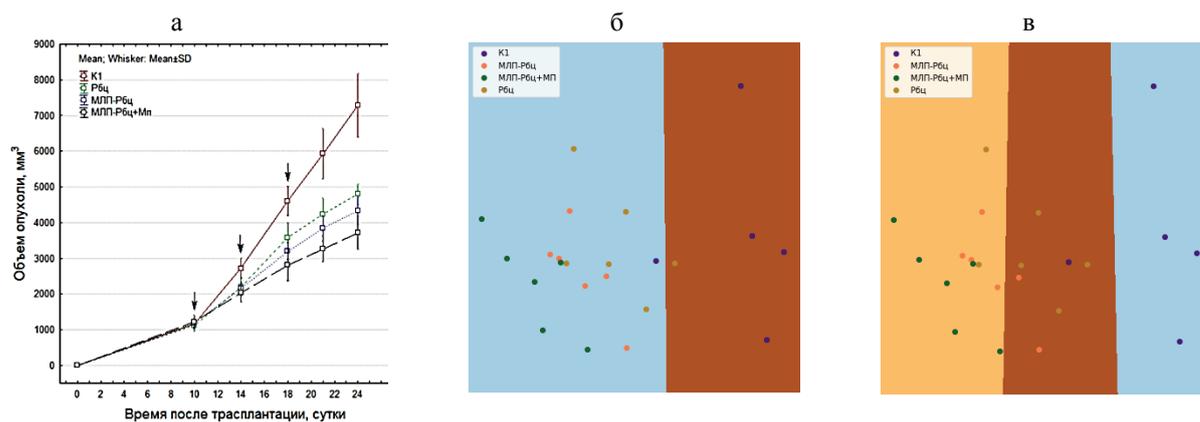


Рисунок 1. (а) Динамика роста карциномы Льюис в исследуемых группах животных. (б) Визуализация результатов кластеризации с применением алгоритма kMeans. Кластеризация на 2 кластера. (в) Кластеризация на 3 кластера

Полученные результаты показывают, что при кластеризации мышей линии C57Bl/6 с перевитой карциномой Льюис на основе динамики развития опухолевого процесса с использованием алгоритма kMeans можно выделять кластера отражающие различия в развитии опухолевого процесса.

1. kMRew1 Ghosal A., Nandy A., Das A.K., Goswami S., Panday M. A short review on different clustering techniques and their applications // Emerging technology in modelling and graphics, 2020, pp. 69-83.
2. Clustering1 Omran M.G. H., Engelbrecht A.P., Salman A. An overview of clustering methods // Intelligent Data Analysis, 2007, vol. 11, no. 6, pp. 583-605.
3. Марнаутов Н.А., Комиссарова Л.Х., Ерохин В.Н., Семенов В.А., Елфимов А.Б., Голощанов А.Н. Исследование действия магнитных липосом, нагруженных рубомицином, на динамику роста карциномы льюис у мышей // Вестник новых медицинских технологий, 2020, т. 27, № 4, с. 60-64.

СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ VPg ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ Y И КЭП-СВЯЗЫВАЮЩИХ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА EIF4E КАРТОФЕЛЯ

Structural Aspects of The Interaction of Vpg Potato Virus Y and Cap Binding Factors of The Potato Eif4e Family

Никонов О.С.¹, Лебедева М.В.², Никонова Е.Ю.¹, Колесникова В.В.^{1,3}, Таранов В.В.², Бабаков А.В.², Никонов С.В.¹

¹ Институт белка РАН, г. Пущино, РФ, kolesnikovavicto@yandex.ru

² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАН, г. Москва, РФ

³ ПушГЕНИ, г. Пущино, РФ

Вирус картофеля Y (PVY) является одним из наиболее распространенных и вредоносных растительных вирусов, имеет широкий круг хозяев, включая многие значимые сельскохозяйственные культуры, и вызывает значительное снижение их урожайности. PVY - это РНК(+) вирус, биосинтез белка которого осуществляется по кэп-зависимому механизму с использованием элементов системы инициации трансляции клетки хозяина. Роль кэп-структуры играет вирусный белок VPg, ковалентно связанный с 5'-концом вирусной мРНК. VPg узнается кэп-связывающим фактором клетки-хозяина (eIF4E), который образует с ним стабильный комплекс и вовлекает мРНК вируса в процесс биосинтеза белка. С нарушением этого взаимодействия связан один из основных механизмов устойчивости растений к вирусу картофеля Y. В геноме картофеля (*Solanum tuberosum* L.) мультисемейство факторов eIF4E представлено тремя генами – *eIF4E1*, *eIF4E2* и *eIF(iso)4E*. До настоящего времени было неизвестно, с какими именно факторами мультисемейства и каким образом связывается вирусный белок. Мы показали, что наиболее распространённый вариант VPg штамма NTN взаимодействует с изоформами картофеля eIF4E1 и eIF4E2, но не взаимодействует с eIF(iso)4E. Были сконструированы модели белков eIF4E1 и eIF4E2 картофеля и VPg вируса Y, на основании которых с использованием данных о природном полиморфизме аминокислотных последовательностей белка VPg было выдвинуто предположение о ключевой роли остатка R104 в узнавании кэп-связывающих факторов картофеля. Получены мутантные формы белка VPg с заменами в этом положении и проверена их способность связываться с eIF4E картофеля. С использованием полученных экспериментальных и известных структурных данных построена теоретическая модель комплекса VPg с eIF4E2. Предложенная модель существенно отличается от известных ранее моделей комплексов VPg вируса Y с eIF4E и хорошо соответствует имеющимся биохимическим данным.

Работа выполнена в рамках Госзадания: АААА-А19-119122490038-8 «Разработка алгоритма направленного изменения родства биологически значимых белков к их молекулярным партнерам»

ПРИМЕНЕНИЕ ALPHAFOLD В ПРЕДСКАЗАНИИ ИЗМЕНЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКА ВСЛЕДСТВИЕ МУТАЦИЙ

Using AlphaFold to Predict the Impact of Single Mutations on Protein Stability

Пак М.А., Иванков Д.Н.

Сколковский институт науки и технологий, г. Москва, РФ, marina.pak@skoltech.ru

Проблема сворачивания белка является центральной в биофизике. Она объединяет в себя несколько связанных проблем, включая предсказание структуры белка по последовательности и предсказание изменения стабильности белка в зависимости от мутаций. В четырнадцатом раунде независимого соревнования по предсказанию структуры белка Critical Assessment of Protein Structure Prediction (CASP) [1] беспрецедентный успех был продемонстрирован AlphaFold, который достиг экспериментальной точности в предсказании [2]. Тем не менее, другие проблемы, связанные со сворачиванием белка, в частности, предсказание эффекта мутации на стабильность белка, всё ещё не решены. В представленной работе мы изучили возможность применения AlphaFold в задаче предсказания изменения стабильности белка вследствие мутаций.

Мы исследовали применимость моделей, построенных AlphaFold в задаче предсказания изменения стабильности белка вследствие мутаций. Программы, использующие структуру белка для предсказания эффекта мутации, являются более точными, чем программы, использующие только последовательность [3]. Однако структура белка не всегда доступна. В случае недоступности структуры в задаче предсказания изменения стабильности белка вследствие мутаций с помощью методов, использующих структуру белка, есть два сценария. Первый - использовать структуру ближайшего гомолога данного белка непосредственно в предсказании эффекта мутаций. Второй - сначала построить модель структуры данного белка, а затем использовать её в предсказании изменения стабильности белка вследствие мутаций. Чтобы определить, какой из подходов является более точным, мы провели *in silico* мутагенез контрольного набора структур глобулярных мономерных белков из Protein Data Bank [4], их ближайших гомологов и моделей, построенных с помощью AlphaFold. Мы показали, что корреляция с экспериментальными значениями изменения стабильности вследствие мутаций выше в случае

использования структур ближайших гомологов, чем при использовании моделей, построенных AlphaFold. Таким образом, модели AlphaFold не повышают точность предсказания изменения стабильности белка вследствие мутаций, поэтому использование структуры ближайшего гомолога в предсказании эффекта мутации в случае недоступности структуры является более целесообразным подходом [5].

Можно ли использовать алгоритм AlphaFold напрямую в задаче предсказания эффекта мутаций на стабильность белка? Для ответа на этот вопрос мы извлекли набор данных экспериментальных значений изменения стабильности различных белков вследствие мутаций из базы данных ThermoMutDB [6] и построили модели структур дикого типа и мутанта с помощью AlphaFold. Далее мы извлекли метрики качества предсказания моделей с целью выявить наличие взаимосвязи между изменением уверенности AlphaFold в предсказании структур дикого типа и мутанта и экспериментальным изменением стабильности. Мы не обнаружили статистически значимой корреляции между данными величинами, на основании чего можно сделать вывод, что AlphaFold не может быть использован в задаче предсказания эффекта мутации. То есть, AlphaFold не может различить по свободной энергии сворачивания близкие структуры белка, что позволяет заключить, что AlphaFold не выучил функцию свободной энергии, управляющей сворачиванием белков [7].

Наши результаты показывают, что, несмотря на решение задачи предсказания структуры белка, другие проблемы сворачивания белка всё ещё требуют решения.

1. Kryshchak A., Schwede T., Topf M., Fidelis K., Moult J. Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP)-Round XIII // *Proteins: Structure, Function, And Bioinformatics*, 2019, vol. 87, no. 12, pp. 1011-1020, doi: 10.1002/prot.25823.

2. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // *Nature*, 2021, doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.

3. Sanavia T., Birolo G., Montanucci L., Turina P., Capriotti E., Fariselli P. Limitations and challenges in protein stability prediction upon genome variations: towards future applications in precision medicine // *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2020, vol. 18, pp. 1968-1979, doi: 10.1016/j.csbj.2020.07.011.

4. Berman H. The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28, no. 1, pp. 235-242, doi: 10.1093/nar/28.1.235.

5. Pak M.A., Ivankov D.N. Best templates outperform homology models in predicting the impact of mutations on protein stability // *Bioinformatics* (accepted), 2022.

6. Xavier J.S., Nguyen T.B., Karmarkar M., Portelli S., Rezende P.M., Velloso J.P.L., Ascher D.B., Pires D.E.V. ThermoMutDB: a thermodynamic database for missense mutations // *Nucleic Acids Research*, 2021, vol. 49, no. D1, pp. D475-D479, doi: 10.1093/nar/gkaa925.

7. Pak M.A., Markhieva K.A., Novikova M.S., Petrov D.S., Vorobyev I.S., Maksimova E.S., Kondrashov F.A., Ivankov D.N. Using AlphaFold to predict the impact of single mutations on protein stability and function // *BioRxiv*, 2021, doi: 10.1101/2021.09.19.460937.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ СЕЛЕКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА hDННС20 К ЛИПИДНОМУ СУБСТРАТУ: ИССЛЕДОВАНИЕ IN SILICO Molecular Mechanism of hDННС20 Enzyme Lipid Substrate Selectivity: in silico Study

Панина И.С.^{1,2}, Крылов Н.А.^{1,2}, Чугунов А.О.^{1,2}, Ефремов Р.Г.^{1,2}, Кордюкова Л.В.³

¹ Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», г. Москва, РФ

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, РФ

³ МГУ имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, г. Москва, РФ,

irinaspanina@gmail.com

S-ацилирование – обратимая посттрансляционная модификация белков путем ковалентного присоединения остатков жирных кислот к остаткам цистеина через тиоэфирную связь. Наиболее распространенная форма S-ацилирования — пальмитоилирование (присоединение остатков пальмитиновой кислоты, C16:0), однако могут быть присоединены и другие типы жирных кислот. S-Ацилирование катализируется семейством мембранных ферментов ДННС-ацилтрансфераз с консервативным каталитическим мотивом Asp-His-His-Cys. Процесс катализа включает 2 стадии: (1) автоацилирование с помощью ацил-КоА; (2) ацилирование белкового субстрата путем переноса присоединенного остатка жирной кислоты, располагающегося во внутренней полости фермента, образованной четырьмя трансмембранными сегментами. Семейство ДННС-ацилтрансфераз человека (hDННС) насчитывает 23 члена, отличающихся специфичностью к белковому субстрату, а также длиной транспортируемой ацильной цепи. Несмотря на важную роль пальмитоилирования в процессе функционирования множества клеточных и вирусных белков, молекулярные аспекты субстратной селективности ферментов ДННС остаются неясными.

hDННС20 является единственным белком человека с известной 3D-структурой [1], который ацилирует, например, рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR), белки вируса гриппа А и спайковый (S) белок SARS-CoV-2. Было показано, что преимущественный перенос ферментом цепи C16 можно изменить в сторону

предпочтительного связывания как более короткого остатка миристата (C14), так и удлиненного остатка стеарата (C18) путем внесения точечных мутаций S29F или Y181A, соответственно [1].

В настоящей работе с помощью метода молекулярной динамики (МД) было проведено исследование трех систем, имитирующих различные этапы автоацилирования hDHNС20 дикого типа (WT) и его мутантов S29F и Y181A: 1) белок, встроенный в гидратированный липидный бислой; 2) “преацелирование”, когда химическая реакция еще не произошла, однако ацил-КоА расположен в полости фермента; 3) “постацелирование”, когда остаток жирной кислоты ковалентно связан с каталитическим остатком Cys156. В расчетах МД использовали укороченный аналог КоА — ацил- β -меркапто-этиламин — с присоединенными к нему насыщенными ацильными цепями различной длины: C12, C14, C16, C18, C20. Расчеты проводили в программе GROMACS версии 2020.4 с использованием силового поля CHARMM36. Длина траектории составляла от 500 нс до 1 мкс.

Показано, что внутренняя полость белка формируется только в присутствии липидного субстрата или, в его отсутствие, за счет ацильной цепи фосфолипидов мембраны. Остаток Trp158, консервативный среди ферментов DННС, служит «воротами» внутренней полости. В случае, когда его индольное кольцо направлено внутрь белка, ограничивая проникновение липидных хвостов, полость представляет собой область пониженной белковой плотности. Установлено, что селективность hDHNС20 и его мутантов определяется наличием в структуре внутренней полости фермента «бутылочного горлышка», в которое упирается кончик хвоста несвязанного ацил-КоА. Алкильная цепь, длина которой позволяет произвести позиционирование атома S ацил-КоА на минимальном расстоянии от каталитического остатка Cys, является предпочтительной для этого фермента. Кроме того, был обнаружен выраженный гидрофильный участок на поверхности трансмембранной спирали белка, который может служить для связывания белкового субстрата. Полученные результаты выявили структурные особенности фермента hDHNС20, лежащие в основе селективного распознавания им липидного и белкового субстратов.

Работа выполнена в рамках программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ. Суперкомпьютерные расчеты выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант 20-54-12007).

1. Rana M.S. et al. Fatty acyl recognition and transfer by an integral membrane S-acyltransferase // Science, 2018, vol. 359, no. 6372, p. eaao6326, doi: 10.1126/science.aao6326.

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ НИША КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ЯМА, ОПРЕДЕЛЯЮЩАЯ СОБСТВЕННЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ВОЛНОВОЙ ФУНКЦИИ ЖИВОГО Ecological Niche as a Potential Pit that Determines the Eigenvalues of the Wave Function of the Living

Стригин М.Б.

ООО Митриал, г. Челябинск, РФ, strigin1969@gmail.com

Важнейшим понятием в биологии является экологическая ниша. Представление о ней активно эволюционирует последние сто лет, начиная с работ Гаузе, Лэка, Элтона, которые продолжили Хатчинсон, Шелфорд и другие. Данная работа выдвигает гипотезу, что экологическая ниша выступает аналогом потенциальной ямы в квантовой механике, что позволяет применить инструментарий последней. Тогда вид живого (животных или растений) является собственным значением некоторой волновой функции и осциллирует, подобно электрону в атоме, фону в кристалле, и т. д. Во всех случаях собственные значения определяются граничными условиями, а проще говоря, некоторой геометрией потенциальной ямы. Представления квантовой механики об указанных границах эволюционируют – фазовое пространство имеет уже не три координаты, а шесть, куда вошли координаты импульсов. Кроме того, появилось представление о спине электрона, что привело к увеличению размерности и пониманию тонкого и сверхтонкого расщепления.

Аналогично этому в биологии имеется представление об *экологической нише*, внутри которой осциллирует биологическая сущность — вид живого, что изображено на рисунке 1. Васнецов однозначно признавал носителем ниши «члена сообщества», или «животное», оговаривая, что под последним должна пониматься не особь, а вид или род [1]. Подобно механике Дж. Э. Хатчинсоном была построена модель экологической ниши как гиперобъёма, где имеется собственное фазовое пространство, и вместе с координатами и скоростями фигурируют другие экологические факторы.

Цифрой 1 обозначено незначительное изменение ниши, не приводящее к изменению вида, который продолжает осциллировать внутри этой ниши. На следующем этапе, на второй диаграмме барьер экологической ниши существенно снижается, что приводит к смене ниши и в итоге к новому виду живого (предыдущий барьер здесь обозначен пунктиром).

Также как в квантовой механике, где координаты, импульсы и спиновые параметры независимы, в модели Хатчинсона принято, что реакция на один фактор не зависит от воздействия другого фактора, и факторы независимы друг от друга. В его модели представлен n-мерный куб, где на осях отложены координаты, обозначающие экологические факторы, лежащие в некоторых диапазонах, названных Шелфордом диапазонами толерантности. На наш взгляд, эта модель воспроизводит представление о волновом уравнении Шредингера (1):

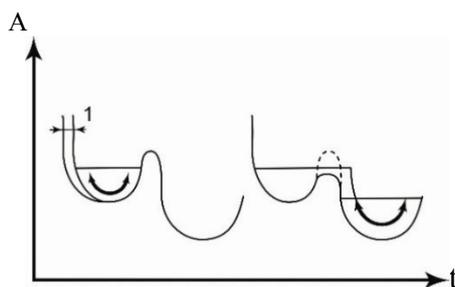


Рисунок 1. Эволюция экологических ниш. На диаграммах дугообразной широкой стрелкой показаны осцилляции биологического вида внутри ниш. Горизонтальные прямые демонстрируют максимальную амплитуду осцилляций и показывают, что они не могут подняться выше потенциала экологической ниши.

$$i\hbar \frac{d\varphi}{dt} = (H_0 + H_1 + H_2 + \dots)\varphi, \quad (1)$$

где H_0 — гамильтониан, определяемый ближайшей геометрией, например, структурой атома, внутри которого находится электрон, и который можно назвать *фундаментальной нишей*, а дополнив Хатчинсона можно рассматривать H_0 для живой системы как *потенциал экологической ниши*, которая определяется географией, пищевыми ресурсами, параметрами температуры, влажности и т.п.; H_1 — малая поправка, которая определяется, например, движением пролетающего рядом электрона (в терминах биологии — конкурента), или пролетающего рядом атома — хищника, поскольку первый может выбить рассматриваемый электрон и занять его место, а второй может выхватить электрон из начального положения и присвоить его. Тогда H_1 можно назвать реализованной нишей, которая модулирует H_0 , H_2 в уравнении оперирует внутренним ресурсом и связан эволюцией Ламарка. Кроме того, закон Гаузе о том, что внутри одной экологической ниши может проживать только один вид животных [2], воспроизводит «принцип Паули».

1. Озерский П.В. К формализации концепции экологической ниши Элтона-Одума. История вопроса // Научные труды кафедры зоологии РГПУ им. Герцена, 2013, т. 13, № 1, с. 55-68.
2. Галл Я.М., Лэк Д. Две версии видообразования, либо от нейтрализма к адаптационизму // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2014, т. 18, № 3, с. 585-598.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КЛАСТЕРОВ ДНК-DPS ПРИ ИЗМЕНЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ 4-ГЕКСИЛРЕЗОРЦИНА Structural Peculiarities of DNA-DPS Clusters at Different Concentrations of 4-Hexylresorcinol

Терешкина К.Б.¹, Лойко Н.Г.², Терешкин Э.В.¹, Коваленко В.В.¹, Генералова А.А.¹, Крупянский Ю.Ф.¹

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова, г. Москва, РФ,

ksenia.tereshkina@chph.ras.ru

² ФИЦ Биотехнологии РАН

В настоящее время приобретает всё большую актуальность проблема бактериальной устойчивости к антибиотикам, дезинфектантам, антисептикам и пр. Одним из способов защиты от стресса у бактерий является внутриклеточное связывание и кристаллизация ДНК с ферритиноподобными ДНК-связывающими белками DPS (DNA-binding protein from starved cells). Белки DPS представляют собой шарообразные гомододекамеры с полостью внутри (третераэдрическая точечная группа симметрии T, 23-й класс по международной классификации). Каждая субъединица белка DPS *Escherichia coli* имеет экспонированный наружу свободный N-конец, богатый остатками лизина, с помощью которого происходит связывание ДНК [1]. При переходе бактериальной колонии в стационарную фазу роста, в 30 раз увеличивается синтез белка DPS и его последующая кристаллизация с образованием со-кристаллов с бактериальной хромосомой. Также в стационарной фазе роста резко увеличивается синтез аутоиндукторов анабиоза, производных алкилрезорцинов [2]. Одним из наиболее близким химическим аналогом этого типа соединений является 4-гексилрезорцин [3], воздействие которого на бактериальные клетки имеет концентрационный эффект от увеличения выживаемости клеток до их гибели [4].

В данной работе методом молекулярной динамики в полноатомном приближении исследуется динамическое поведение и структура комплексов белка DPS в растворе с короткоцепочечной ДНК (25 пар нуклеотидов) при изменении концентрации 4-гексилрезорцина от 0 до 50, 100 и 500 молекул на комплекс ДНК-DPS. Получены пространственные и энергетические характеристики комплексов.

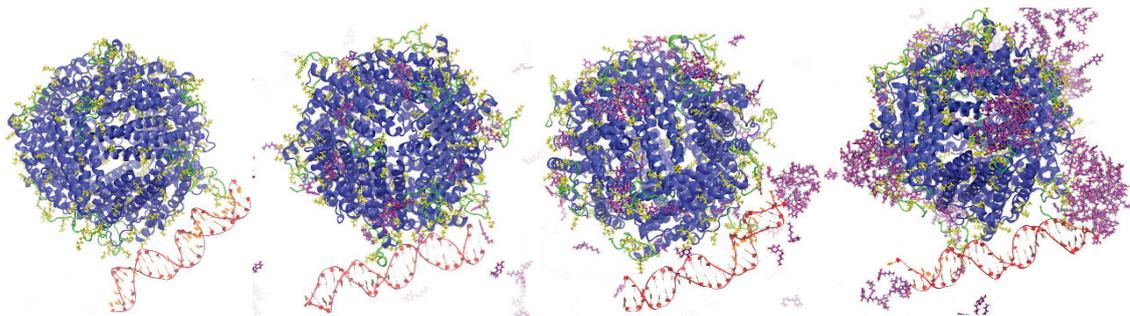


Рисунок 1. Структура комплексов ДНК (25 п.н.) с додекамером DPS *E. coli* при добавлении 0, 50, 100, 500 молекул 4-гексилрезорцина (слева направо). Синим показаны молекулы DPS (зелёным выделены подвижные N-концевые участки, жёлтым – остатки лизина); красным – ДНК, фиолетовым – молекулы 4-гексилрезорцина

Показано, что радиус гирации DPS достигает максимума при малых концентрациях 4-гексилрезорцина (50 молекул) за счёт связывания одиночных молекул с поверхностью белка (рис. 1), что увеличивает подвижность N-концов. Увеличение до 500 числа молекул 4-гексилрезорцина на белок приводит к образованию агломератов этого соединения на поверхности белка, особенно в области N-концов, а также у концевых участков ДНК. Свободная энергия связывания ДНК, полученная методом поиска линейной энергии взаимодействия (LIE), без 4-гексилрезорцина $\Delta G = -49$ кДж/моль, с 500 молекулами $\Delta G = -150$ кДж/моль. Таким образом, 4-гексилрезорцин с одной стороны способствует образованию комплексов ДНК-DPS, с другой стороны, его высокие концентрации приводят к образованию стабильных комплексов, что может препятствовать последующему освобождению ДНК, и приводить к гибели клетки.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (Тема FFZE-2022-0011, № 122040400089-6 и 122040800164-6). Расчеты проводились на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (МЦ РАН), проект СРН2.

1. Tereshkin E.V., Tereshkina K.B., Kovalenko V.V., Loiko N.G., Krupyanskiy Y.F. Structure of DPS protein complexes with DNA // Russian Journal of Physical Chemistry B, 2019, vol. 13, no. 5, pp. 769-777, doi: 10.1134/s199079311905021x.

2. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005, 367 с.

3. Nikolaev Y.A., Tutel'yan A.V., Loiko N.G. et al. The use of 4-Hexylresorcinol as antibiotic adjuvant // PLoS One, 2020, vol. 15, no. 9, p. e0239147, doi: 10.1371/journal.pone.0239147.

4. Tereshkin E.V., Loiko N.G., Tereshkina K.B., Krupyanskiy Y.F. Migration of 4-Hexylresorcinol Through Escherichia coli Cell Membranes. // Russian Journal of Physical Chemistry B, 2021, vol. 15, no. 6, pp. 1026-1035, doi: 10.1134/S1990793121060099.

ВЛИЯНИЕ СЛАБОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ТРИХОПЛАКСОВ (PLACAZOEA), ОПОСРЕДОВАННОЕ Ca-КАНАЛАМИ Т-ТИПА Effect of Weak Electromagnetic Radiation on *Trichoplax* (Placozoa), Mediated by T-type Ca Channels

Халаимова А.В.¹, Кузнецов А.В.²

¹ Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь, РФ, halaimovaalika@mail.ru

² Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ

Тимофеев-Ресовский разработал «теорию мишени» для поражающего действия ионизирующей радиации на биологические объекты [1]. Воздействия в диапазоне волн с частотой порядка микросекунд имеют гораздо меньшие энергии по сравнению с жестким излучением. Точками приложения слабого излучения могут быть сенсоры/рецепторы живых клеток. Низкопороговые Ca_v3 каналы Т-типа являются наиболее подходящими кандидатами в качестве мишеней для данного типа излучения [2]. С другой стороны, трихоплекс (тип Пластинчатые) является родственником древних многоклеточных животных и удобным модельным организмом. Поэтому воздействие электромагнитных полей в водной среде на трихоплекса является не только одним из фундаментальных вопросов биофизики, но проливает свет на далекие события в эволюционной истории Земли. Цель - исследовать влияние электромагнитного излучения на движение трихоплексов, опосредованное его низкопороговыми кальциевыми каналами. Объектом изучения были гаплотипы/штаммы трихоплекса Н1, Н2 и Н13. Предметом исследования являются кальциевые каналы трихоплекса TCa_v1 , TCa_v2 и TCa_v3 .

Культивирование и опыты по электрофизиологии трихоплексов Н1, Н2 и Н13 проводили как описано ранее [3]. Аминокислотные последовательности соответствующих протеинов найдены в базе данных NCBI.

Пространственные модели кальциевых каналов разных штаммов трихоплаксов строили на сервере Phyre2. Докинг низкомолекулярных лигандов осуществляли на сервере SwissDock.

Полученные 3D-модели представляют типичную $\alpha 1$ -субъединицу Ca-каналов. Центральная часть $\alpha 1$ -субъединицы формирует кор и состоит из 4 симметричных частей, каждая из которых, включает 2 длинные α -спирали. Центральный поровый домен окружён 4 сенсорными доменами, каждый из которых состоит из 4 плотно упакованных антипараллельных α -спиралей, пронизывающих липидный бислой, как и вышеупомянутые центральные α -спирали, образующие пору. Выявлены отличия между гаплотипами трихоплаксов в A1D и IQ доменах, расположенных со стороны цитоплазмы и разница в длинах запирающих петель снаружи клетки.

После того как обнаружили, что 2 металлических электрода оказывают на трихоплаксов эффект вследствие образования гальванопары, использовали источник постоянного тока AA (1,5 В, 250 мА) и резисторы от 1 кОм до 10 мОм. В эксперименте на 55 трихоплаксах H13 показано, что с увеличением тока от 0,2 до 150 мкА время реакции животных на воздействие сокращается примерно в 7 раз. Животные перемещались в «зоны комфорта» с наименьшей напряжённостью электрического поля.

Воздействие прямоугольными электрическими импульсами амплитудой 200 мВ с длительностью и задержкой по 35 мс на трихоплаксов H2 (141 животное) и H13 (158 животных) проводили в присутствии амлодипина, верапамила, циннаризина или спирта в двух повторностях. Подсчитывали долю обездвиженных электричеством животных и долю особей, покинувших зону электродов (электродную ловушку). Измеряли время за которое трихоплакс отползает от электродов на расстояние в 2 собственных тела. При исследовании штамма H13 результаты были более убедительны, чем на H2. Под действием электрических импульсов в электродной ловушке оставался 81% животных, в то время как в присутствии амлодипина, наоборот, убежало 94% животных. Время, за которое трихоплаксы покидали электродную ловушку было минимальным при добавлении амлодипина. Доля обездвиженных животных и доля таковых способных покинуть ловушку были примерно одинаковы для верапамила, циннаризина и спирта.

Результаты экспериментов по докингу показали, что амлодипин в отличие от других блокаторов взаимодействует как с карманом между сенсорным и проводящим доменами ($\Delta G = -8,09$ ккал/моль), так и с запирающей петлей ($\Delta G = -7,70$ ккал/моль) канала TCa_{v3} . Таким образом, амлодипин ограничивает подвижность сенсорной α -спирали PIS4, которая через шарнир открывает либо закрывает канал, а также вмешивается в работу запирающей петли, расположенной над входом в канал. Это нарушает тонкое взаимодействие частей сенсорного механизма и блокирует работу TCa_{v3} -канала, что позволяет трихоплаксу не реагировать на приложенные электрические воздействия.

Этанол, который связывался с запирающей петлей TCa_{v3} -канала ($\Delta G = -5,49$ ккал/моль) в экспериментах *in silico*, приводил к диссоциации *Trichoplax* sp. H2 на отдельные клетки в опытах *in vitro* в концентрации 10%. Амлодипин тоже связывался с запирающей петлей TCa_{v3} -канала, вызывал диссоциацию трихоплаксов в концентрации 100 мкМ, а в меньшей дозе снимал негативные эффекты электрических импульсов (94 и 65% убежавших из электродной ловушки животных за время 81 и 91 сек для штаммов H2 и H13, соответственно). Верапамил для которого характерно интенсивное связывание как с карманом ($\Delta G = -9,10$ ккал/моль), так и с S-петлями ($\Delta G = -8,74$ ккал/моль) TCa_{v3} -канала, вызывал очень медленную диссоциацию трихоплаксов. Циннаризин не взаимодействовал с запирающей петлей, а связывался с S-петлей с $\Delta G = -7,76$ ккал/моль, а также был обнаружен в двух сайтах кармана с $\Delta G -7,37$ и $-7,05$ ккал/моль, соответственно. Анализ всех значимых мест связывания на поверхности канала TCa_{v3} позволил выявить ещё два участка на поверхности сенсорного домена, обращённой к липидной фазе, что возможно, имеет биологический смысл, т.к. циннаризин плохо растворим в воде. Такое множественное действие циннаризина, возможно, объясняет его слабый протективный эффект о чём свидетельствуют 52% убежавших из электродной ловушки животных за время 160 и 104 сек для штаммов H2 и H13, соответственно.

Тщательный подбор импульсных режимов электрического воздействия на трихоплаксов позволил найти оптимальные параметры и избежать побочные эффекты электролиза и электрофореза, а выбор специфических блокаторов кальциевых каналов показал, что воздействие направлено на изучаемые мишени – низкопороговые кальциевые каналы III-го типа.

Амлодипин – специфический ингибитор этих каналов нарушал работу сенсорного домена, вклиниваясь между ним и ионпроводящим доменом. Помимо этого, действие амлодипина выражалось и во взаимодействии с запирающей петлей, что возможно, приводило к последующей диссоциации трихоплаксов на отдельные клетки. В случае с этанолом, как и с амлодипином наблюдалась достаточно быстрая диссоциация трихоплаксов на отдельные клетки, возможно, как следствие взаимодействия этих низкомолекулярных лигандов с запирающей петлей канала TCa_{v3} . Верапамил встраивался в карман канала TCa_{v3} как и амлодипин, но не взаимодействовал с запирающей петлей как спирт, однако реагировал с S-петлей и приводил к медленной диссоциации трихоплакса на отдельные клетки. Возможно, слабое протективное действие циннаризина на трихоплакса штамм H2, обусловлено отсутствием связывания с запирающей петлей, но наоборот, с сильным взаимодействием с S-петлей на внеклеточной стороне и способностью заполнять карман между сенсорным и проводящим доменами, таким образом, нарушая их динамическое взаимодействие, а также со связыванием с сенсорным доменом со стороны липидного бислоя.

Трихоплакс не подчиняется простым правилам кинезиса или таксиса, а ищет "зоны комфорта", где внешнее раздражение минимально.

Ингибиторный анализ выявил разнообразное физиологическое действие таких блокаторов

потенциалзависимых кальциевых каналов, как амлодипин, верапамил, циннаризин и спирт. Амлодипин и спирт приводили к диссоциации трихоплаксов на отдельные клетки. В отличие от спирта, амлодипин в малых концентрациях проявлял кратковременный протективный эффект от электрического воздействия на трихоплаксов.

Докинг подтвердил, что взаимодействие таких лигандов, как амлодипин, верапамил, циннаризин и спирт с определенными участками TCa_v3 -канала вызывает соответствующие физиологические эффекты: от диссоциации животного на отдельные клетки до защиты от электрического воздействия.

1. Тимофеев-Ресовский Н.В., Иванов В.И., Корогодин В.И. Применение принципа попадания в радиобиологии. М.: Атомиздат, 1968, 228 с.

2. Gauberg J., Senatore A., Heyland A. Functional Studies of *Trichoplax adhaerens* Voltage-Gated Calcium Channel Activity // *Methods Mol Biol.*, 2021, vol. 2219, pp. 277-288.

3. Кузнецов А.В., Кулешова О.Н., Пронозин А.Ю., Кривенко О.В., Завьялова О.С. Действие прямоугольных электрических импульсов низкой частоты на трихоплакса (тип Placozoa) // *Морской биологический журнал*, 2020, т. 5, № 2, с. 50-66.

МЕЗОМАСШТАБНЫЙ ПОДХОД К МОДЕЛИРОВАНИЮ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ АВТОМАТОВ

Mesoscale Approach to Modeling Photosynthetic Electron Transport Using Cellular Automata

Хрушев С.С., Плюснина Т.Ю., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, г. Москва, РФ, styx@biophys.msu.ru

Сложная структурная организация фотосинтетического аппарата высших растений имеет большое значение для успешного протекания процессов запасаения энергии света в форме химических связей. В настоящее время подробно изучена молекулярная организация трансмембранных мультиферментных комплексов, в которых происходят основные фотохимические и окислительно-восстановительные процессы фотосинтеза, и механизмы взаимодействия с ними подвижных переносчиков электрона белковой и хинонной природы. Основанное на этих данных математическое моделирование позволило выявить многие из ключевых механизмов первичных фотобиологических процессов, происходящих в пределах молекулярных комплексов размером порядка десятков нанометров и имеющих характерные времена в диапазоне от фемто- до наносекунд. Полученные результаты дали возможность понять, почему трансформация энергии не может происходить в гомогенной среде, но требует локализации окислительно-восстановительных реакций в крупных трансмембранных белковых комплексах. Это позволило выявить наиболее чувствительные к действию физических и химических факторов стадии первичных процессов фотосинтеза, что имеет большое практическое значение для применения биофизических подходов в экологическом мониторинге и био- и агротехнологиях.

Однако физический смысл сложной пространственной организации тилакоидных мембран хлоропластов и гетерогенного распределения трансмембранных комплексов в разных их участках до сих пор не очевиден. Данные криоэлектронной микротомографии показывают, что плотно упакованные стопки тилакоидов – граны – «пронизывают» менее плотно упакованные стромальные ламеллы, и в области контакта гранальных и стромальных ламелл происходит формирование спиральных структур, соединяющих эти два типа ламелл. Для каждого из этих трех типов тилакоидов характерен свой белковый состав мембраны. Традиционные модели броуновской и молекулярной динамики с атомным разрешением требуют чрезвычайно больших вычислительных ресурсов и не позволяют промоделировать для таких больших структур процессы, характерные времена которых варьируют от миллисекунд до секунд и минут. Математические модели, основанные на решении дифференциальных уравнений в частных производных, также оказываются неподходящими для моделирования процессов в хлоропласте, так как размер мобильных агентов, осуществляющих перенос электрона, оказывается сравнимым с размерами компартментов, в пределах которых происходит диффузия, и обычные представления о концентрации оказываются неприменимыми. Поэтому для анализа происходящих в таких структурах процессов необходима разработка новых мезомасштабных подходов к математическому моделированию.

В данной работе рассматривается основанная на методе клеточных автоматов модель фрагмента хлоропласта, включающего грану и сопряженные с ней стромальные тилакоидные ламеллы. В качестве основы для модели разработана аналитическая геометрия грани и окружающих ее стромальных ламелл, воспроизводящая наблюдаемую в эксперименте ультраструктуру, и позволяющая варьировать форму компартментов изменением числовых параметров. Пространство внутри хлоропласта разбивается на ромбододекаэдрические ячейки объемом 2 nm^3 , используются тороидальные (периодические) граничные условия. Каждой ячейке присваивается идентификатор компартмента: строма, люмен либо тилакоидная мембрана, и производится расстановка трансмембранных белковых комплексов и мобильных переносчиков электрона. Белковые молекулы занимают несколько соседних ячеек, их форма задается по данным рентгеноструктурного анализа или криоэлектронной микроскопии. Модель является дискретной по времени, на каждом шаге моделирования рассчитываются вероятности перемещения молекул подвижных переносчиков

электрона в пространстве, переноса электрона между подвижными переносчиками и трансмембранными комплексами, и переноса электрона между редокс-центрами, входящими в состав трансмембранных комплексов. Предложенный подход позволил создать модель грани тилакоида, состоящей из нескольких тысяч трансмембранных белковых комплексов и подвижных белков – переносчиков электрона.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500060-0 при частичной поддержке грантов РФФИ № 20-04-00465 и РФФ № 22-11-00009.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАНАЛА OMPF ПОРИНА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* С НОРФЛОКСАЦИНОМ

Interaction of the *Yersinia Pseudotuberculosis* OmpF Porin Channel with Norfloxacin

Чистюлин Д.К., Зелепуга Е.А., Хоменко В.А., Новикова О.Д.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, cdk27@mail.ru

In silico анализ пассивной проницаемости нерастворимого в воде норфлоксацина (Nf) и гидрохлорида норфлоксацина (NfHCl) через DOPC бислойную мембрану выявил наличие высокого потенциального барьера для основания и соли Nf (порядка 7,6 ккал/моль), что указывает на транспорт данного антибиотика через пориновый канал OmpF белка. Проведенные электрофизиологические исследования показали следующее. Добавление NfHCl в ячейку, со встроенным в липидный бислой OmpF порином *Y. pseudotuberculosis*, вызывало появление многочисленных событий блокировки пориновых каналов. Вероятно, молекулы водорастворимого NfHCl диссоциируют на ионы и на короткое время, связываясь с участками внутри канала, блокируют ионный ток. В ходе эксперимента на одиночных каналах (20 нг/мл белка) были выявлены особенности взаимодействия антибиотика с порином. Потенциал на мембране варьировали в пределах от -100 до +100 мВ, антибиотик добавляли с разных сторон от мембраны, а порин – с *cis*-стороны. Четыре принципиально различных положения ионов NfH⁺ по отношению к молекуле порина указаны на рисунке А-Г.

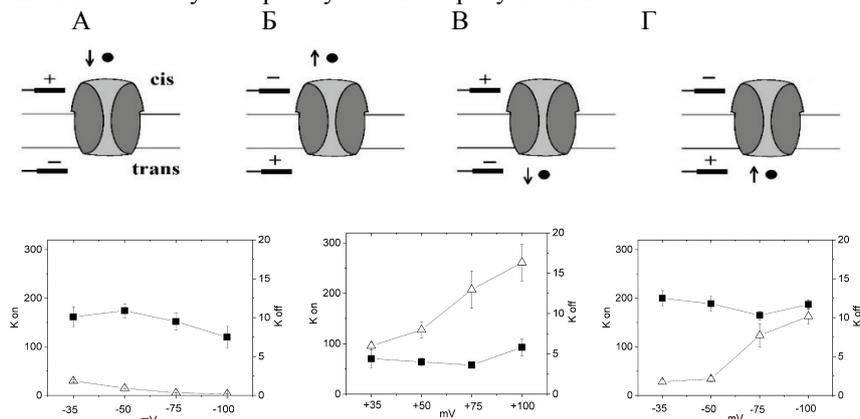


Рисунок 1. А – NfH⁺ с *cis*-стороны и потенциал на *cis*-электроде положительный; Б – NfH⁺ с *cis*-стороны и потенциал на *cis*-электроде отрицательный; В – NfH⁺ с *trans*-стороны и потенциал на *cis*-электроде положительный; Г – NfH⁺ с *trans*-стороны и потенциал на *cis*-электроде отрицательный

Графики значений кинетических констант K_{on} (белые треугольники) K_{off} (чёрные квадраты) приведены под каждой соответствующей схемой.

Обнаружено, что на кинетические параметры взаимодействия влияет изначальное положение молекулы NfHCl по отношению к порину, направление потенциала на мембране, а также его величина. Максимальные значения констант ассоциации (K_{on}) и минимальные констант диссоциации (K_{off}) наблюдались при добавлении NfH⁺ с *cis* стороны мембраны (рис. А), что свидетельствует о максимальном времени и количестве событий связывания. При этом увеличение потенциала приводит к возрастанию K_{on} и не влияет на K_{off} . При смене направления потенциала и увеличении его до 75-100 мВ (рис. Б) резко уменьшается количество событий связывания, а время блокировки канала уменьшается в среднем в два раза. Вероятно, в данном случае электрическое поле, действуя на ион NfH⁺ препятствует процессу связывания и прохождению антибиотика через канал. Добавление NfHCl с *trans*-стороны также уменьшает количество событий и время связывания (рис. Г). Однако при воздействии электрического поля высокой интенсивности (ниже -50 мВ), направленного с *trans*-стороны мембраны, количество событий блокировки резко возрастает. Интересно, что при воздействии (положительного на *cis*-электроде) потенциала, препятствующего вхождению заряженной молекулы (если она с *trans*-стороны), события блокировки канала не регистрируются (рис.В).

Данные электрофизиологических исследований согласуются с результатами молекулярного докинга, свидетельствующими о наличии двух сайтов связывания NfH⁺, локализованных с обеих сторон внутри канала OmpF порина. Показано, что электростатические взаимодействия вносят основной вклад при связывании

антибиотика с обоими сайтами. При этом с *cis*-стороны ключевым остатком является Arg323 (-4,2 ккал/моль), с *trans*-стороны — Asp92 (-9,3 ккал/моль). Таким образом, по-видимому, самостоятельное движение молекул NfHCl в основном происходит от *cis*-к *trans*-стороне мембраны, приводя к тому что клетки поглощают антибиотик из внешней среды. Обратное движение возможно, и оно значительно усиливается при приложении потенциала ниже -50 мВ, при этом NfH⁺ может достигнуть сайта блокировки через потенциальный барьер.

МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ХИРАЛЬНОСТИ РЕГУЛЯРНЫХ И НЕРЕГУЛЯРНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ

Method for Determining the Chirality of Regular and Irregular Protein Structures

Шпигун Д.К., Луценко А.О., Сидорова А.Э.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ, denish.den@mail.ru,
aleksluchrus@yandex.ru, sky314bone@mail.ru

Хиральность, как управляющая характеристика стратификации в иерархиях структур биомакромолекул и их функциональных особенностей, занимает особое место в исследованиях природных белковых структур. В связи с этим большое внимание уделяется решению задач, связанных с разработкой критериев и методов оценки хиральности биомолекул.

Первичная структура белков представлена последовательностью аминокислот, которые способны образовывать различные регулярные и нерегулярные вторичные структуры. Большинство регулярных структур представлено спиралями разных типов, из которых наиболее распространенными являются правые α - и 3_{10} -спирали и левые полипролиновые спирали [1]. Нерегулярные структуры имеют принципиальное значение для функционирования всего белка, поскольку являются связующими частями для различных вторичных структур [2].

В данной работе представлен метод оценки хиральности регулярных (α -, 3_{10} - и π -спиралей) и нерегулярных (β - и α -поворотов, Ω – петель), основанный на вычислении смешанных произведений векторов [3, 4]. С использованием разработанного метода построены карты хиральности вторичных структур белков, позволяющие однозначно идентифицировать качественно и количественно их хиральность.

Предложенный метод может быть полезен для определения хиральности различных элементов вторичной структуры белков и раскрытия закономерностей последовательностей этих элементов, что, в свою очередь, является важным звеном в понимании механизмов фолдинга.

1. Твердислов В.А. Хиральность как первичный переключатель иерархических уровней в молекулярно-биологических системах // Биофизика, 2013, т. 58, no. 1, с. 159-164.
2. Pavone V., Gaeta G., Lombardi A., Nastro F., Maglio O., Isernia C., Saviano M. Discovering protein secondary structures: Classification and description of isolated α -turns // Biopolymers, 1996, no. 38, pp. 705-721.
3. Сидорова А.Э., Луценко А.О., Шпигун Д.К., Малышко Е.В., Твердислов В.А. Методы определения знака хиральности спиральных и суперспиральных структур белков // Биофизика, 2021, т. 66, № 3, с. 421-428.
4. Sidorova A.E., Malysheva E.V., Lutsenko A.O., Shpigun D.K., Bagrova O.E. Protein helical structures: defining handedness and localization features // Symmetry, 2021, vol. 13, no. 5, p. 879.

ДВА КОНКУРИРУЮЩИХ МЕХАНИЗМА ПРИ АГРЕГАЦИИ МИКСАМЕБ *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*

Two Competing Mechanisms in Aggregation of Myxamoebae *Dictyostelium discoideum*

Кручинин И.В., Яковенко Л.В.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, г. Москва, РФ, iv.kruchinin@physics.msu.ru

Эволюция и морфогенез являются одними из важнейших проблем теоретической биологии и биофизики. На фундаментальном уровне определяющую роль для них играют процессы самоорганизации в сложных неравновесных системах, которые скоординированы с появлением или изменением в них подсистем различных иерархических уровней. В этих областях для исследований применяются разного рода биологические и математические модели. Для изучения процессов морфогенеза и возникновения многоклеточности в качестве модели с 1935 года широко используется клеточный слизевик *Dictyostelium discoideum* (DD). Жизненный цикл DD включает в себя три основные стадии: одиночные миксамебы, слизень и плодовое тело со спорами. Образование слизня из одиночных миксамеб происходит путем их управляемой агрегации. В настоящей работе описаны результаты, полученные в модели начальных стадий агрегации, развитой на основе модели, предложенной в [1].

Агрегация описывается клеточным автоматом, описывающим движение и агрегацию миксамеб в хемотактическом поле, основные компоненты которого представляют собой выделяемые клетками *DD* вещества: циклический аденозинмонофосфат (сАМР), фосфодиэстераза (PDE) и ингибитор фосфодиэстеразы (PDI). Для удобства клеточный автомат разделен на четыре одинаковых по планарной структуре уровня, каждый из которых является клеточным автоматом, причем все они взаимосвязаны. Первый автомат является трехмерным и моделирует движение клеток *DD* по поверхности и формирование трехмерных агрегатов. Остальные три автомата моделируют выделение и распространение сАМР, PDE и PDI, а также внутриклеточную сигнализацию, то есть фактически решают задачу реакции-диффузии для этих компонентов в соответствии с моделью, описанной в [2]. Перемещение миксамеб происходит по градиенту концентрации сАМР, в формировании которого участвуют PDE и PDI. Каждый клеточный автомат задан на решетке с кубическими ячейками с ребром 10 мкм и объемом 10^3 мкм³.

При движении миксамеб они могут сталкиваться и слипаться, образуя агрегаты разных размеров. В пределах одного кластера, сформировавшегося в процессе агрегации, только ближайшие соседи (в двумерном случае их 8, а в трехмерном – 26) могут влиять на центральную клетку, которая определяет направление перемещения кластера.

В дополнение к тому, что включено в модель [1], в настоящей модели в соответствии с экспериментальными данными учтено, что на направление движение клеток (и кластеров) влияет также концентрация ионов Ca^{2+} в цитозоле. Она, в свою очередь, зависит от внеклеточной концентрации сАМР, поэтому определяется состоянием клеточного автомата, моделирующего распределение концентрации сАМР. Правило принятия решения выглядит следующим образом: если концентрация ионов Ca^{2+} менее 40 нМ, то клетка с вероятностью 20% движется в первоначально выбранном направлении (в сторону максимального увеличения концентрации сАМР, то есть по градиенту концентрации); если концентрация $\text{Ca}^{2+} \geq 120$ нМ, то клетка с вероятностью 90 % движется в первоначально выбранном направлении (есть еще несколько промежуточных значений концентраций и вероятностей) [3].

Результаты расчета по этой модели показали, что в ходе агрегации наступает момент бифуркации (примерно по достижении агрегатом высоты в четыре клеточных слоя, которые формируются в клеточном автомате, описывающем движение и агрегацию клеток), когда агрегат перестает расти и колеблется около некоторого положения «равновесия», то разбираясь, то достраиваясь. Это может указывать на то, что при выбранных правилах решений клеточных автоматов реализуются два конкурирующих механизма, один из которых способствует агрегации, а другой – разбиению агрегата на более мелкие структуры. Для выяснения деталей этих механизмов необходимы дальнейшие исследования.

1. Кручинин И.В., Яковенко Л.В. Компьютерная модель начальных стадий агрегации миксамеб *Dictyostellium discoideum* // Ученые записки физ. ф-та Моск. ун-та, 2021, № 6, с. 2160701.
2. Martiel J.L., Goldbeter A. A model based on receptor desensitization for cyclic AMP signaling in *Dictyostelium* cells // *Biophys. J.*, 1987, vol. 52, no. 5, pp. 807-828.
3. Nebl T., Fisher P. R. Intracellular Ca^{2+} signals in *Dictyostelium* chemotaxis are mediated exclusively by Ca^{2+} influx // *Journal of Cell Science*, 1997, vol. 110, pp. 2845-2853.

СЕКЦИЯ 3. МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ДВУХ КАРДИОТОКСИНОВ КОБРЫ НА ПАПИЛЛЯРНУЮ МЫШЦУ И СЕРДЦЕ КРЫСЫ, ПЕРФУЗИРУЕМОЕ ПО ЛАНГЕНДОРФУ

A Comparative Study of the Effects of Two Cobra Cardiotoxins on the Papillary Muscle and Langendorff-Perfused Rat Heart

Аверин А.С.^{1,4}, Тюрин Ф.В.², Самодурова К.В.³, Старков В.Г.⁴, Андреева Т.В.⁴, Уткин Ю.Н.⁴

¹ Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино, РФ, averinas82@gmail.com

² Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого, г. Тула, РФ

³ Санкт-Петербургский государственный технологический институт, г. Санкт-Петербург, РФ

⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, РФ

Кардиотоксины яда кобр представляют собой группу трехпетельных токсинов, общим свойством которых является прямое взаимодействие с клеточной мембраной, ведущее к образованию ионной поры, деполяризации, кальциевой перегрузке и как следствие гибели клетки. Нами проведено исследование кардиотоксинов 1 (КТ-1) и 2 (КТ-2) яда кобры *Naja oxiana* и показано, что КТ-2 заметно превосходит по своей активности КТ-1 при воздействии на препараты папиллярной мышцы и кольца грудной аорты крысы [1], а также сердце крысы перфузируемое по Лангендорфу [2]. Оба токсина в концентрации 5 мкг/мл, вызывали краткосрочный рост сократимости $200 \pm 25\%$ и $171 \pm 15\%$ для КТ-1 и КТ-2 соответственно в точке максимума эффекта. При этом для КТ-1 и КТ-2 время достижения максимума сокращения увеличивалось с 104 ± 2 до 111 ± 2 и с 96 ± 2 до 104 ± 5 мс, время расслабления до 50% с 64 ± 4 до 70 ± 6 и с 64 ± 6 до 69 ± 7 мс; время расслабления до 95% с 163 ± 10 до 190 ± 22 и с 148 ± 16 до 155 ± 20 мс, соответственно. Также наблюдалось временное повышение пульсового внутрижелудочкового давления, которое не сопровождалось увеличением частоты сердечных сокращений. Далее рост сократимости сменялся угнетением и ростом диастолического напряжения с последующей контрактурой папиллярной мышцы и сердца соответственно. В ходе исследования роли отдельных звеньев электромеханического сопряжения в развитии патологического процесса в миокарде была установлена ведущая роль депо-зависимого входа Ca^{2+} , а также Ca^{2+} тока L- типа и обратной формы натрий-кальциевого обменного механизма. При этом блокирование выброса Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулула не препятствовало развитию контрактуры, однако предотвращало временный рост сократимости; эффект блокаторов на действие КТ-1 и КТ-2 был сходным. Следует отметить, что компоненты животных ядов могут приводить к положительному инотропному эффекту, однако механизмы, опосредующие данный эффект могут быть различными, включая взаимодействие с рецепторами и стимулирование выброса эндогенного норадреналина. Широко известно, что адренергическая стимуляция сердца ведет к росту силы сокращения и ускорению его временных параметров, однако при выраженном увеличении силы сокращения, в момент максимального эффекта кинетические параметры не менялись, либо напротив имели тенденцию к увеличению, также наблюдалось отсутствие положительного хронотропного эффекта в опытах на целом сердце. В дополнение к этому блокатор бета-адренорецепторов пропранолол в концентрации 10 мкМ не блокировал эффекты кардиотоксинов. Это свидетельствует о том, что рост сократимости скорее обусловлен изменением Ca^{2+} баланса в кардиомиоцитах под воздействием кардиотоксинов, нежели высвобождением эндогенного адреналина.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что в развитие контрактуры вовлечены такие механизмы как депо-зависимый вход Ca^{2+} , Ca^{2+} ток L- типа и обратная форма натрий-кальциевого обменного механизма.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 21-14-00316.

1. Averin A.S., Nenov M.N., Starkov V.G., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Effects of Cardiotoxins from *Naja oxiana* Cobra Venom on Rat Heart Muscle and Aorta: A Comparative Study of Toxin-Induced Contraction Mechanisms // *Toxins (Basel)*, 2022, vol. 14, doi: 10.3390/toxins14020088.

2. Averin A.S., Goltyaev M.V., Andreeva T.V., Starkov V.G., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. S- and P-type cobra venom cardiotoxins differ in their action on isolated rat heart // *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 2022, vol. 28, p. e20210110, doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2021-0110.

НЕЙРОБЛАСТОМА SH-SY5Y ДИФФЕРЕНЦИРОВАННАЯ РЕТИНОВОЙ КИСЛОТОЙ КАК ДОСТУПНАЯ КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КИСЛОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ ЧЕЛОВЕКА 1A (ASIC1A)

Neuroblastoma SH-SY5Y Differentiated by Retinoic Acid as an Accessible Cell Model for the Study of Human Acid-Sensitive Ion Channels 1a (ASIC1a)

Андреев Я.А., Калиновский А.П.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, РФ, aya@ibch.ru

Нейробластома человека SH-SY5Y является известным объектом для исследования нейрорепаративных процессов. Мы изучали функционирование кислоточувствительных (ASIC), TRPV1 и TRPA1 ионных каналов, присутствующие в нейробластоме SH-SY5Y, чтобы предложить новые подходы для их изучения в нейроноподобных клетках. Используя количественную ПЦР в реальном времени и методику patch-clamp, были охарактеризованы профили экспрессии ионных каналов, их функциональность и фармакологические ответы на известные лиганды. Низкий уровень экспрессии ASIC1a и ASIC2 был обнаружен в необработанных клетках. Обработка 10 мкМ ретиноевой кислоты (РК) в течение 6 дней приводила к дифференцировке нейронов, сопровождавшейся заметным увеличением экспрессии ASIC1a, в то время как экспрессия ASIC2 оставалась практически неизменной. В ответ на кислотные стимулы дифференцированные клетки демонстрировали заметные ASIC-подобные токи. Подробная кинетическая и фармакологическая характеристика позволяет предположить, что гомомерные ASIC1a являются доминирующей изоформой среди присутствующих ASIC-каналов. Обработка РА также снижала экспрессию TRPV1 и TRPA1, только в необработанных клетках были обнаружены незначительные электрофизиологические ответы на их агонисты. Нейробластома SH-SY5Y, обработанная РА, может служить модельной системой для изучения эффектов различных лигандов на канал ASIC1a человека в нейроноподобных клетках. Этот подход может улучшить качество характеристики биологически-активных веществ для разработки новых нейропротекторных и обезболивающих препаратов.

Работа поддержана грантом РФФИ №21-15-00322.

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМЕННОЙ ОБРАБОТКИ НА МОРФО-МЕХАНИЧЕСКИЕ И АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА МАГНИТОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИНТЕРФЕЙСОВ

Effect of Plasma Treatment on Morpho-Mechanical and Adhesive Properties of Magnetoelectric Biological Interfaces

Антипова В.Н., Соболев К.В., Корепанова Е.П., Воронцов С.А., Левада Е.В., Родионова В.В.

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград, РФ, valya.antipova24@gmail.com

Магнитоэлектрические полимерные композиты представляют собой группу материалов, состоящих из магнитного наполнителя и пьезополимерной матрицы, в которых магнитоэлектрическая связь связана с деформационными взаимодействиями между наполнителем и матрицей [1]. Биосовместимость полимерной основы, наряду с мультиферроидными свойствами нанокompозитов, делает их интересными для ряда биологических приложений. В частности, они могут быть использованы в качестве интерфейсов для культивирования стволовых клеток с возможностью дистанционного управления физическими параметрами клеточного микроокружения путем приложения внешнего магнитного поля для контроля активности клеток (адгезии, пролиферации, дифференциации и т.д.) [2,3].

Поливинилиденфторид (PVDF) — это фторсодержащий полукристаллический полимер, полученный из винилиденфторида, который имеет не менее пяти различных кристаллических фаз, из которых β -фаза обладает наибольшим пьезоэлектрическим откликом. Низкая поверхностная энергия PVDF и его сополимеров приводит к высокой гидрофобности и плохой смачиваемости поверхности полимера, что плохо сказывается на адгезии клеток к поверхности подложек на их основе и ограничивает их использование в биомедицинских приложениях [4]. Существует множество различных подходов к модификации поверхности PVDF, но обработка холодной плазмой является наиболее оптимальным методом, поскольку сохраняет основные физико-химические объемные свойства подложек, как для пористых, так и для непористых полимерных поверхностей [5].

Основной целью данной работы было исследование влияния плазменной обработки на морфо-механические свойства биологических интерфейсов. Нанокompозиты были изготовлены методом ракедельного ножа и затем обработаны холодной плазмой. В качестве основы для нанокompозитов использовался PVDF, модифицированный магнитным наполнителем (CoFe_2O_4). Структурные свойства полученных образцов были охарактеризованы с помощью рентгеновской порошковой дифракции. Морфо-механические свойства нанокompозитов исследовались до и после плазменной обработки путем измерения угла контакта образцов с

водой и с помощью атомно-силовой микроскопии. Нанокomпозиты были дополнительно протестированы на культуре мезенхимальных стволовых клеток человека.

В данном исследовании было продемонстрировано, что плазменная обработка с различными временными интервалами снижает механические свойства нанокomпозитов на основе PVDF (модуль Юнга, механическая жесткость), при этом наблюдается уменьшение угла смачивания этих субстратов (рис. 1) и улучшение их адгезивных свойств, что делает их перспективными для использования в различных биомедицинских приложениях, таких как инженерия костной ткани.

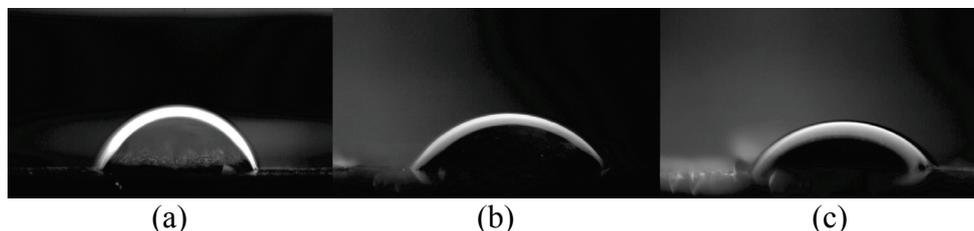


Рисунок 1. Угол контакта с водой и смачиваемость, (a) Большой угол смачивания: гидрофобная поверхность (необработанный образец PVDF+ CoFe₂O₄), (b, c) Малый угол смачивания: гидрофильная поверхность (образцы PVDF+ CoFe₂O₄, обработанные в течение 60 и 90 секунд соответственно)

Исследование выполнено при финансовой поддержке БФУ им. И. Канта в рамках научного проекта № 105-Г-22.

1. Martins P., Lanceros-Méndez S. Polymer-based Magnetoelectric Materials // *Adv. Funct. Mater.*, 2013, vol. 23, pp. 3371-3385.
2. Ribeiro C., Sencadas V., Correia D.M. et. al, Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2015, vol. 136, pp. 46-55.
3. Stanton A.E. et al., Extracellular matrix type modulates mechanotransduction of stem cells // *Acta Biomater*, 2019, vol. 96, pp. 310-320.
4. Tavakoli M. Surface modification of polymers to enhance biocompatibility // *Surfaces and Interfaces for Biomaterials*, 2005, pp. 719-744.
5. Correia D.M. et al. Surface wettability modification of poly(vinylidene fluoride) and copolymer films and membranes by plasma treatment // *Polymer*, 2019, vol. 169, pp. 138-147.

ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО С ОДНОЦЕПОЧНЫМИ СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ POLY(rA) И POLY(rU)

Binding Peculiarities of Methylene Blue with Single-Stranded Synthetic Polynucleotides Poly(rA) and Poly(rU)

Антонян А.П., Парсаданян М.А., Мовсесян З.О., Шиладжян А.А., Григорян К.Р., Вардеванян П.О.
Ереванский государственный университет, г. Ереван, Армения, apant@ysu.am

Полирибоадениловая кислота - poly(rA), имеет особое биологическое значение из-за ее роли в функционировании мРНК и экспрессии генов. Одноцепочечная poly(rA) играет важную роль в клеточной биологии, поскольку практически все мРНК в эукариотических клетках имеют хвост из poly(A) на 3'-м конце, который является важной детерминантой созревания и стабильности мРНК, инициации трансляции, а также продукции альтернативных форм белков.

Нами проведены исследования по взаимодействию связывания триазинового красителя, интеркалирующего лиганда метиленового синего (МС) с одноцепочечными (оц-) синтетическими полирибонуклеотидами poly(rA) и poly(rU) методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. Обнаружено, что интенсивность спектров поглощения и флуоресценции МС, при добавлении раствора poly(rA), при концентрационном соотношении $\Gamma = \text{лиганд}/\text{оц-полинуклеотид} = 1$, резко уменьшается, а при дальнейшем увеличении концентрации этого полинуклеотида изменения спектров поглощения и флуоресценции комплексов небольшие.

В случае же добавления раствора poly(rU) на раствор МС в соотношении 1:1 уменьшение спектров поглощения и флуоресценции небольшое. При добавлении poly(rA) и poly(rU) в эквимоллярных концентрациях, изменения спектров поглощения и флуоресценции МС схожи с таковыми, полученными для комплексов МС-poly(rA), однако, интенсивность этих спектров выше, по сравнению с таковой МС-poly(rA) комплексов. Аналогичный эффект наблюдается и в том случае, когда раствор комплексов МС-оц- poly(rU) титруется раствором комплементарного полинуклеотида (раствором poly(rA)) до соотношения 1:1. В случае же добавления раствора poly(rA) на раствор МС-оц- poly(rU) также наблюдается возрастание интенсивностей спектров поглощения и флуоресценции, при достижении соотношения концентраций обоих полинуклеотидов 1:1

Этот факт обусловлен тем, что имеет место гибридизация между poly(rA) и poly(rU), с образованием практически полностью двухцепочечной структуры. Этим можно объяснить увеличение интенсивностей спектров поглощения и флуоресценции комплексов МС с указанными полинуклеотидами. Мы полагаем, что этот эффект является результатом того, что на образовавшейся двухцепочечной (дц-) структуре полинуклеотида (poly(rA)-poly(rU)) центры адсорбции для молекул лиганда становятся ограниченными. Вследствие этого связанные молекулы лиганда переходят в свободное состояние, которое характеризуется другими оптическими или флуоресцентными свойствами [1].

1. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Sahakyan V.G. Peculiarities of interaction of synthetic polyribonucleotide poly(rA)-poly(rU) with some intercalators // J. of Biomol. Struct. & Dyn., 2017, vol. 36, doi: 10.1080/07391102.2017.1402708.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА БЫКА В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ДЛИННОВОЛНОВОГО УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ

Features of the Structural Properties of Bovine Serum Albumin under the Influence of Long-Wave UV Radiation

Артюхов В.Г., Барилюк А.Н., Колтаков И.А

Воронежский государственный университет, г. Воронеж, РФ, koltakov@bio.vsu.ru

Воздействие высокоэнергетических излучений на белки обычно связано не только с поглощением энергии света хромофорными группами, но и в результате воздействия активных кислородных метаболитов, генерируемых при поглощении этой энергии водой.

Фотолиз воды основан на прямом распаде молекулы воды под воздействием квантов поглощаемого света. Для прямого разрыва связи в молекуле воды достаточно 237,4 кДж/моль. Однако наибольшая эффективность фотолиза воды наблюдается в результате воздействия на нее квантов света с длиной волны менее 400 нм что соответствует примерно 293 кДж/моль.

Но если процесс фотолиза воды рассматривать не до высвобождения конечных продуктов в виде молекулярных кислорода и водорода, а до образования активных триплетных фотопродуктов и активных форм кислорода, то величина энергетического барьера снижается до 1,23 эВ.

Таким образом, под действием длинноволнового УФ-излучения могут запускаться каскады фотохимических реакций, высвобождающие активные формы кислорода, воздействующие на белки. Это делает особо интересным изучение влияния этого участка спектрального диапазона на физико-химические характеристики белков, для разделения прямого и косвенного действия УФ-излучения.

В качестве модели для изучения динамики, структуры и физико-химических свойств белков, нами был взят бычий сывороточный альбумин. Для понимания сущности процессов, происходящих в белке, непосредственно после облучения, отдельно были изучены характеристики мономерной и димерной фракции белка. Разделение осуществляли методом гель-хроматографии, после чего проводили измерение поверхностного дзета-потенциала и гидродинамического радиуса мономерной и димерной фракции белка

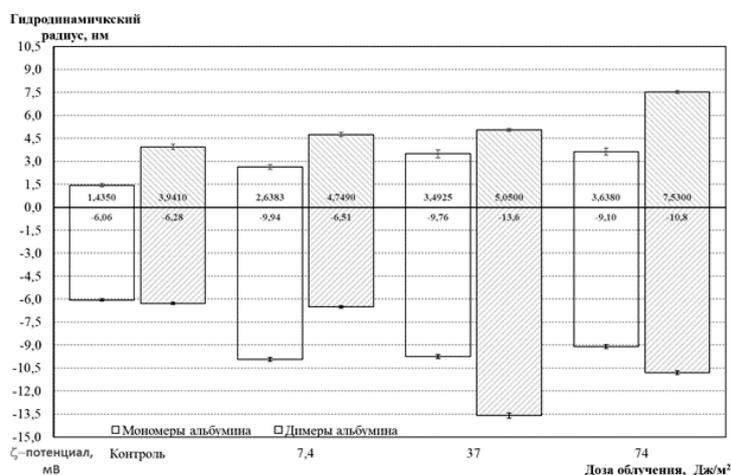


Рисунок 1. Влияние длинноволнового УФ-излучения на структуру молекулы сывороточного альбумина быка

Анализ гидродинамического радиуса белка при фотомодификации светом с длиной волны 365 нм показал, что облучение приводит к увеличению исследуемого параметра от 1,5 до 3,6 нм для мономерной формы белка и с 3,9 до 7,5 – для димерной. Анализ дзета потенциала показал увеличение абсолютной величины регистрируемого

параметра, что свидетельствует о существенных перестройках внутри молекул белка, вызванных воздействием активных кислородных метаболитов, генерируемых УФ-светом.

Таким образом, в ходе выполнения работы мы показали, что при анализе процессов фотохимических превращений следует учитывать роль косвенного воздействия высокоэнергетических излучений на конформационные изменения структуры молекулы сывороточного альбумина быка.

1. Поляничко А.М., Михайлов Н.В., Романов Н.М. Межмолекулярные взаимодействия сывороточного альбумина в растворе // Цитология, 2016, т. 58, № 9, с. 707-713.

2. Созарукова М.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Сывороточный альбумин как источник и мишень свободных радикалов в патологии // Вестник Российского государственного медицинского университета, 2016, № 1, с. 61-67.

РОЛЬ МОДУЛЯТОРОВ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОРЫ mPTP В МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ПАТОЛОГИЯХ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ The Role of mPTP Modulators in Mitochondrial Pathologies in Chronic Alcohol Intoxication

Бабурина Ю.Л., Одиноква И.В., Крестинин Р.Р., Сотникова Л.Д., Крестинина О.В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино, РФ, byul@rambler.ru

В настоящее время злоупотребление спиртными напитками остается актуальной проблемой как в России, так и во всем мире. Исследования показывают, что данная проблема обострилась в связи с пандемией COVID-19 и последовавшей самоизоляцией. По некоторым данным, в России с момента начала карантинных мер, употребление алкоголя увеличилось на 2-3%, в мире эти цифры еще более угрожающие.

При хроническом алкогольном потреблении в первую очередь происходят изменения в митохондриях [1,2]. Этанол-опосредованные изменения включают в себя нарушения митохондриальной морфологии (например, появляются увеличенные, деформированные митохондрии с меньшим количеством крист) [3] и увеличение производства активных форм кислорода (АФК). Исследования различных лабораторий показывают, что хроническое потребление этанола стимулирует формирование митохондриальной поры неспецифической проницаемости (permeability transition pore, mPTP) [3-5]. Тем не менее, механизмы этого процесса остаются до конца неизученными. Кроме того, несмотря на длительные и интенсивные исследования, состав и структура mPTP до сих пор не установлены. Поэтому поиск возможных регуляторов mPTP, а также мишеней для потенциального терапевтического воздействия на его компоненты при лечении различных патологий продолжается.

Для изучения влияния алкоголя на функции митохондрий и изменениях в экспрессии исследуемых белков в нашей работе были проведены модельные эксперименты на крысах. Мы применяли модель хронической алкогольной интоксикации Либера – ДеКарли, которая позволяет добиться потребления алкоголя в высоких дозах. Изменения в митохондриальных функциях определяли с помощью комплексного подхода с измерением разных параметров (скорость входа/выхода потоков Ca^{2+} , изменения мембранного потенциала, набухание митохондрий). Было показано, что хроническое потребление алкоголя приводит к повышению чувствительности митохондрий к индукции mPTP, и, следовательно, к увеличению проницаемости внутренней митохондриальной мембраны, а также к ее деполяризации, набуханию и повреждению внешней мембраны. Полученные данные позволяют нам предположить, что в патологических условиях хронического воздействия алкоголя в митохондриях могут происходить изменения в структуре mPTP, или в механизмах ее регуляции. Данные изменения могут быть компенсаторным ответом на возникающие при интоксикации повреждения. Мы обнаружили, что хроническое воздействие алкоголя изменяет уровень белков регуляторов mPTP (CNP, VDAC, TSPO), и эти изменения являются синхронными. Полученные данные позволяют нам предположить наличие в митохондриях печени в условиях хронического алкоголизма компенсаторной системы, формируемой белками регуляторами mPTP (CNP, VDAC, TSPO). Данный комплекс белков принимает участие в механизмах алкогольной толерантности и зависимости у крыс, и, соответственно, его компоненты способны стать потенциальными фармакологическими мишенями при лечении патологий, связанных с потреблением этанола.

1. Cunningham C.C., Coleman W.B., Spach P.I. The effects of chronic ethanol consumption on hepatic mitochondrial energy metabolism // Alcohol Alcohol, 1990, vol. 25, pp. 127-136, doi: 10.1093/oxfordjournals.alcalc.a044987.

2. Cunningham C.C., Spach P.I. The effect of chronic ethanol consumption on the lipids in liver mitochondria // Ann N Y Acad Sci, 1987, vol. 492, pp. 181-192, doi: 10.1111/j.1749-6632.1987.tb48667.x.

3. Das S., Hajnoczky N., Antony A.N., Csordas G., Gaspers L.D., Clemens D.L., Hoek J.B., Hajnoczky G. Mitochondrial morphology and dynamics in hepatocytes from normal and ethanol-fed rats // Pflugers Arch, 2012, vol. 464, pp. 101-109, doi: 10.1007/s00424-012-1100-4.

4. King A.L., Swain T.M., Mao Z., Udoh U.S., Oliva C.R., Betancourt A.M., Griguer C.E., Crowe D.R., Lesort M., Bailey S.M. Involvement of the mitochondrial permeability transition pore in chronic ethanol-mediated liver injury in mice // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, vol. 306, pp. G265-277, doi: 10.1152/ajpgi.00278.2013.

5. Pastorino J.G., Hoek J.B. Ethanol potentiates tumor necrosis factor- α cytotoxicity in hepatoma cells and primary rat hepatocytes by promoting induction of the mitochondrial permeability transition // *Hepatology*, 2000, vol. 31, pp. 1141-1152, doi: 10.1053/he.2000.7013.

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО КРАСНОГО СВЕТА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МИОФАСЦИАЛЬНОГО СИНДРОМА У КРЫС

Influence of Low-Intensity Red Light on The Functional State of Mitochondria in The Model of The Myofascial Syndrome in Rats

Баврина А.П.¹, Пчелин П.В.^{1,2}, Лапшин Р.Д.¹, Белоусова И.И.¹, Щелчкова Н.А.^{1,2}

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Нижний Новгород, РФ

² Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, РФ, annabavr@gmail.com

Миофасциальный болевой синдром (МБС) является ведущей причиной мышечно-скелетной боли в мире и характеризуется образованием триггерных точек. Вероятность развития патологии увеличивается с возрастом, что сопровождается более выраженным болевым синдромом. Изучение внутриклеточных механизмов и изменений, вовлеченных в этиологию заболевания, является необходимым для улучшения терапевтических подходов. Особенный интерес в этом плане представляет действие низкоинтенсивного красного света (НКС) на митохондрии за счет потенциальной фотоакцепции излучения комплексом IV ЭТЦ. Тем не менее, данный механизм терапевтического действия НКС остается малоизученным.

Цель исследования: изучить влияние низкоинтенсивного красного света на функциональное состояние дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц после моделирования миофасциального болевого синдрома у крыс.

Объектом исследования явились самцы крыс линии Wistar (возраст – 18 месяцев, n=30). Материалом исследования служила латеральная широкая мышца бедра. Животные были разделены на 3 группы: интактная, группа с моделированием МБС («Контроль») и группа с воздействием НКС на мышцу (Спектр ЛЦ-02, 650±30 нм) («Эксперимент»). Моделирование МБС у крыс приводило к формированию мышечных уплотнений – миофасциальных триггерных точек согласно методике Huang et al, 2013 [1]. Образование мышечных уплотнений достигалось сочетанием травматизации мышцы тупым предметом и эксцентрических упражнений на беговой дорожке еженедельно в течение 8 недель. После этого ежедневно, в течение 4-х дней воздействовали на область моделирования миофасциальных триггерных точек. Сеанс длился 3 минуты. Далее из мышечной ткани крыс получали фракцию митохондрий для одновременной оценки параметров динамики митохондриального мембранного потенциала (мтМП) и дыхательной активности методом респирометрии высокого разрешения (Oxugraph-2k, Oroboros Instruments, Австрия). Полученные данные нормализовали по содержанию белка (метод Бредфорда). Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0.

При моделировании МБС у животных наблюдается тенденция к снижению активности комплекса IV. Снижение интенсивности дыхания в процессе окислительного фосфорилирования при участии комплексов I и II сопровождается достоверным нарушением поляризации мембраны. На модели МБС НКС оказывает общее стимулирующее влияние на дыхание митохондрий. Стимуляция наблюдается в отношении базального дыхания (в 2,5 раза), активности комплекса IV (в 3,2 раза), и максимальной дыхательной емкости ЭТЦ (в 2 раза) (табл. 1). Наблюдается снижение показателя целостности внешней мембраны до уровня интактных животных, тогда как увеличение значения данного маркера свидетельствует о морфо-функциональных нарушениях мембраны (табл. 1). При анализе стимулирующего действия МБС на дыхание при окислительном фосфорилировании отмечено, что данное влияние осуществляется при изменении работы комплекса I, что сопровождается нормализацией процесса деполяризации мембраны.

Таблица 1. Значения функциональных показателей ЭТЦ митохондрий (среднее ± ОС)

| Группа | Дыхательная активность (пмоль O ₂ /с/мг) | | | Целостность внеш. мембраны (у.е.) |
|-------------|---|----------------------|------------------------|---|
| | Базальное дыхание | Комплекс IV | Емкость ЭТЦ | |
| Интактная | 326.0 ± 64.16 | 4107 ± 607 | 2796 ± 196 | 0.1276 ± 0.0235 |
| Контроль | 283.4 ± 24.50 | 2404 ± 181.2 | 2595 ± 203.3 | 0.1858 ± 0.021 |
| Эксперимент | 716.0 ± 116.5 *# | 7791 ± 1298 # | 5159 ± 198.4 *# | 0.0879 ± 0.0221 # |

* - p<0,05, статистически значимые различия с группой «Интактная»

- p<0,05, статистически значимые различия с группой «Контроль»

Проведен анализ влияния низкоинтенсивного красного света на митохондриальный аппарат скелетной мышцы после моделирования миофасциального болевого синдрома. Отмечено стимулирующее действие на дыхательную активность митохондрий, осуществляемое посредством изменения работы комплексов I и IV ЭТЦ. Нормализация показателей целостности мембраны и изменения мембранного потенциала митохондрий позволяют предположить восстановление морфо – функциональной активности миоцитов и снижение влияния последствий тканевой гипоксии при миофасциальном болевом синдроме.

Работа выполнена в рамках Государственного задания 121030100281-9 в ЕГИСУ НИОКТР.

1. Huang Q.M., Ye G., Zhao Z.Y., Lv J.J., Tang L. Myoelectrical activity and muscle morphology in a rat model of myofascial trigger points induced by blunt trauma to the vastus medialis // Acupunct Med, 2013, vol. 31, no. 1, pp. 65-73, doi: 10.1136/acupmed-2012-010129.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ОПУХОЛЯХ ПРИ ИХ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОМ ПЕРЕХОДЕ

Peculiarities of Hydrogen Peroxide Metabolism in Tumors due to their Epithelial-Mesenchymal Transition

Бакурова Е.М., Кондратюк Р.Б., Турсунова Ю.Д.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, г. Донецк, ДНР, 32023@mail.ru

Известно, что эпителиальные опухоли формируют индивидуальные агрессивные свойства, реализуя свою эпителиально-мезенхимальную трансформацию (ЭМТ) [1]. Ряд ее сигнальных путей, обеспечивающих устойчивость к апоптозу, инвазивность, ангиогенез, запускаются активными формами кислорода (АФК), в частности, пероксидом водорода (H_2O_2). Следовательно, изучение особенностей его генерации эпителиальными опухолями может быть полезно при разработке новых направлений в лечении опухолей. Существенный вклад в обмен пероксида водорода могут вносить, как ксантиноксидаза (КСО) и супероксиддисмутаза (СОД), формирующие H_2O_2 , так и обезвреживающая его глутатионпероксидаза (ГПО).

Спектрофотометрически исследованы особенности ферментативной активности в гомогенатах немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ) и аденокарцином желудка и кишечника (АКЖК) [2]. Контролем служили нетрансформированные ткани края резекции. Параллельно проводили сравнительное патоморфологическое исследование тканей опухолей, иммуногистохимически подтверждали наличие ЭМТ по изменению экспрессии эпителиальных маркеров и клеточно-клеточной адгезии, появлению мезенхимальных маркеров [1].

Как в тканях НМКРЛ, так и в АКЖК установлено повышение активности КСО по сравнению с нетрансформированными тканями, соответственно в 2,2 раза ($p = 0,01$) и в 1,9 раза ($p = 0,001$). Поскольку H_2O_2 – продукт её реакции, можем предположить эквивалентное повышение его уровней. В отличие от ксантиноксидазы, опухолевая активность ферментов антиоксидантной системы (АОС) или не отличалась достоверно от контроля (СОД), или снижалась (ГПО). Однако углубленный анализ абсолютных значений опухолевой активности ферментов АОС выявил метаболическую неоднородность. Опухоли одной локализации статистически распределялись в 2 кластера как при НМКРЛ, так и при АКЖК (табл. 1).

Таблица 1. Активность ферментов АОС в опухолях различной локализации, нмоль/мин·мг; (медиана, первый и третий квартили)

| Е | СОД | | ГПО | |
|-------------------|--|--|--|--|
| | 1-й кластер | 2-й кластер | 1-й кластер | 2-й кластер |
| НМКРЛ (n = 22) | 0,69 (0,55; 0,75) */ 0,80 (0,74; 0,98) | 1,38 (1,20; 1,46)/ 1,14 (1,01; 1,38) | 3,30 (2,11; 4,00) */ 5,12 (2,61; 5,91) | 2,16 (1,45; 4,22)/ 3,03(1,80; 4,00) |
| АКЖК (n = 22) | 1,00 (0,63; 1,13) */ 1,08 (0,75; 1,33) | 1,72 (1,33; 2,26) */ 1,41 (0,96; 1,57) | 1,88 (1,03; 2,23)/ 2,22 (1,40; 3,04) | 1,52 (1,11; 2,00)/ 2,23 (1,96; 2,99) |

*Примечание: /курсивом - данные по контролю; * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.*

Отметим, что во 2-х кластерах как при НМКРЛ, так и в АКЖК на фоне повышения активности СОД, активность ГПО, наоборот, была низкой и не только в опухоли, но и в смежных нетрансформированных тканях края резекции. Так, во 2-м кластере АКЖК на фоне максимальной активности СОД ($p = 0,009$), активность ГПО была минимальной ($U = 14,00$, $Z = - 3,05$, $p = 0,002$ по сравнению с 1-м кластером и кластерами НМКРЛ). Разнонаправленные изменения активности КСО, СОД и ГПО ведут к повышению уровня H_2O_2 . Эти ферментативные особенности были более выражены во 2-х кластерах НМКРЛ и АКЖК.

Отметим, что ЭМТ регистрировали преимущественно в опухолях, вошедших по результатам анализа во вторые кластеры (соответственно, в 89 % образцов опухолей НМКРЛ, 80 % АКЖК этих кластеров). Таким образом, выявлена метаболическая неоднородность эпителиальных опухолей одной локализации,

характеризующаяся повышением продукции H_2O_2 . Предполагаем, это могло способствовать активации сигнальных путей, реализующих программы ЭМТ.

1. Vasilenko I.V., Kondratyuk R.B., Grekov I.S., Yarkov A.M. Epithelial-mesenchymal transition in main types of gastric carcinoma // Clin. Exp. Morphology, 2021, vol. 10, no. 2, pp. 13-20, doi: 10.31088/CEM2021.10.2.13-20.

2. Бакурова Е.М. Особенности генерации 2-дезокса-D-рибозо-1-фосфата опухолью, связь с продукцией активных форм кислорода // Актуальные вопросы биологической физики и химии, 2018, т. 3, № 3, с. 584-587.

СОЗДАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ОЛИГОМЕРНОГО БЕЛКА: ПРОВЕРКА ВОЗМОЖНОСТИ СТАБИЛИЗАЦИИ КОЛЬЦЕВОГО ГЕПТАМЕРА SM-ПОДОБНЫМ БЕЛКОМ ИЗ *Sulfolobus acidocaldarius*

Engineering of a Functional Oligomeric Protein: Testing the Possibility of Stabilization of a Ring Heptamer with the Sm-Like Protein from *Sulfolobus Acidocaldarius*

Леконцева Н.В., Своглазова А.Е., Михайлина А.О., Марченков В.В., Балобанов В.А.

Институт белка РАН, г. Пущино, Московская область, РФ, balobanov@phys.protres.ru

Высокая стабильность вновь создаваемых белков – одна из важнейших целей белковой инженерии. В данной работе мы создаём и проверяем инструмент для стабилизации олигомерных белков. Присоединение олигомерного белка к основе, которая сближает и удерживает его субъединицы в правильной взаимной ориентации должно стабилизировать этот олигомер. Кольцевой гомогептамерный Sm-подобный белок из *Sulfolobus acidocaldarius* (SacSm) должен подойти в качестве основы. Мы проверим предположение, что выбранный нами белок будет стабилизировать присоединённый к нему апикальный домен белка шаперона GroEL (ADGroEL). Сам по себе этот домен, будучи отделённым от остальной молекулы, не образует олигомерное кольцо. В нашей конструкции гиперстабильный SacSm удерживает семь ADGroEL вместе и, как мы предполагаем, принуждает их к олигомеризации. После проведённого анализа структур этих белков мы спроектировали соединяющий их линкер. Этим линкером белки были объединены в единую полипептидную цепь. Спроектированный гибридный белок был получен и исследован различными физико-химическими методами. Исследования показали, что он обладает термостабильностью выше, чем исходный ADGroEL и даже выше чем полноразмерный GroEL. При этом полученный гибридный белок связывает ненативные белки, связываемые полноразмерным шапероном GroEL. Также он снижает агрегацию ряда белков при их нагревании, что подтверждает его шаперонную активность. Таким образом, выбранный нами путь инженерии позволил создать эффективный термостабильный шаперон. Полученный результат показывает эффективность создаваемого нами инструмента для стабилизации олигомерных белков. Этот инструмент может быть использован для ряда молекулярно-биологических задач, требующих стабилизации кольцевых олигомерных белков.

Работа поддержана грантом РФФ 22-24-00934.

ПОЛУЧЕНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕРАНОСТИЧЕСКИХ НАНОКОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ АНТИСТОКСОВЫХ НАНОФОСФОРОВ И РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Synthesis of Luminescent Theranostic Nanocomplexes Based on Upconversion Nanoparticles and Recombinant Proteins

Баушева Д.К.¹, Гурьев Е.Л.¹, Шилигина Н.Ю.¹, Воденеев В.А.¹, Деев С.М.^{2,3}, Звягин А.В.^{1,3,4}

¹ Университет Лобачевского, г. Нижний Новгород, РФ, bausheva16@mail.ru

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, РФ

³ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, г. Москва, РФ

⁴ Университет Маккуори, г. Сидней, Австралия

На сегодняшний день разработка новых методов и подходов для диагностики рака – одна из наиболее актуальных областей биомедицины. Активно развивающимся направлением является тераностика – концепция, которая включает в себя создание мультифункциональных агентов, обладающих одновременно диагностическими и терапевтическими свойствами. Для этих целей перспективными представляются люминесцентные наночастицы, такие как антистоксовы нанофосфоры (НАФ). НАФ – неорганические фотолюминесцентные наночастицы, способные к ап-конверсии света, то есть к преобразованию нескольких фотонов с более низкой энергией в один фотон с более высокой энергией. Люминесцентные наночастицы не

только играют роль платформы для сборки комплекса, но и являются диагностическим модулем, обеспечивая эффективную прижизненную визуализацию клеток и тканей методами оптического имиджинга.

Целью данной работы было создание и исследование эффективности адресной доставки наноконплексов на основе НАФ и белковых модулей. Основой комплексов служили НАФ структуры ядро/оболочка состава $\text{NaY}_{0,794}\text{Yb}_{0,2}\text{Tm}_{0,006}\text{F}_4/\text{NaYF}_4$. Такие НАФ обладают рядом преимуществ перед другими визуализирующими агентами: продолжительной фотолюминесценцией со сдвигом в коротковолновую область и возбуждаемой инфракрасным излучением, попадающим в «окно прозрачности» биоткани, устойчивостью к фото- и химической деградации, низкой токсичностью.

Были получены и исследованы два типа наноконплексов. В первом случае поверхность НАФ покрывали оболочкой из амфифильного чередующегося сополимера малеинового ангидрида с 1-октадеценем, который позволяет добиться их коллоидной устойчивости и присоединять к ним дополнительные внешние модули. В качестве второго слоя оболочки было выбрано покрытие полиэтиленгликолем, способным увеличить их коллоидную стабильность и время циркуляции в кровеносном русле. Для получения тераностических комплексов к частицам присоединяли адресный белковый токсин DARPIn-LoPE. Он обладает специфичной токсичностью в отношении опухолевых клеток, гиперэкспрессирующих рецептор HER2. В роли токсического модуля используется фрагмент псевдомонадного экзотоксина LoPE, обладающего сниженной иммуногенностью.

Исследование специфичности присоединения полученных наноконплексов к поверхности опухолевых клеток линии SKOVip-kat (карцинома яичника человека), гиперэкспрессирующих рецептор HER2, показало специфичное связывание НАФ-DARPIn-LoPE с поверхностью HER2 положительных клеток SKOVip-kat.

Наноконплексы второго типа были получены на основе НАФ, модифицированных неорганическим соединением тетрафторборатом нитрозония (NOBF_4) методом обмена лигандов и направленно сформированной белковой короной из бычьего сывороточного альбумина (БСА). Модификация поверхности НАФ при помощи NOBF_4 делает их гидрофильными и биосовместимыми. В свою очередь БСА биосовместим, нетоксичен, неиммуногенен и способен ингибировать нежелательную адсорбцию белков внутренней среды организма, благодаря чему может быть использован для формирования внешней оболочки наноконплексов. При помощи лиофилизации и последующего ресуспендирования были получены коллоидно устойчивые наноконплексы НАФ- NOBF_4 -БСА. В настоящее время проводится исследование специфичности связывания наноконплексов НАФ- NOBF_4 -БСА с присоединенным нацеливающим модулем – таргетным токсином DARPIn-LoPE, с целевыми опухолевыми клетками.

Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства "Приоритет 2030" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации".

ФОТОХРОМНЫЕ ЛИГАНДЫ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ И КВАНТОВЫХ ТОЧЕК

Photochromic Ligands for Modification of Metal Cations and Quantum Dots

Беликов Н.Е.¹, Демина О.В.¹, Левина И.И.¹, Лукин А.Ю.², Сафинова А.Я.², Петровская Л.Е.³, Варфоломеев С.Д.¹, Ходонов А.А.¹

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва, РФ, khodonov@gmail.com

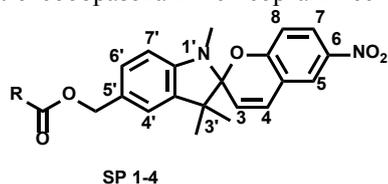
² МИРЕА – Российский технологический университет, г. Москва, РФ,

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, РФ

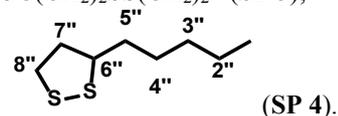
Изучение молекулярных механизмов преобразования световой энергии и связанных с этим фотохимических процессов и реакций в различных системах на молекулярном или субмолекулярном уровнях является одним из перспективных направлений нанопотоники.

В современной фотохимии и фотонике органических соединений особое место занимают исследования явления фотохромизма, в связи с возможными инновационными его применениями при создании различного рода фотоуправляемых систем и материалов.

Цель настоящей работы состояла: 1) в дизайне целевых структур молекул на основе фотохрома семейства спиропиранов, содержащих по 5'-положению молекулы фрагменты разной длины и полярности с терминальной меркаптогруппой, которая проявляет ионофорные или хелатофорные свойства по отношению к целому ряду неорганических мишеней: катионов металлов и/или квантовых точек, 2) в разработке способов получения новых гибридных фотохромных меток общей формулой SP 1 – SP 4, 3) в изучении их фотохромного поведения и процесса комплексообразования с неорганическими компонентами.



где R =
 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-$; где n = 1 (SP 1), n = 2 (SP 2),
 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{SS}(\text{CH}_2)_2-$ (SP 3);



В данной работе в качестве терминальных реакционноспособных групп нами были предложены монодентантные серу-содержащие лиганды – остатки тиогликолевой и 3-меркаптопропионовой кислот и бидентантный серу-содержащий фрагмент 5-(1,2-дителилан-3-ил)пентаноата, которые вводили в положение C5'-индолиновой части молекулы фотохрома через образование сложно-эфирной связи с гидроксильной функцией спиропиранового спирта – 5'-гидроксиметил-6-нитро-1',3',3'-триметилспиро[2H-1-бензопиран-2,2'-индолина]. Выбор указанного набора серу-содержащих лигандов был необходим для последующей модификации неорганических мишеней с целью получения на их основе гибридных фотоактивных систем, представляющих собой комплексы фотохрома с катионами металлов или наносистемы на основе конъюгатов квантовых точек с фотохромными лигандами.

Ацилирование исходного спирта проводили с помощью классической стратегии – активацией карбоксильной функции серу содержащего лиганда под действием ангидридов, активированных эфиров или конденсирующих агентов (DCCD) в присутствии катализатора 4-диметиламинопиридина.

Результаты спектрально-кинетических исследований показали, что полученные гибридные конструкции “QD CdSe / спиропиран” позволяют обратимо управлять флуоресценцией нанокристаллов CdSe посредством обратимой модуляции абсорбционных свойств фотохромного лиганда. Также было показано, что данный процесс может быть реализован в управляемом циклическом режиме с достаточно большим количеством повторений цикла – индукция - гашение флуоресценции образца.

Получен патент РФ на способ их получения и применения в качестве фотоуправляемых комплексообразователей [1].

Результаты представляют значительный интерес для разработки семейства новых фотохромных меток, способных к фотоуправляемому взаимодействию с неорганическими компонентами, с заданным набором фотохимических свойств и оптических параметров для нужд нанопотоники и сенсорики.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-03-00139.

1. Ходонов А.А., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Левин П.П., Варфоломеев С.Д., Демина О.В. Фотохромные производные 5'-гидроксиметил-6-нитро-1',3',3'-триметилспиро[2H-1-бензопиран-2,2'-индолина]. Патент РФ № 2694904, опубликовано: 18.07.2019, Бюл. из. № 20.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ ВИБРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГОЛОСОВЫХ СВЯЗОК

Methodology for Studying the Vibrational Activity of the Vocal Folds

**Беловолова Л.В.¹, Беловолов М.И.¹, Парамонов В.М.¹, Беловолов М.М.¹, Свистушкин М.В.²,
Луничева А.А.**

¹ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Научный центр волоконной оптики РАН им. Е.М.Дианова, г. Москва, РФ, *est123321@mail.ru*

² Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, г. Москва, РФ

С целью создания аппаратуры для диагностики состояния и лечения голосовых связок (ГС) человека выполнен комплекс исследований образцов ГС животных (кроликов). Разработана высокочувствительная бесконтактная лазерно-оптическая аппаратура и методика регистрации вибраций ГС в щадящих условиях испытаний – потоке воздуха без большого напора. Общим недостатком уже существующих экспериментальных методов является требование сильного возбуждения колебаний ГС и производимого ими звука, приводящее к искажению собственных частот ГС, что часто является недопустимым в условиях лечения.

Экспериментальный стенд представляет собой высокочувствительный виброметр с лазерным волоконно-оптическим зондом на конце одномодового волокна с керамическим наконечником с плоским торцом. Ее чувствительным элементом является низкодобротный интерферометр Фабри-Перо, образуемый плоским торцом волоконного наконечника с 4% Френелевским отражением и первой границей вибрирующей поверхности ГС, покрытой слизью. Оптоэлектронный блок установки содержит малошумящий стабилизированный одночастотный полупроводниковый лазер непрерывного режима работы на длине волны 1550 нм с внешним резонатором на волоконной Брэгговской решетке типа BDL-1550-14DL-20 с шириной спектральной линии генерации $\Delta\nu \leq 0,1$ МГц. Длина когерентности излучения лазера составляет сотни метров и степень когерентности излучения для длин резонатора $\sim 1-2$ мм с высокой точностью равняется единице ($\gamma = 1$). В качестве детектора отраженного сигнала с наконечника волоконно-оптического зонда использовали малошумящий фотоприемник с регулируемым усилением типа PDA30B2 с рабочим диапазоном длин волн 800–1800 нм и рабочей полосой частот до 590 кГц. Для регистрации и обработки звукового сигнала из трахеи использовали малогабаритный электрический конденсаторный микрофон. Оптический сигнал от вибраций ГС и звук обрабатывали двухканальной звуковой картой с АЦП для записи сигналов в персональный компьютер со специальным программным обеспечением и функцией быстрого преобразования Фурье для индикации мгновенных амплитудно-частотных характеристик. Диапазон регистрируемых частот вибраций составляет ~ 50 Гц – 20 кГц.

Экспериментальная установка позволяет исследовать собственные частоты вибраций ГС независимо от силы производимого ими звука и при явном отсутствии звука в выдыхаемом воздухе.

Исследовали свежееизвлеченные гортани с ГС кроликов, часть из которых не подвергалась предварительному хирургическому вмешательству, а часть содержала на себе заметные рубцы. Голосовые связки исследовали парами – леченые и здоровые.

Для сравнения собственных частот вибраций от здоровых и дефектных ГС была произведена запись сигналов вибрационной активности от голосовой связки с нитевидным рубцом в режиме истекающего воздуха из резервуара под небольшим давлением ~ 10 мм.рт.ст., имитирующим выдох животного в спокойном состоянии. Обнаружено, что при давлении воздуха 50–60 мм.рт.ст. ГС генерируют, как правило, белый вибрационный шум в интервале частот от 100 Гц до 10 кГц. При уменьшении давления воздуха до 10–20 мм.рт.ст. спектр вибрационных частот сужается и при этом обычно обнаруживаются три пика низших частот собственных механических вибраций ГС около 360, 730 и 1100 Гц и одновременно узкие пики в области около 3, 6 и 8 кГц. Обнаруженная закономерность возбуждения трех низших собственных частот вибраций ГС при истечении слабого воздушного потока из гортани кролика находит объяснение при построении физической модели ГС как колеблющейся струны с закрепленными концами.

Уверенно регистрируются собственные характеристические частоты вибрации ГС с малыми амплитудами колебаний, как правило меньше ~ 1 мкм, в щадящем режиме их возбуждения при пропускании воздуха, имитирующего выдох из легкого при небольшом давлении ~ 1 –5 мм.рт.ст. Обнаружено различие возбуждаемых вибраций на низких частотах у здоровых ГС и ГС, имеющих дефект в виде рубца на одной связке. Частоты низших собственных вибраций у дефектной ГС несколько выше по сравнению со здоровой ГС, что объясняется ростом ее жесткости при образовании рубцовой ткани. Вибрации с большой амплитудой требуют от ГС иметь более высокую гибкость и большой диапазон физических изгибов. В целом получается узнаваемое на слух звучание, напоминающее крик кролика. Работа голосовых связок при высоких давлениях воздуха, продуваемого через гортань, указывает на сохранение гибкости и эластичности голосовых связок даже после оперативного воздействия.

Диагностика состояния ГС в паре с другой (здоровой) голосовой связкой по регистрируемым резонансным частотам низшего порядка представляется достаточно информативной и полезной для того, чтобы отличить здоровую ГС от больной и определить при лечении степень восстановления ее вибрационных свойств.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ИК СПЕКТРОВ СЛЮНЫ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Characteristics of Salivary IR Spectra of Patients with Prostate Pathologies

Бельская Л.В., Сарф Е.А.

Омский государственный педагогический университет, г. Омск, РФ, *belskaya@omgpu.ru*

Целью данной работы являлось изучение липидного профиля слюны методом ИК спектроскопии при патологиях предстательной железы.

В исследовании приняли участие добровольцы, которые были разделены на подгруппы: рак предстательной железы (ацинарная аденокарцинома, $n=21$), простатическая интраэпителиальная неоплазия (PIN I-II, $n=21$) и контрольная ($n=21$). Группы были сопоставимы по возрасту. В качестве материала для биохимических исследований использовали слюну. Определение липидов проведено методом Фолча в модификации авторов, в которой после экстракции липидов смесью хлороформ/этанол проводят определение липидов методом ИК спектроскопии [1]. Статистический анализ полученных данных выполнен при помощи программы Statistica 10.0 (StatSoft) непараметрическим методом с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Установлено, что и для злокачественных, и для незлокачественных патологий предстательной железы интенсивность полос поглощения липидов в слюне уменьшается, при этом соотношение $2923/2957$ см^{-1} значимо растет, тогда как $1458/1396$ см^{-1} значимо уменьшается (табл. 1). Сравнение липидного профиля при раке предстательной железы и PIN I-II показало, что характеристики полос поглощения 1396 и 1458 см^{-1} меняются разнонаправленно (табл.1), интенсивность ПП 1396 см^{-1} уменьшается, а 1458 см^{-1} растет при раке предстательной железы по сравнению с PIN I-II. Сравнение липидного профиля при разном индексе Глиссона показало, что при меньшем значении изменения более выражены, что можно использовать для своевременной диагностики патологий предстательной железы (табл.2).

Таблица 1. Интенсивность ПП на ИК спектрах слюны исследуемых групп

| ПП, см^{-1} | Контроль, $n=21$ | Рак предстательной железы, $n=21$ | PINI-II, $n=21$ | Критерий Краскела-Уоллиса; p-value |
|----------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------------------------|
| 1396 | 1,30 [1,05; 2,46] | 0,99 [0,90; 2,17] | 1,05 [0,80; 1,18] | 4,071; 0,1306 |
| 1458 | 3,42 [3,04; 5,01] | 2,40 [1,07; 5,04] | 2,22 [1,28; 2,66] | 9,745; 0,0077* |

| ПП, см ⁻¹ | Контроль, n=21 | Рак предстательной железы, n=21 | PINI-II, n=21 | Критерий Краскела-Уоллиса; p-value |
|----------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| 2853 | 8,29 [6,08; 8,74] | 6,44 [5,08; 8,68] | 7,15 [5,80; 8,99] | 1,535; 0,4641 |
| 2923 | 12,64 [9,64; 13,64] | 10,44 [9,46; 13,99] | 11,66 [9,47; 14,28] | 0,5786; 0,7488 |
| 2957 | 1,91 [1,59; 2,28] | 1,52 [1,11; 1,84] | 1,68 [1,28; 1,95] | 3,443; 0,1788 |
| 2923/2957 | 6,34 [5,27; 7,76] | 7,88 [6,09; 10,43] | 7,67 [4,15; 9,87] | 1,529; 0,4657 |
| 1458/1396 | 2,28 [1,95; 3,07] | 1,77 [1,08; 2,21] | 1,84 [1,36; 3,09] | 6,853; 0,0325* |

Примечание. * - различия между группами статистически достоверны, p<0,05.

Таблица 2. Интенсивность ПП на ИК спектрах слюны при раке предстательной железы в зависимости от индекса Глиссона

| ПП, см ⁻¹ | Индекс Глиссона 2-6, n=9 | Индекс Глиссона 7-10, n=12 | p-value |
|----------------------|--------------------------|----------------------------|---------|
| 1396 | 0,99 [0,84; 1,23] | 1,19 [0,92; 2,38] | 0,1865 |
| 1458 | 1,79 [1,04; 4,11] | 2,79 [1,45; 5,04] | 0,0352* |
| 2853 | 6,44 [6,06; 8,3] | 6,92 [4,21; 9,23] | 0,2997 |
| 2923 | 10,44 [10,31; 12,7] | 11,21 [8,60; 14,60] | 0,4942 |
| 2957 | 1,51 [1,00; 1,78] | 1,69 [1,20; 1,95] | 0,2626 |
| 2923/2957 | 10,25 [7,86; 10,44] | 7,04 [5,68; 8,66] | 0,0488* |
| 1458/1396 | 1,77 [1,15; 2,29] | 1,82 [1,09; 2,59] | 0,7061 |

Примечание. P-value рассчитаны с использованием парного критерия Манна-Уитни.

Таким образом, потенциальной диагностической значимостью обладают соотношения 1458/1396 см⁻¹, которое уменьшается по сравнению со здоровым контролем, а также соотношение 2923/2957 см⁻¹, которое на фоне патологий простаты растет. Отмечено, что во всех случаях изменения предложенных соотношений более выражены на ранних стадиях заболеваний, что повышает актуальность их исследования в биомедицинском приложении.

1. Bel'skaya L.V., Sarf Ye.A., Solomatin D.V. Determination of the quantitative content of lipids in biological material by IR spectroscopy // *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 204-209.

РОЛЬ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАЩЕНИЙ ГЛАДКИХ МЫШЦ ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

The Role of Cyclic Nucleotides in the Regulation of Airway Smooth Muscle Contractions in Metabolic Syndrome

Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Вольхина М.О., Щербакова М.М.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, РФ, birulina20@yandex.ru

Одним из факторов, способствующих развитию бронхолегочной патологии, является метаболический синдром (МС) [1, 2]. Существуют сведения, что висцеральное ожирение, гиперинсулинемия, гипергликемия и дислипидемия способствуют развитию гиперреактивности бронхов [3]. Механизмы, лежащие в основе таких нарушений, неотъемлемо связаны с расстройством регуляторных механизмов сократительной активности гладкомышечных клеток стенки воздухоносных путей [4].

Механографическим методом исследовали сократительную активность изолированных сегментов деэпителизированных воздухоносных путей крыс Wistar контрольной (15 животных) и экспериментальной (18 животных) групп. Крысы контрольной группы получали стандартный корм (соотношение белки:жиры:углеводы 24%:6%:44%) со свободным доступом к пище и воде. Крысы экспериментальной группы в течение 12 недель находились на высокожировой и высокоуглеводной диете (соотношение белки:жиры:углеводы 16%:21%:54%) и 20% растворе фруктозы для питья. Предсокращающим агентом служил холиномиметик карбахолин (1 мкМ), сократительные ответы на который принимали за контрольные (100%). Тестировали действие сальбутамола (0,1–100 мкМ), форсколина (0,1–10 мкМ).

Установлено, что в ответ на действие неселективного агониста холинорецепторов карбахолина (0,1–100 мкМ) происходило дозозависимое сокращение сегментов бронхов крыс контрольной и экспериментальной групп. При этом амплитуда сократительных ответов сегментов воздухоносных путей у животных опытной группы была выше, чем в контрольной группе в диапазоне концентраций 1–100 мкМ (n=7, p<0,05). Вероятно, деэпителизация приводит к уменьшению действия дилатационных факторов, выделяемых при активации холинорецепторов. Также показано, что при ожирении, вызванном высокожировой

диетой, карбахолин усиливает сокращение гладких мышц воздухоносных путей за счет мобилизации кальция из цитозольных запасов, что, в свою очередь, стимулирует фосфорилирование легких цепей миозина [3]. Активация β_2 -адренорецепторов салбутамолом на фоне действия карбахолина (1 мкМ) вызывала дозозависимое расслабление гладкомышечных сегментов воздухоносных путей крыс контрольной и опытной групп. Дилатационные реакции дезепителизированных сегментов крыс экспериментальной группы значительно снижались по сравнению с контрольной группой в диапазоне концентраций 1–100 мкМ ($n=6$, $p<0,05$). Одним из механизмов снижения релаксирующего эффекта на действие бронходилататора является десенсибилизация β_2 -адренорецепторов, возникающая при ожирении, вследствие повышенной экспрессии фосфодиэстеразы 4 типа, разрушающей цАМФ [4]. Вероятно, что активация холинергических механизмов нивелирует цАМФ-зависимую релаксацию гладких мышц. На фоне действия активатора аденилатциклазы форсколина происходило дозозависимое расслабление дезепителизированных сегментов воздухоносных путей крыс контрольной и опытной групп ($n=6$, $p<0,05$), более выраженное в группе крыс с МС.

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что у животных с МС, индуцированным высокожировой и высокоуглеводной диетой, в стенке воздухоносных путей развиваются функциональные изменения, связанные, в том числе, с нарушением цАМФ-зависимой внутриклеточной регуляции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (МК-3302.2022.1.4) и Российского научного фонда (грант № 22-25-20039) и Томской области.

1. Mafort T.T., Rufino R., Costa C.H., Lopes A.J. Obesity: systemic and pulmonary complications, biochemical abnormalities, and impairment of lung function // *Multidiscip. Respir. Med.*, 2016, vol. 11, p. 28, doi: 10.1186/s40248-016-0066-z.

2. Proskocil B.J., Calco G.N., Nie Z. Insulin acutely increases agonist-induced airway smooth muscle contraction in humans and rats // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2021, vol. 320, no. 4, pp. L545-L556, doi: 10.1152/ajplung.00232.2020.

3. Nie Z., Jacoby D.B., Fryer A.D. Hyperinsulinemia potentiates airway responsiveness to parasympathetic nerve stimulation in obese rats // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2014, vol. 51, pp. 251-261, doi: 10.1165/rcmb.2013-0452OC.

4. Pradeepan S., Garrison G., Dixon A.E. Obesity in asthma: approaches to treatment // *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2013, vol. 13, no. 5, pp. 434-442, doi: 10.1007/s11882-013-0354-z.

ОБРАЗОВАНИЕ ПОР В МЕМБРАНАХ ЛИПОСОМ, ИНДУЦИРОВАННОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ ФОСФАТИДНОЙ КИСЛОТЫ И ЦИТОХРОМА С В ПРИСУТСТВИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

Formation of Pores in Liposome Membranes Induced by the Interaction of Phosphatidic Acid and Cytochrome c in the Presence of Hydrogen Peroxide

Благова А.В., Степанов Г.О., Осипов А.Н.

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава
России, г. Москва, РФ, annablagova2000@mail.ru

Ключевым звеном в патогенезе многих заболеваний является нарушение апоптоза. При исследовании молекулярных механизмов апоптотических процессов выделяют, в частности, митохондриальный механизм, который характеризуется увлечением пероксидазной активности цитохрома с. Однако данному событию предшествует взаимодействие цитохрома с с анионными фосфолипидами митохондриальных мембран [1]. Было хорошо изучено, что в липосомах, содержащих кардиолипин, при взаимодействии с цитохромом образуются поры [2], однако воздействие цитохрома на другие анионные фосфолипиды ранее не было известно.

Целью данной работы было исследование образования пор в липосомах, содержащих примесь фосфатидной кислоты в присутствии цитохрома С и перекиси водорода.

Исследование было проведено на флуориметре в режиме временной записи при фиксированных значениях длины волны возбуждения (560 нм) и испускания (590 нм) и щелях 5 нм.

Было изготовлено три типа липосом: содержащих только фосфатидилхолин, содержащих фосфатидилхолин с 20% примесью фосфатидной кислоты и содержащих фосфатидилхолин с 20% примесью кардиолипина. Внутри липосом содержался краситель сульфородамин В в высокой концентрации. При данной концентрации и эффекте самотушения начальная интенсивность флуоресценции была невелика. Однако при взаимодействии с цитохромом С в мембранах, содержащих примесь фосфатидной кислоты, образовывались поры, и, в результате уменьшения концентрации красителя, интенсивность флуоресценции возрастала.

Для образцов, содержащих липосомы с примесью фосфатидной кислоты, цитохром С и перекись водорода, изменение интенсивности флуоресценции составило 250% относительно начального значения. Аналогичные образцы, содержащие вместо фосфатидной кислоты кардиолипин, показали повышение интенсивности на 220%, при чем статистически образцы с примесью кардиолипина и фосфатидной кислоты не различались, что говорит о том, что данные два фосфолипида одинаково выражено способствуют образованию пор в мембранах. Для образцов, которые из фосфолипидов содержали только фосфатидилхолин, это отношение составило 43%.

Таким образом, показано, что цитохром С при взаимодействии как с фосфатидной кислотой, так и с кардиолипином, в присутствии перекиси водорода приводит к образованию пор в мембранах липосом. Образование пор в мембране необходимо для осуществления апоптоза. То есть взаимодействие фосфатидной кислоты с цитохромом С может запускать апоптотические процессы, что ранее не было изучено.

1. Hayden M.R. An Immediate and Long-Term Complication of COVID-19 May Be Type 2 Diabetes Mellitus: The Central Role of β -Cell Dysfunction, Apoptosis and Exploration of Possible Mechanisms // *Cells*, 2020, vol. 9(11), no. 2475147, pp. 231-241.

2. Firsov A.M., Kotova E.A., Korepanova E.A., Osipov A.N., Antonenko Y.N. Peroxidative permeabilization of liposomes induced by cytochrome c/cardiolipin complex // *Biochim Biophys Acta*, 2015, vol. 1848, no. 3, pp. 767-774.

НАНОСЕКУНДНЫЕ МИКРОВОЛНОВЫЕ ИМПУЛЬСЫ ВЛИЯЮТ НА СКОРОСТЬ ПРОЛИФЕРАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Nanosecond Microwave Pulses Affect the Rate of Stem Cell Proliferation

Большаков М.А.^{1,3}, Самойлова А.В.^{1,2,3}, Гостюхина А.А.^{1,2,3}, Дорошенко О.С.^{2,3}, Кутенков О.П.¹,
Зайцев К.В.², Ростов В.В.¹

¹ Институт сильноточной электроники СО РАН, РФ

² Томский НИИКиФ ФФГБУ ФНКЦ МРиК ФМБА России, РФ

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, РФ

⁴ Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, РФ,
antariks-tomsk2015@yandex.ru

В настоящее время большое внимание уделяется исследованиям, ориентированным на оценку пролиферативного потенциала и регенеративных возможностей стволовых клеток (СК). Во многом это обусловлено актуальностью/потребностью их применения в интересах практической медицины. Для регулирования пролиферации клеток используются импортные специализированные питательные среды, которые, не смотря на их эффективность, являются достаточно дорогостоящими и требуют продолжительного применения для достижения необходимого количества стволовых клеток. Принципиальной возможностью стимуляции пролиферации стволовых клеток является применение различных физических факторов. Потенциально эффективным для активации пролиферации СК может быть использование наносекундных микроволновых импульсов. Цель настоящей работы заключалась в экспериментальной проверке такой возможности.

Исследование выполнено на 17 культурах костномозговых клеток, выделенных из бедренной кости лабораторных крыс «Wistar» общепринятым стандартным методом [1]. Все процедуры с животными выполнялись в соответствии с международными правилами и нормами биоэтики [2].

Для проведения экспериментов были получены культуры мононуклеарных клеток костного мозга крыс, образующих монослой на 12–14 сутки. Жизнеспособность клеток костного мозга после культивирования составила $91 \pm 2\%$. Каждая полученная до начала эксперимента культура содержала в себе $5-8 (\times 10^6)$ СК. Просмотр и подсчет клеток проводился на микроскопе Optika XDS-2SFL (Италия) при 20-кратном увеличении. Далее культуры разделялись на а) контрольные группы, которые не подвергались никаким воздействиям и располагались в CO_2 инкубаторе и б) облученные, которые подвергались однократному воздействию 4000 наносекундных импульсов (длительность 100 нс) импульсно-периодического микроволнового излучения (ИПМИ, 10 ГГц), с пиковой плотностью потока мощности (пППМ) 140 и 1500 Вт/см², с частотами повторения импульсов 8 или 13 Гц. В качестве источника ИПМИ использовался лабораторный импульсный генератор на основе магнетрона МИ-505 (изделие серийного производства ОАО «Тантал», Россия). Воздействие на стволовые клетки (СК) в культуральных флаконах проводилось в дальней зоне рупора антенны сечением 40×90 мм, что обеспечивало равномерное облучающее поле ИПМИ.

Проведенными экспериментами установлено, что облучение ИПМИ стволовых клеток *in vitro* оказывает влияние на скорость их пролиферации. После воздействия 4000 импульсов ИПМИ с пППМ 1500 Вт/см² с частотой 8 Гц наблюдалось ингибирование на 40% пролиферации клеток относительно контрольной группы клеток, в то время как 4000 импульсов при частоте 13 Гц увеличивало на 30% количество клеток в облученной культуре. После воздействия ИПМИ с меньшей пППМ 140 Вт/см² наблюдались аналогичные эффекты при тех же частотах повторения (ингибирование на 35%, стимуляция на 40%), однако скорость пролиферации СК была выше. Стимулирующий эффект пролиферации по времени образования монослоя оказался быстрее на 4-6 суток в сравнении с контролем (12-14 суток).

Из полученных результатов следует, что однократное воздействие наносекундными импульсами ИПМИ влияет на скорость пролиферации стволовых клеток. С позиции биофизики представляется актуальным знание первичного механизма действия наносекундного ИПМИ на функционирование стволовых клеток и установление основных закономерностей такого влияния. Понимание основных закономерностей позволяет использовать

наиболее оптимальный режим воздействия для достижения необходимого результата, а знание первичного механизма позволит усилить или ослабить эффект сочетанным воздействием ИПМИ с другим фактором.

По-видимому, первичный физический механизм влияния ИПМИ на стволовые клетки имеет нетепловую природу, поскольку величина повышения температуры в облучаемой клеточной культуре не превышает $0,1-0,2^{\circ}\text{C}$. Механизм формирования эффекта ИПМИ на СК можно рассматривать как баланс влияния на пролиферацию двух функционально альтернативных молекулярных систем, по-разному активируемых воздействием ИПМИ в зависимости от частоты повторения. Существенно важно, что при определённых параметрах воздействия реализуется эффективная стимуляция пролиферации. Это важно для клеточной терапии при необходимости срочного получения достаточного количества замещающих повреждённую ткань специализированных клеток, репродуцируемых из стволовых.

1. Шахов В.П., Хлусов И.А., Дамбаев Г.Ц. и др. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей. Томск: STT, 2004, 386 с.

2. РФ ГОСТ Р-53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ, 2010.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ГЛАВНЫХ КОМПОНЕНТ ДЛЯ СКРИНИНГА ПАЦИЕНТОВ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Application of the Principal Component Method for Screening of Patients with Oncohematological Diseases

Бутяев Р.В.¹, Чернышев Д.А.¹, Михайлец Э.С.¹, Плотникова Л.В.¹, Гарифуллин А.Д.², Кувшинов А.Ю.², Волошин С.В.², Поляничко А.М.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, РФ, robertmag@mail.ru

² Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России, г. Санкт-Петербург, РФ

Множественная миелома (ММ) и хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) являются одними из самых распространенных онкогематологических заболеваний крови. На сегодняшний день они остаются неизлечимыми. Ранее для анализа вторичной структуры белков в составе сыворотки крови пациентов с указанными диагнозами успешно применялся метод ИК спектроскопии [1]. В данной работе предложен хемометрический подход к анализу ИК спектров сыворотки крови, который, по нашему мнению, может послужить основой для создания достаточно простого, надежного и недорогого метода скрининга широкого круга пациентов, с целью выявления признаков патологии.

В работе проанализированы ИК спектры 45-ти образцов сыворотки крови больных ММ, больных ХЛЛ и здоровых доноров. Все спектры получены на ИК-Фурье спектрометре Tensor 27 (Bruker) в растворах D_2O с разрешением 2 см^{-1} и усреднением по 128 накоплениям (Рисунок 1). Для анализа спектров нами был реализован алгоритм машинного обучения – метод главных компонент (МГК). Он помогает сократить размерность данных и представить их в виде набора векторов – главных компонент (ГК) [2].

Использование МГК позволило существенно упростить представление массива данных, которое теперь удобно изображать в пространстве главных компонент (Рисунок 2). В ходе оптимизации параметров работы алгоритма было установлено, что для исследованного набора образцов метод даёт наиболее информативные результаты применительно к диапазону $(1800-1600)\text{ см}^{-1}$. В координатах ГК1(ГК3) исследованный набор образцов разбивается на три непересекающиеся группы, соответствующие образцам сыворотки крови больных ММ (зеленые точки), больных ХЛЛ (красные точки) и здоровых доноров (черные точки). Таким образом, МГК

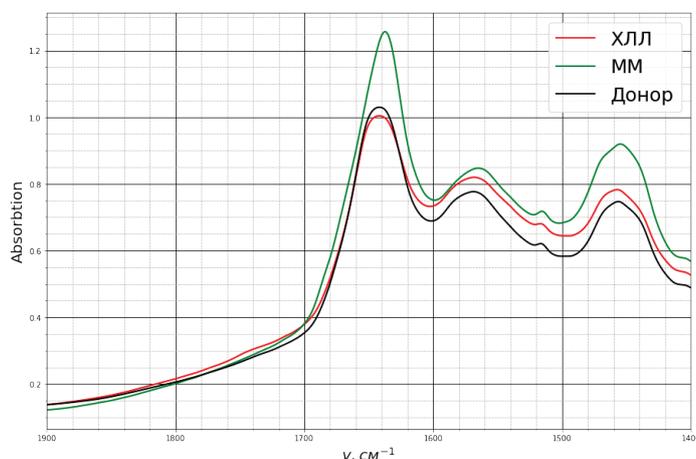


Рисунок 2. Характерные спектры сыворотки крови в растворе D_2O . Красный – ХЛЛ, зелёный – ММ, чёрный – доноры. Диапазон $(1900 - 1400)\text{ см}^{-1}$

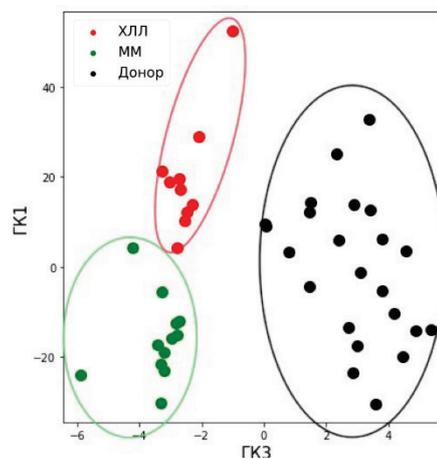


Рисунок 1. Зависимость первой главной компоненты от третьей для диапазона $(1800-1600)\text{ см}^{-1}$. Красный – ХЛЛ, зелёный – ММ, чёрный – доноры. Эллипсы показывают обособленность каждой группы точек

может быть успешно применен для классификации образцов сыворотки крови пациентов с диагнозами ММ или ХЛЛ.

Благодарности. Часть работ выполнена с использованием оборудования Научного парка СПбГУ («Оптические и лазерные методы исследования вещества» «Центр диагностики функциональных материалов для медицины фармакологии и нанозлектроники», «Криогенный отдел»).

1. Тельная Е.А. и др. // Биофизика, 2020, т. 65, № 6, с. 1154-1160.
2. Chernyshev D.A. et al. // Journal of Physics: Conference Series, 2021, vol. 2103, p. 012052.

ОСОБЕННОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК НОЕCHST 33258 ПРИ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИИ С БЫЧЬИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ **Peculiarities of Fluorescence Characteristics of Hoechst 33258 at Complex-Formation with Bovine Serum Albumin**

Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Петросян Н.Р.
Ереванский государственный университет, г. Ереван, РА, *p.vardevanyan@ysu.am*

Транспортировка биологически активных веществ в организме к мишеням в настоящее время является актуальной. С этой точки зрения, исследование процессов с участием альбуминов сывороточной крови приобретает не только фундаментальное, но и прикладное значение. При этом, особую важность представляет транспорт ДНК-специфических лигандов к мишеням (к ДНК). Среди таких соединений определенный интерес представляет желобковосвязывающее соединение Hoechst 33258, который имеет прикладное значение в биомедицине.

Особенности связывания Hoechst 33258 с бычьим сывороточным альбумином (БСА) исследовано методом флуоресцентной спектроскопии. При низких концентрациях БСА интенсивность спектров флуоресценции Hoechst 33258 с этим белком уменьшается. При дальнейшем увеличении концентрации интенсивность флуоресценции комплексов возрастает и сдвигается в коротковолновую область. Эти особенности флуоресцентных свойств Hoechst 33258 при взаимодействии с БСА являются результатом того, что конформация белка претерпевает определенные изменения за счет образования водородных связей, что приводит к потере α -спиральности.

Аналогичные результаты получены и методом дифференциальной спектроскопии. На дифференциальных спектрах комплексов Hoechst 33258 с БСА образуются две полосы – отрицательная, с пиком при длине волны 343 нм (полоса поглощения свободного лиганда), и положительная, с пиком при ~ 335 нм. Отрицательная полоса в дифференциальных спектрах является результатом уменьшения концентрации лиганда в результате связывания с БСА в основном за счет водородных связей (с аминокислотными остатками в основном α -спиральных участках белка). Положительная полоса является результатом гипсохромного сдвига дифференциальных спектров, что обычно обусловливается изменением полярности микроокружения хромофорных групп (в данном случае Hoechst 33258).

Отметим, что Hoechst 33258 является флуоресцентным красителем ДНК, поскольку при связывании этого лиганда с ней интенсивность спектров флуоресценции возрастает. Этот факт обусловлен тем, что имеет место гидрофобный перенос молекул лиганда из полярной среды в менее полярный малый желобок ДНК, вследствие чего и интенсивность флуоресценции образовавшихся комплексов увеличивается. Аналогичный эффект фактически обнаружен и при взаимодействии Hoechst 33258 с БСА при соотношении $\Gamma = \text{лиганд/макромолекула} \ll 1$ (в случае ДНК также интенсивность флуоресценции возрастает при значительно низких концентрационных соотношениях лиганд/НК).

Таким образом, полученные результаты спектроскопических исследований позволяют заключить, что ДНК специфический лиганд Hoechst 33258 может прочно связываться и с альбумином. При этом, выявлены два типа взаимодействий: при низких концентрациях БСА преобладающим является образование водородных связей с α -спиралями белка; при относительно больших концентрациях протеина начинают проявляться гидрофобные взаимодействия между лигандом и БСА. В результате этого интенсивность спектров флуоресценции и дифференциальных спектров комплексов возрастают, имеет место также гипсохромный сдвиг. Эти эффекты в совокупности вызывают разрыхление нативной структуры БСА. Этот эффект нами выявлен методом УФ-денатурации комплексов БСА-Ноеchst 33258, поскольку кривые денатурации комплексов сдвигаются в сторону низких температур, по сравнению с аналогичной кривой протеина. [1].

1. Антонян А.П., Петросян Н.Р., Вардеванян П.О. Сравнительное исследование спектральных характеристик комплексов Hoechst 33258 и МС с БСА // Журнал прикладной спектроскопии. 2021, т. 88, № 6.

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ, ИНДУЦИРОВАННОЕ ЦИТОХРОМОМ С В ПРИСУТСТВИИ ФОСФАТИДНОЙ КИСЛОТЫ. ПЕРСПЕКТИВНАЯ РОЛЬ В РАЗВИТИИ АПО- И ФЕРРОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Lipid Peroxidation Induced by Cytochrome c in the Presence of Phosphatidic Acid. Prospective Role in the Development of Apo- and Ferroptotic Processes

Волков В.В., Степанов Г.О., Осипов А.Н.

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, РФ, *volkov.vv.work@mail.ru*

Известно множество заболеваний, патогенетическим звеном которых является нарушение механизмов регулируемой клеточной гибели. В настоящее время открыты и активно исследуются ряд таких механизмов, среди которых апоптоз, ферроптоз, пироптоз и другие. В последние годы показано четкая связь различных механизмов гибели клеток с окислением тех или иных фосфолипидов: фосфатидилсерина при фагоцитозе, кардиолипина при апоптозе, фосфатидилжтаноламина с арахидоновой кислотой при ферроптозе. Такая особенность фосфолипидов играть самое ключевое участие в клеточных процессах позволило выделить новое направление в науке – регуляторную липидомику [1]. Как было отмечено, в механизмах развития апоптоза хорошо изучена роль кардиолипина, приводящего к сначала к структурным изменениям в цитохроме С (далее CytC), а затем и к изменению его пероксидазной активности, что приводит к перекисному окислению липидов биологических мембран (ПОЛ) [1].

Цель: исследование влияния ненасыщенных кардиолипина и фосфатидной кислоты (РА) на перекисное окисление фосфолипидных мембран, которое инициируется цитохромом С, а также обнаружение продуктов окисления – гидроперекисей фосфолипидов.

Пероксидазная активность CytC резко (в десятки раз) возрастает в присутствии ненасыщенного кардиолипина митохондрий, что приводит сначала к окислению мембран, а затем и к образованию пор [2]. Однако процессы перекисного окисления митохондриальных мембран, индуцируются не только в присутствии кардиолипина, но даже более выражено в присутствии фосфатидной кислоты и эти процессы ранее не изучены. В данной работе, при помощи хемилюминесценции показано, что интенсивность CytC-индуцированного ПОЛ при увеличении процентного содержания тетраолеилкардиолипина (TOCL) или диолеил фосфатидной кислоты (DOPA) в липосомах (от 10 до 50%) увеличивается до 24 раз относительно контрольных образцов содержащих только диолеил фосфатидилхолин (DOPC). CytC-фосфолипидные комплексы с DOPC, не влияют на интенсивность хемилюминесценции.

Нужно заметить, что зависимость интенсивности хемилюминесценции от концентрации CytC нелинейная. Максимальной она наблюдается при соотношении анионных фосфолипидов к CytC равном 200-250 к 1, соответственно.

В свою очередь, при помощи метода ЭПР в присутствии спиновой ловушки POBN были обнаружены продукты перекисидации – гидроперекиси фосфолипидов (LOOH). Увеличение количества гидроперекисей наблюдалось только в системе с липосомами, содержащими CL или РА, в то время как липосомы, содержащие только PC, показывали изменение концентрации LOOH.

Таким образом, показано, что: 1. Способность CytC инициировать ПОЛ в присутствии TOCL- или DOPA-содержащих липосом возрастает до 24 раз (относительно DOPC). 2. При увеличении количества CytC его способность вызывать ПОЛ изменяется нелинейно (сначала увеличивается, а потом резко снижается), что может быть связано с особенностями структурных изменений CytC, которые, как известно, зависят от соотношения анионные фосфолипиды/CytC. 3. Обнаружено образование продуктов перекисидации – гидроперекисей фосфолипидов в системах с липосомами из CL или РА, липосомы, содержащие только PC показали отсутствие LOOH. 4. Данная способность CytC в присутствии TOCL и DOPA может играть ключевую роль в развитии как апоптотических, так и ферроптотических процессов. Они, в свою очередь, являются неотъемлемым элементом патогенеза онкологических, сердечно-сосудистых и многих других заболеваний.

1. Kagan V.E. et al. Redox phospholipidomics of enzymatically generated oxygenated phospholipids as specific signals of programmed cell death // *Free Radic Biol Med*, 2020, vol. 147, pp. 231-241.

2. Puchkov M.N. et al. Cytochrome c produces pores in cardiolipin-containing planar bilayer lipid membranes in the presence of hydrogen peroxide // *Biochim Biophys Acta*, 2013, vol. 1828, no. 2, pp. 208-212.

САМОДИФФУЗИИ В СИСТЕМЕ ЛИПОСОМ ПО ДАННЫМ ЯМР С ИМПУЛЬСНЫМ ГРАДИЕНТОМ МАГНИТНОГО ПОЛЯ

Self-Diffusions in a Liposome System According to NMR Pulsed Magnetic Field Gradient Data

Петрова А.Ф.¹, Халиуллина А.В.^{1,2}, Мельникова Д.Л.¹, Камбеева Д.И.², Гнездилов О.И.¹,
Гиматдинов Р.С.^{1,2}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, РФ, rsgimatdinov@kpfu.ru

² Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, РФ, rgimatdinov@kazangmu.ru

Суспензии липосом широко используются в современной медицинской диагностике и клинической практике. В фармацевтике, благодаря способности, включать в себя и удерживать вещества различной природы, липосомы находят применения в системах адресной доставки лекарств. Среди причин интереса к липосомам, стоит отметить возможность их использования в качестве модельной системы для исследования особенностей везикулярного транспорта и в качестве моделей клеточных мембран. Применение липосом требует знания многих их характеристик - распределения по размерам, текучести, проницаемости, самого результата самоорганизации липидов в воде с образованием замкнутых пузырьков. Важные значения имеют данные о подвижности компонентов мембраны, коэффициентах латеральной самодиффузии липидов в ней.

Существует большой спектр различных физических методов, которые позволяют определять те или иные свойства липосом и их оболочек. Особое место в исследовании динамики мембранных систем, в том числе липосом, занимает метод ядерного магнитного резонанса с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП), дающий непосредственную информацию о трансляционной подвижности в системе.

В самом простом случае трансляционная подвижность молекул воды в липосомальной суспензии может быть разделена на два вида, или «фазы», которые определяются нахождением молекулы воды во внутреннем объеме липосомы или вне. Между фазами может проходить обмен, а также наблюдаться при определенном времени диффузии режим пространственно-ограниченной диффузии, когда молекулы при своем движении начинают чувствовать ограничение со стороны окружающих липидных слоев, подобно ограниченной диффузии в пористом пространстве. Информация об затруднении диффузии дает возможность определить размеры ограничивающих структур (размеры липосом и их распределение). Контрастирование ЯМР сигнала протонов воды, находящихся вне липосом, с помощью парамагнитного допинга – введения в систему парамагнитного контрастирующего вещества, позволяет более отчетливо разделить сигналы от «фаз».

Целью данной работы было исследование методом ЯМР ИГМП на спектрометре “AVANCE 400 III TM” (Bruker) суспензии липосом в водном окружении с применением контрастирующего агента. Объекты исследования - суспензии липосом, приготовленные из фосфолипидов соевого фосфатидилхолина марки Липоид S100 и воды (H₂O) в массовом соотношении 1:1, с добавлением контрастирующего парамагнетика в концентрации 0.73 весовых % и без него. Образцы были приготовлены стандартным методом гидратации тонких липидных пленок. В качестве контрастирующего агента был использован содержащий гадолиний препарат ProHance, с молекулами гадотеридола как активного вещества в количестве 279,3 мг на 1 мл.

Контроль самосборки липидов в присутствии воды в жидкокристаллическую фазу ламеллярных липосом проведен по спектрам ЯМР высокого разрешения на ядрах ³¹P. Наблюдались характерные «плечи» на спектральной линии, которые, как известно, свидетельствуют о формировании липидных слоев. Полученные при 400-кратном увеличении методом конфокальной микроскопии микрофотографии образцов также подтвердили образование суспензии липосом с размерами пузырьков порядка 20-40 мкм.

Добавление гадолиния изменило также соотношение интенсивностей сигналов в спектре ЯМР на ядрах водорода ¹H. Сигнал от ОН-групп заметно уменьшился, что позволило отчетливо регистрировать сигналы от протонов холиновых групп липидов и от протонов углеводородных цепей липидов. Как результат появилась возможность измерять диффузионные затухания сигналов эхо отдельно для молекул воды и липидов. Полученные из анализа диффузионных затуханий зависимости значений коэффициентов самодиффузии D_s от времени диффузии t_d , как для молекул воды внутри липосом, так и для латерально диффундирующих по бислоям молекул липидов хорошо аппроксимируются степенной функцией вида $D_s \sim t_d^\alpha$. Для коэффициентов самодиффузии молекул воды показатель $\alpha = -0.86$, для липидов $\alpha = -0.92$. Оба значения показателей α близки к минус единице, что согласно теории ограниченной диффузии, является критерием пространственно-ограниченного трансляционного движения молекул. Диффузиметрия в режиме пространственно-ограниченного движения наиболее информативна, так как в этом режиме отражаются топологические особенности пространства, окружающего диффундирующие молекулы. На основании полученных значений коэффициентов самодиффузии, характерных для обнаруженного режима ограниченного движения, сделаны оценки средних размеров $\langle L \rangle$ микропространств, представляющих собой доступные для трансляционной диффузии молекул области в объеме образца. Величины $\langle L \rangle$ близки размерам липосом установленным в данных образцах методом конфокальной микроскопии.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕСТРУКЦИИ ТКАНЕЙ МЕТОДОМ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Investigation of Biological Tissue Destruction Using the Nuclear Magnetic Resonance Method

Юсупова А.Р., Ковязина И.В., Гиматдинов Р.С.

Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, РФ, rgimatdinov@kazangmu.ru

В настоящее время важным направлением в развитии современной медицины является сохранение клеток, тканей и органов для целей хирургии, и трансплантологии. По-прежнему актуальна задача разработки новых неинвазивных методик оценки жизнеспособности биологических структур. В данной работе рассматриваются возможности применения ядерной магнитной релаксации в качестве основы для разработки анализа жизнеспособности ткани.

Для сохранения живых тканей широко применяются методики криобиологии с воздействием на ткани низких температур. Продолжается поиск химических веществ, обладающих криозащитными свойствами. Недавно [1] было предложено использовать в качестве криопротекторов ионные жидкости (ИЖ). Однако эта идея изучена еще не в полной мере, и ИЖ нуждаются в дополнительных исследованиях на их возможное токсическое воздействие на биообъекты, на жизнеспособность ткани. С этой целью методика оценки жизнеспособности ткани по данным ЯМР релаксации была применена для исследования воздействия на клеточные структуры биоткани водного раствора ионной жидкости - ацетата этиламмония.

В качестве первого типа объектов исследования служили мышечные ткани лабораторной лягушки (портняжная и икроножная мышцы) и паренхима печени лягушки, помещенные в физиологический раствор. Второй тип образцов - подобные ткани в физиологическом растворе с добавлением парамагнитного допинга для ЯМР контрастирования. В качестве контрастирующего вещества был использован фармацевтический препарат ProHance, содержащий молекулы гадотеридола как активного парамагнетика. Третий тип образцов – ткани, помещенные в водный раствор ионной жидкости ацетата этиламмония.

Измерения проводились при комнатной температуре, в течение шести суток, с периодичностью в несколько часов. В промежутках между измерениями все образцы хранились в холодильнике при температуре 5°С.

Регистрация релаксационных затуханий осуществлялась на ЯМР-релаксметре Хроматэк Протон 20М с применением импульсной последовательности КПМГ. В качестве контроля клеточной деструкции в тканях параллельно проводились измерения мембранного потенциала покоя клеток с применением микроэлектродного метода.

Релаксационные затухания поперечной намагниченности в образцах имеют вид типичный для многофазной системы. График спада немонотонноэкспоненциальный и может быть аппроксимирован суммой от двух до четырех экспонент в зависимости от типа ткани, стадии деструкции и присутствия допинга. Применение контрастирующего вещества позволило исключить фоновый сигнал от протонов физиологического раствора и более отчетливо наблюдать перераспределение населенностей фаз, соответствующих клеточным структурным элементам ткани в ходе их деструкции.

Несмотря на наблюдаемое в процессе разрушения ткани заметное изменение формы релаксационного затухания, которое связано как с изменением времен T2 компонент спада, так и их парциальных населенностей, следует отметить недостаточную практическую применимость компонентного разложения для простой экспресс-оценки жизнеспособности ткани. Поэтому в качестве оцениваемого параметра предлагается интегральный параметр, отражающий эволюцию формы релаксационных затуханий в ходе процесса деструкции и представляющий собой площадь под релаксационными кривыми - интеграл на заданном интервале значений оси абсцисс. График изменения данного интегрального параметра имеет характерную S-образную форму и повторяет аналогичные контрольные графики изменения мембранного потенциала покоя в ходе деструкции исследованных образцов. Данный результат свидетельствует о высокой чувствительности ЯМР-релаксации к протекающим в тканях деструктивным процессам и возможности применения предлагаемого интегрального параметра для оценки их жизнеспособности. Существенным отличием для образца, хранившегося в водном растворе ионной жидкости, является отсутствие на графиках изменения как интегрального ЯМР-параметра, так и мембранного потенциала, выраженного плато на начальном участке S-образной кривой деструкции. Имеет место резкий спад данных показателей уже в первые часы процесса. Данный результат позволяет предположить, что ионная жидкость ацетата этиламмония ускоряет деструктивные процессы в ткани, оказывая определенное токсическое воздействие на ткань.

1. Bryant S.J., Brown S.J., Martinet A.V. et al. Cryopreservation of mammalian cells using protic ionic liquid solutions // *Journal of Colloid and Interface Science*, 2021, vol. 603, pp. 491-500, doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.11.095.

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА КАК ИНГИБИТОРЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Dinitrosyl Iron Complexes as Lipid Peroxidation Inhibitors

Грачев Д.И.^{1,2}, Медведева В.А.^{1,2}, Шумаев К.Б.^{2,3}, Ланкин В.З.², Рууге Э.К.^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ

² НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова, РФ

³ Институт биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, РФ, di.grachev@physics.msu.ru

С перекисным окислением липидов (ПОЛ) связаны многие физиологические и патологические процессы, среди которых особенно выделяются различные пути клеточной гибели [1]. По этой причине, поиск соединений, предотвращающих или регулирующих окислительные модификации липидов, представляется весьма перспективным направлением исследований. Одним из таких соединений могут являться динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ). Антиоксидантный эффект ДНКЖ, в том числе с лигандом глутатионом (GS-ДНКЖ), был показан ранее в различных работах [2,3].

В нашей работе с помощью методов спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых ловушек, а также спектрофотометрии и хемилюминесценции было рассмотрено влияние ДНКЖ на процессы, связанные с перекисным окислением липидов в модельных системах.

Предполагаемые нами антиоксидантные свойства GS-ДНКЖ нашли подтверждение в экспериментах с гемопroteинами (гемоглобином и цитохромом *c*) и гидропероксидом *трет*-бутила. При этом моделируется образование органических свбоднорадикальных интермедиатов, аналогичных тем, что формируются в ходе перекисного окисления липидов и других биомолекул. Показано достоверное снижение сигналов аддуктов спиновой ловушки DEPMPO со свбоднорадикальными интермедиатами.

Также было установлено, что GS-ДНКЖ существенно подавляют накопление липогидропероксидов в липопroteинах низкой плотности (ЛНП) при их окислении ионами меди, причём эти комплексы были намного более эффективны, чем свбодный глутатион (GSH). Эти данные согласуются с тем, что в сравнении с GSH глутатион-содержащие ДНКЖ более эффективно ингибируют индуцированный гипохлоритом гемолиз эритроцитов [4]. ДНКЖ с фосфатными лигандами сначала ингибировали окисление ЛНП, но позже их антиоксидантное действие снижалось. Более того, через 70 мин инкубации ЛНП с этим вариантом ДНКЖ наблюдалась инверсия антиоксидантного действия в прооксидантное. Данный эффект может быть обусловлен низкой стабильностью содержащих фосфат динитрозильных комплексов железа. Можно предположить, что ионы железа, высвобождающиеся при распаде ДНКЖ, так же, как и ионы меди могут катализировать процессы ПОЛ. В таком случае, ингибирование таких реакций в результате связывания ионов железа в составе ДНКЖ является одним из механизмов антиоксидантного действия NO [5]. Следует отметить, что в ходе разрушения ДНКЖ должен также выделяться свбодный NO. Считается, что оксид азота благодаря взаимодействию с алкильными ($L\cdot$), алкилперекисными ($LOO\cdot$) и алкоксильными радикалами ($LO\cdot$) липидов способен обрывать цепные реакции ПОЛ [6].

Таким образом, было установлено, что динитрозильные комплексы железа эффективно снижают уровень липогидропероксидов, а также алкильных, алкоксильных и алкилперекисных радикалов. Следует отметить, что в использованных в работе модельных системах антиоксидантное действие GSH и ДНКЖ с фосфатными лигандами было меньшим, чем у GS-ДНКЖ, а свбодный NO мог проявлять прооксидантные свойства.

1. Gaschler M.M., Stockwell B.R. Lipid peroxidation in cell death // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017, vol. 482, no. 3, pp. 419-425.

2. Pisarenko O., Studneva I., Timoshin A., Veselova O. Protective efficacy of dinitrosyl iron complexes with reduced glutathione in cardioplegia and reperfusion. *Pflügers Arch.* // *Eur. J. Physiol.*, 2019, vol. 471, no. 4, pp. 583-593.

3. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhnikov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes // *Nitric Oxide*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 37-46.

4. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V., Grigorieva D.V., Panasenko O.M., Vanin A.F., Topunov A.F., Terekhova M.S., Sokolov A.V., Cherenkevich S.N., Ruuge E.K. Protective Effect of Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione in Red Blood Cell Lysis Induced by Hypochlorous Acid // *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019, vol. 2019, p. 2798154.

5. Li Q., Li C., Mahtani H.K., Du J., Patel A.R., Lancaster J.R. Jr. Nitrosothiol Formation and Protection against Fenton Chemistry by Nitric Oxide-induced Dinitrosyliron Complex Formation from Anoxia-initiated Cellular Chelatable Iron Increase // *J. Biol. Chem.*, 2014, vol. 289, no. 29, pp. 19917-19927.

6. Pryor W.A., Houk K.N., Foote C.S., Fukuto J.M., Ignarro L.J., Squadrito G.L., Davies K.J. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.*, 2006, vol. 291, no. 3, pp. R491-R511.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА
БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ 1,1-БИС(1*H*-ИМИДАЗОЛ-1-ИЛ)МЕТАНИМИНА**
Changes in the Antimycotic Activity of 1,1-bis(1*H*-imidazol-1-yl)methanimin by the Influence of a Pulsed
Magnetic Field

Гребешкова Н.А., Глотов А.А., Роденко Н.А.

Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королёва, г. Самара, РФ,
nadya.greb@yandex.ru

В настоящее время появляются работы, связанные с облучением различных веществ импульсным магнитным полем (ИМП). Существуют данные, говорящие об усилении активности противоопухолевых препаратов [1] и антибиотиков [2]. Таким образом, было сделано предположение о возможном проявлении аналогичного влияния импульсного магнитного поля на антимикотические вещества имидазольного ряда. Исследования такого типа могут быть актуальными, так как препараты Клотримазол, Миконазол и Кетоконазол, являющиеся производными имидазола, широко распространены в практике при лечении грибкового поражения.

Таким образом, целью работы стало исследование воздействия ИМП на биологическую активность 1,1-бис(1*H*-имидазол-1-ил)метанимина.

Данное вещество синтезируется в реакции имидазола с бромистым цианом в кипящем бензоле (рис.1).

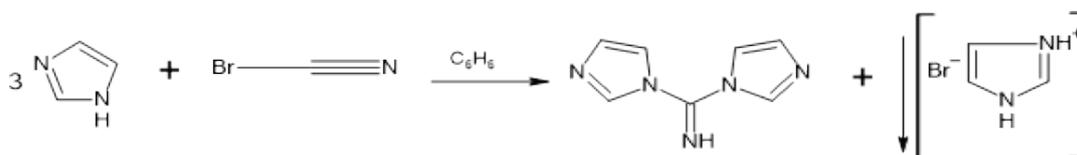


Рисунок 1. Схема синтеза 1,1-бис(1*H*-имидазол-1-ил)метанимина.

Анализ спектра возможных биологических активностей [3] с помощью программы PASS Online предположил антимикотическую активность производного вещества путём ингибирования глюкоан-эндо-1,3-β-D-глюкозидазы. Данный фермент участвует в одной из стадий синтеза 1,3-β-D-глюкана – важной составляющей клеточной стенки грибка [4].

Воздействие импульсным магнитным полем проводилось на магнитно-импульсной установке МИУ-15, сконструированной в Самарском университете на кафедре обработки металлов давлением. Флакон с высушенным порошкообразным веществом помещался в одновитковый индуктор и производилась обработка ИМП с напряженностями $0,09 \cdot 10^6$, $0,21 \cdot 10^6$ и $0,27 \cdot 10^6$ А/м.

В дальнейшем антимикотическую активность определяли с помощью диско-диффузионного метода на кафедре биохимии, биотехнологии и биоинженерии Самарского университета. На первом этапе эксперимента производилось исследование на уже выросших колониях грибов, на втором этапе диски помещались на поверхность агара сразу после посева для изучения фактора ингибирования роста грибов. Для работы применялся штамм *Penicillium adametzioides* и *Aspergillus flavus*. В качестве растворителя для 1,1-бис(1*H*-имидазол-1-ил)метанимина был применён ДМСО, концентрация вещества составляла 5%.

В процессе изучения влияния необлученного вещества на выросшие колонии *Aspergillus flavus*, зоны лизиса зафиксированы не были. Однако были обнаружены зоны обесцвечивания спор. Далее, в ходе исследовании влияния облученного вещества на ингибирование роста той же колонии гриба наибольшее достоверное увеличение зон лизиса было зафиксировано при $0,09 \cdot 10^6$ А/м на 71%.

В эксперименте по исследованию влияния облученного вещества на выросшие колонии гриба *Penicillium adametzioides* было установлено достоверное увеличение зон лизиса при $0,09 \cdot 10^6$ и $0,21 \cdot 10^6$ А/м на 13% и уменьшение зон лизиса при $0,27 \cdot 10^6$ А/м на 22%. В ходе исследования влияния облученного вещества на ингибирование роста этой же колонии плесневых грибов не было зафиксировано достоверное увеличение зон лизиса.

На основании полученных результатов можно делать выводы о воздействии импульсного магнитного поля на антимикотическую активность данного вещества. Стоит отметить, что эффект может быть как и положительным, так и отрицательным.

1. Kakikawa M., Yamada S. Effect of extremely lowfrequency (ELF) magnetic fields on anticancer drugs potency // IEEE Transactions on Magnetics, 2012, vol. 48, iss. 11, pp. 2869-2872.

2. Glushchenkov V.A., Vasilyeva T.I., Purigin P.P., Belyaeva I.A., Rodenko N.A., Madyarova A.K., Jusupov R.J. Changes in the Antibacterial Activity of Benzylpenicillin Exposed to a Pulsed High-Intensity Magnetic Field // Biophysics, 2019, vol. 64, iss. 2, pp. 214- 223.

3. Глотов А.А., Пурыгин П.П., Зарубин Ю.П. Спектр возможных видов биологической активности для 1,1'- бис(азолил-1)метаниминов // Вестник Башкирского государственного медицинского университета, 2022, № 1, с. 62-65.

4. Free S.J. Fungal cell wall organization and biosynthesis // Adv. Genet, 2013, vol. 81, pp. 33-82.

**ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫЕ МОДЕЛИ ПОЛИГЛУТАМИНОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ:
НАРУШЕНИЕ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ И СЕЛЕКТИВНАЯ ГИБЕЛЬ НЕЙРОНОВ**
**Patient-Specific Models of Polyglutamine Diseases: Disturbance in Calcium Signaling and Selective Neuron
Death**

Грехнёв Д.А.¹, Вигонт В.А.¹, Лебедева О.С.^{2,3}, Беликова Л.Д.^{2,4}, Ключников С.А.^{1,5}, Казначеева Е.В.¹

¹ Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, РФ

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, г. Москва, РФ

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКЦ ФХМ ФМБА, г. Москва, РФ

⁴ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, г. Москва, РФ

⁵ Научный центр неврологии, г. Москва, РФ, dima.grehnyov@yandex.ru

Разработка технологий клеточного репрограммирования и направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в различные типы нейронов или глии открыли новые возможности для моделирования нейродегенеративных расстройств. Данные модели получили название пациент-специфичных, поскольку отражают фенотип конкретного больного с определенной патологией. В последние годы наблюдается массовый рост числа публикаций, посвященных исследованию пациент-специфичных моделей нейродегенеративных патологий, включая исследования кальциевой сигнализации [1]. Наша лаборатория имеет большой опыт исследования пациент-специфичных моделей болезни Хантингтона (БХ) [2-4] и в настоящий момент работает с целой палитрой пациент-специфичных моделей полиглютаминовых заболеваний (БХ, спинозжечковых атаксий (СМА) 1 и 17 типов). Данные модели позволяют проводить исследования с учетом нейрональной специфичности и открывают новый путь для решения проблемы селективной уязвимости нейронов при нейродегенеративных заболеваниях. Основной фокус исследований нашей лаборатории сосредоточен на изучении молекулярных механизмов кальциевой сигнализации и разработке способов её коррекции при патологии. В нашем исследовании методом пэтч-кламп в конфигурации регистрации токов со всей поверхности клетки мы охарактеризовали депо-управляемый вход кальция и приток кальция через потенциал-управляемые каналы в пациент-специфичных ГАМК-ергических нейронах больных БХ, СМА1, СМА17 и здоровых доноров. Выраженное увеличение притока кальция в клетку через депо- и потенциал-управляемые каналы в ГАМК-ергических нейронах характерно для БХ (как для ювенильной формы, так и с поздней манифестацией заболевания) и СМА17, для которых характерна массовая гибель ГАМК-ергических нейронов стриатума. Интересно, что при СМА1 для которой нехарактерна гибель ГАМК-ергических нейронов, не было отмечено выраженных нарушений кальциевой сигнализации. Для изучения феномена селективной уязвимости мы провели сравнение паттернов кальциевой сигнализации для пациента с СМА17 на уязвимых ГАМК-ергических нейронах и дофаминергических нейронах, которые по клиническим данным гибнут значительно в меньшей степени. Мы показали отсутствие ярко выраженного изменения депо-управляемого входа кальция в дофаминергических нейронах пациента с СМА17 в сравнении с дофаминергическими нейронами здоровых доноров. Таким образом, депо-управляемый вход кальция может играть ключевую роль в селективной уязвимости нейронов при СМА17. Описав патологическое увеличение депо-управляемого входа кальция в ГАМК-ергических нейронах при БХ и СМА17 необходимо выяснить лежащий в его основе молекулярный механизм. В докладе будут представлены ключевые молекулярные детерминанты патологического депо-управляемого входа кальция. Кроме того, мы продемонстрируем использование пациент-специфичных моделей для поиска малых молекул, способных скорректировать наблюдаемые нарушения кальциевой сигнализации и в перспективе способные стать лекарственными препаратами.

Работа поддержана Грантом Минобрнауки РФ Соглашение №075-15-2021-1075 от 28.09.2021 (договор 415/21-23-НИИР) и Грантом РФФИ № 22-14-00218.

1. Grekhnev D.A., Kaznacheeva E.V., Vigont V.A. Patient-Specific iPSCs-Based Models of Neurodegenerative Diseases: Focus on Aberrant Calcium Signaling // Int J Mol Sci., 2022, vol. 23, no. 2, p. 624.

2. Vigont V.A., Grekhnev D.A., Lebedeva O.S. et al. STIM2 Mediates Excessive Store-Operated Calcium Entry in Patient-Specific iPSC-Derived Neurons Modeling a Juvenile Form of Huntington's Disease // Front Cell Dev Biol., 2021, vol. 9, p. 625231.

3. Vigont V., Nekrasov E., Shalygin A. et al. Patient-Specific iPSC-Based Models of Huntington's Disease as a Tool to Study Store-Operated Calcium Entry Drug Targeting // Front Pharmacol., 2018, vol. 9, p. 696.

4. Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A. et al. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons // Mol Neurodegener., 2016, vol. 11, p. 27.

**«ПРОСТЫЕ НЕРВНЫЕ СИСТЕМЫ» В ИССЛЕДОВАНИЯХ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ
МЕХАНИЗМОВ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ**
«Simple Nervous Systems» in Studies of the Epigenetic Mechanisms of the Long-Term Memory Formation

Гринкевич Л. Н.

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург, РФ, *larisa_gr_spb@mail.ru*

Одной из сложнейших задач нейробиологии является выяснение роли эпигенетических механизмов формирования долговременной памяти (ДП). Важнейшую роль в эпигенетической регуляции играет модификация гистонов, приводящая к изменению пространственной структуры хроматина, метилирование ДНК, а также изменение биогенеза микроРНК что в конечном итоге, приводит к изменению экспрессии генов, вовлекаемых в пластические перестройки.

Существенную роль в прогрессе исследований в данной области сыграли животные с относительно простыми нервными системами, в частности моллюски. ЦНС этих животных характеризуется наличием гигантских нейронов, способна длительное время переживать в условиях полуинтактных препаратов, что позволило идентифицировать нейронные сети, реализующие управление различными поведенческими актами, в том числе и формированием безусловных и условных рефлексов, а также открыть молекулярно-генетические механизмы синаптической пластичности. Так на модели фасилитации синаптической связи между сенсорными и моторными нейронами моллюска аплии впервые была показана важная роль внутриклеточных регуляторных каскадов, транскрипционных факторов (ТФ) и эпигенетической модификации гистонов в формировании ДП, а также возможность ее улучшения через влияние на эти процессы [1,2]. В дальнейшем было доказано, что данные механизмы широко вовлекаются и в формирование ДП позвоночных животных. В настоящее время ведутся исследования по использованию модификаций гистонов для улучшения ментальных характеристик при инсультах, болезнях Альцгеймера и Паркинсона. Кроме того, на моллюсках, были проведены исследования не только открывшие важную роль микроРНК в процессах формирования ДП, но и определившие механизмы вовлечения микроРНК в пластические перестройки. Многие годы мы также интенсивно работаем в этой области используя в качестве модели обучения выработку условного рефлекса пищевой аверзии у моллюска *Helix*. Нами было показано, что в формировании рефлекса важную роль играет ацетилирование и метилирование гистонов, а их дисфункция лежит в основе нарушения ДП у этого животного. В регуляцию модификации гистонов вовлекаются как активаторные, так и ингибиторные пути, незрелость которых связана с незрелостью успешного формирования долговременных форм данного рефлекса. Кроме того, для формирования ДП *Helix* критично и нарушение экспрессии miRNA. Совместно с сотрудниками СО РАН, был обнаружен целый ряд микроРНК дифференциально экспрессирующихся на разных сроках обучения. В связи с появлением CRISPR/Cas технологий предполагается перспективным использование моллюсков для изучения процессов онтогенеза ЦНС, механизмов закладки функциональной асимметрии и влияния среды на адаптационные процессы. Более того, развитие CRISPR/Cas технологий, направленных на редактирование эпигенома, позволяет ожидать новых открытий как в области механизмов формирования ДП, так и лечения заболеваний, связанных с когнитивными нарушениями. Эти перспективы также будут обсуждены в докладе.

Работа поддержана Программой фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013-2022 годы (ГП-14, раздел 63).

1. Гринкевич Л.Н. Роль микроРНК в обучении и долговременной памяти // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2020, т. 24, № 8, с. 885-896, doi 10.18699/VJ20.687.

2. Гринкевич Л.Н. Редактирование генома и регуляция экспрессии генов с помощью технологий CRISPR/CAS в нейробиологии // Успехи физиологических наук, 2021, т. 52, № 3, с. 1-21, doi: 10.31857/S0301179821030024.

**СОКРАТИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ЛЕГОЧНОЙ
АРТЕРИИ КРЫСЫ В МОДЕЛИ ГИПООСМОТИЧЕСКОЙ СТРИКЦИИ: ВКЛАД ХЛОРИНОГО
ТРАНСПОРТА**

Swelling-Dependent Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Contraction: Role of Chlorine Transport

**Гусакова В.С., Смаглий Л.В., Голованов Е.А., Зайцева Т.Н., Гусакова С.В., Пшемьский М.А.,
Рашкаускайте В.А.**

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, РФ, *ryd4enkoviknoriya@mail.ru*

Поддержание нормального клеточного объема является важным аспектом функционирования клеток и тканей организма. При изменении объема клетки происходит нарушение архитектуры ткани и её физиологических функций. Чрезмерное набухание клеток может спровоцировать активацию процесса

запрограммированной гибели клеток. Показано, что изменение объема гладкомышечных клеток легочной артерии наблюдается в процессе развития легочной гипертензии, которая сопровождается набуханием гладкомышечных клеток. Одним из основных регуляторов клеточного объема является хлорная проводимость мембраны, которая также участвует в регуляции потенциала мембраны гладкомышечных клеток. Исследование взаимосвязи процессов регуляции сократительной активности и объема гладкомышечных клеток посредством изменения хлорной проводимости мембраны является важной задачей фундаментальной науки.

Сократительную активность гладкомышечных сегментов легочной артерии исследовали методом механографии с использованием четырехканальной механографической установки Myobath II (Германия). Для исследования использовали деэндотелизированные сегменты легочной артерии крыс линии Wistar. Исследование хлорной проводимости мембраны гладкомышечных клеток проводили с использованием неселективного блокатора хлорных переносчиков DIDS и селективный блокатор объем-чувствительных хлорных каналов мембраны DCPIB. Сокращения сосудистых сегментов при набухании гладкомышечных клеток добивались путем помещения сосудистых сегментов гипоосмотический раствор, содержащий сниженную концентрацию NaCl (гипоосмотически-индуцированное сокращение). Амплитуду сократительных ответов рассчитывали в процентах от амплитуды сокращения, вызванного гиперкалиевым раствором Кребса, величину которого принимали за 100%. Данные представлены в виде «Me (Q₂₅; Q₇₅)».

DIDS в концентрации 10 мкМ не оказывал значимого влияния на амплитуду гипоосмотически индуцированного сокращения. В концентрации 100 мкМ значимое снижение амплитуды и времени развития гипоосмотически-индуцированного сокращения наблюдается только при 30-минутной предобработке. Длительность транзиторной реакции в остальных случаях достоверно не изменялась (табл. 1). Селективный блокатор объем-зависимых хлорных каналов DCPIB приводил к снижению амплитуды гипоосмотически-индуцированной сократительной реакции гладкомышечных сегментов легочной артерии крысы независимо от концентрации и времени предобработки. Время транзиторной реакции достоверно не изменялось (табл. 2).

Таблица 1. Сократительная активность гладкомышечных сегментов легочной артерии крысы, индуцированная гипоосмотическим раствором, на фоне блокаторов хлорной проводимости мембраны

| Тестируемые растворы | | Время предобработки, мин. | |
|----------------------|-----|--|--|
| | | 15 | 30 |
| | | Амплитуда сокращения, %/ Длительность транзиторной реакции, мин | |
| Контроль, 40 мМ NaCl | | 70,81 (60,83; 83,08)/ 35,0 (30,0; 39,0) | 70,81 (60,83; 83,08)/ 35,0 (30,0; 39,0) |
| +DIDS, мкМ | 10 | 75,0 (69,9; 83,6) | 70,6 (69,0; 72,6) |
| | 100 | 67,6 (65,9; 73,1) | 50,6 (48,4; 52,8)* |
| + DCPIB, мкМ | 10 | 45,5 (45,0; 46,3)* | 56,1 (46,6; 61,1)* |
| | 100 | 42,4 (33,3; 45,6)* | 37,7 (27,1; 37,8) * |

Примечание: * – значимые отличия от гипоосмотически-индуцированного сокращения в контроле ($p < 0,05$, $n=6$); % – от гиперкалиевого сокращения (15 мМ KCl, 100%).

В результате проведенных исследований было выявлено, что более выраженным релаксирующим эффектом на гипоосмотически-индуцированное сокращение обладает селективный блокатор объем-зависимых хлорных каналов DCPIB. На основе полученных данных можно предположить, что в обеспечение сократительной активности гладкомышечных клеток легочной артерии крысы в модели гипоосмотического набухания клеток большой вклад вносит хлорный транспорт через объем зависимый хлорный канал.

МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫЙ АНТИОКСИДАНТ SKQ1 РЕГУЛИРУЕТ СИГНАЛЬНУЮ СИСТЕМУ KEAP1/NRF2/ARE И АПОПТОЗ В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 Regulates of Signal System KEAP1/Nrf2/ARE and Apoptosis in the Leukocytes of Blood Under Oxidative Stress

Гуценко О.И., Корниенко И.В., Ананян А.А., Милютин Н.П., Внуков В.В.

Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И.Ивановского, РФ,
natmilut@rambler.ru

Окислительный стресс способствует нарушению редокс-гомеостаза и приводит к свободно-радикальному повреждению разнообразных клеточных компонентов, что сопровождает развитие многих заболеваний и старения, а также участвует в развитии программируемой клеточной гибели [1]. В последнее время установлено,

что чувствительным сенсором и регулятором окислительного стресса является сигнальный путь Keap1/Nrf2/ARE, который вовлечен в молекулярные механизмы многих патологических процессов [2].

Цель работы – исследование влияния митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 – катионного производного пластохинона – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфония – на уровень экспрессии гена фактора транскрипции *Nrf2*, *Nrf2*-зависимых генов антиоксидантных ферментов, активность ферментов, кодируемых исследуемыми генами, а также интенсивность апоптоза в лейкоцитах периферической крови крыс при окислительном стрессе, индуцированном гипербарооксигенацией (ГБО).

В результате проведенного исследования установлено, что введение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение пяти дней приводит к значительному повышению уровня мРНК гена фактора транскрипции *Nrf2* и *Nrf2*-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов *SOD1*, *SOD2*, *CAT* и *Gpx4* в лейкоцитах периферической крови крыс. Повышение уровня экспрессии исследованных генов антиоксидантных ферментов в условиях физиологической нормы при введении SkQ1 сопровождается возрастанием в лейкоцитах активности каталазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Полученные результаты показывают, что антиоксидантное действие SkQ1 в лейкоцитах может быть связано с влиянием на сигнальную систему *Nrf2/ARE*.

Установлено, что при окислительном стрессе, вызванном ГБО (0,5 МПа, 90 мин), наблюдается снижение уровня мРНК фактора транскрипции *Nrf2* и *Nrf2*-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *CAT*, *Gpx4*) в лейкоцитах периферической крови крыс. Изменение профиля экспрессии исследованных генов при гипероксии сопровождается дисбалансом активности антиоксидантных ферментов в лейкоцитах – активацией супероксиддисмутазы, ингибированием каталазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Введение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение 5 дней приводит к повышению уровня мРНК фактора транскрипции *Nrf2* и *Nrf2*-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов *SOD2* и *Gpx4*, нормализации транскрипционной активности генов *SOD1* и *CAT* в лейкоцитах при ГБО-индуцированном окислительном стрессе. Одновременно в лейкоцитах наблюдалось увеличение активности каталазы и глутатионпероксидазы на фоне возвращения к контрольному уровню активности супероксиддисмутазы и глутатион-S-трансферазы. Предполагается, что протекторный эффект SkQ1 в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса может реализоваться посредством прямого антиоксидантного действия и путем стимуляции защитной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE.

Исследование уровня апоптоза лимфоцитов методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием FITC-меченого аннексина V и пропидиум йодида показало более чем двукратное усиление экспрессии фосфатидилсерина во внешнем монослое лимфоцитарных мембран при ГБО, что свидетельствует о резком увеличении количества клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза. Применение SkQ1 в крайне малых концентрациях (50 нмоль/кг в течение 5 дней) эффективно ингибирует накопление молекулярных продуктов ПОЛ, нормализует структурное состояние мембран лимфоцитов и уровень их апоптоза в условиях физиологической нормы и при окислительном стрессе.

Предварительное применение катионного производного пластохинона SkQ1 в течение 5 дней перед действием ГБО способствует нормализации количества апоптотических лимфоцитов в крови при окислительном стрессе. Можно полагать, что важнейшей причиной нормализующего влияния SkQ1 на интенсивность апоптоза лимфоцитов крови при ГБО-индуцирующем окислительном стрессе является активация транскрипционной активности гена *Nrf2* и *Nrf2*-контролируемых генов антиоксидантных ферментов.

Таким образом, защитный эффект SkQ1 в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса может реализоваться посредством прямого антиоксидантного действия, а также путем стимуляции редокс-зависимой сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE и активации антиапоптотических механизмов.

1. Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species // *Biochim. et Biophys. Acta*, 2016, vol. 1863, no. 9, doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.

2. Suzuki T., Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system // *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, vol. 88, no. 6, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.

ПРИСОЕДИНЕНИЕ БЕНЗОАТНОЙ ГРУППЫ К ТЕМПО ОБЕСПЕЧИВАЕТ УЛУЧШЕННУЮ ДИСКРИМИНАЦИЮ ЛИПОСОМ ИЗГОТОВЛЕННЫХ ИЗ НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА

Benzoate Group Attachment to Tempo Provides Enhanced Discrimination of Liposomes Fabricated Using Human Lung Normal and Carcinoma Cells

Oktay K. Gasymov¹, Matanat Bakhishova¹, Ramiye B. Gasanova¹, Rasim B. Aslanov¹, Leylaxanum Melikova^{1,2}, Jamil A. Aliyev²

¹ Institute of Biophysics of Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, Azerbaijan, *ogassymo@ucla.edu*, *oktaygasimov@gmail.com*

² National Center of Oncology, Azerbaijan Republic Ministry of Health, H. Zardabi, Baku, Azerbaijan

It is well accepted that the lipid compositions of the plasma membranes of the healthy and cancer cells significantly differ from each other. During the cancer progression, cancer cells change the lipid constituent of the membranes resulting in the loss of lipid asymmetry between the membrane leaflets. Consequently, physicochemical properties of the cell membranes are also changed in response to altered lipid organization. The membranes of the various cells composed of dissimilar lipid compositions are adopted to modulate functions of particular cell types [1–3].

Partitioning of the spin probe 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) into the membranes of the cells has widely been applied to characterize membrane properties of various cells in health and disease conditions. TEMPO partitioning experiments into the membranes show a higher partition coefficient for the membranes of human carcinoma cells compared to that of healthy cells (unpublished data). In this work, to identify the role of lipid compositions, we used liposomes fabricated from the lipids extracted using normal and carcinoma cells.

EPR spectral measurements of both TEMPO and TEMPO-benzoate (in which the benzoate group is attached to the TEMPO) incubated in the solutions of liposomes fabricated from the lipids extracted from lung carcinoma and healthy cells were used to calculate partition coefficients (K). EPR measurements were performed using a Bruker ELEXSYS E580 spectrometer at X-band frequency with a variable temperature accessory.

The EPR spectra were analyzed using the LabVIEW program developed by Christian Altenbach (<https://sites.google.com/site/altenbach/>) using the spectral simulation code written in FORTRAN [4]. The resolved EPR components were used to calculate a partition coefficient (K):

$$K = I_{lip} / (I_{lip} + I_{aq}).$$

I_{lip} and I_{aq} are double integrals of EPR components of TEMPO or TEMPO-benzoate localized in liposome and aqueous environments, respectively. The free energy required to transfer spin probes from an aqueous to a liposome environment was calculated using the partition coefficients determined at various temperatures

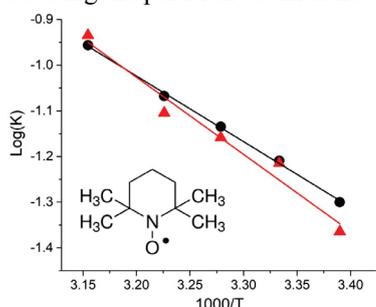


Figure 1. Arrhenius plots for the TEMPO partitioning coefficients obtained for the liposomes constructed from the lipids extracted using the healthy (black circles) and carcinoma (red circles) cells of the human lung tissue. Experiments were conducted at pH 7.3

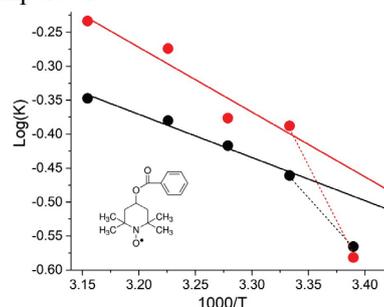


Figure 2. Arrhenius plots the TEMPO-benzoate partitioning coefficients obtained for the liposomes constructed from the lipids extracted using the healthy (black circles) and carcinoma (red circles) cells of the human lung tissue

The Arrhenius plots for the partition coefficients of spin probes in the solutions of liposomes fabricated from the extracted lipids using cancer and normal cells are shown in Figures 1 and 2. The K values of TEMPO for the liposomes of cancer and healthy cells are 7.7 ± 0.6 kcal/mol and 6.6 ± 0.6 kcal/mol, respectively. Data indicate that TEMPO partitioning is similar to the liposomes fabricated using both cancer and healthy cells. The same values of TEMPO-benzoate for the liposomes of cancer and healthy cells are 4.5 ± 0.7 kcal/mol and 2.9 ± 0.7 kcal/mol, respectively. In contrast to TEMPO, TEMPO-benzoate partitioning to the liposomes from cancer and healthy are significantly different. Thus, TEMPO-benzoate as a probe is more suitable than TEMPO to discriminate cancer cells from healthy cells. This study provides a rationale for using a benzoate group attachment to modify current drugs to deliver them to the cancer cells more efficiently.

1. Casares D., Escrivá P.V., Rosselló C.A. // *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 9, p. 2167.
2. Stieger B., Stieger J., Locher K.P. // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, 2021, vol. 1867, no. 5, p. 166079.

3. Lorent J.H., Levental K.R., Ganesan L., Rivera-Longsworth G., Sezgin E., Doktorova M., Lyman E., Levental I. // Nat. Chem. Biol., 2020, vol. 16, no. 6, pp. 644-652.
4. Budil D.E., Sanghyuk L., Saxena S., Freed J.H. // J. Magn. Reson., Ser. A, 1996, vol. 120, no. 2, pp. 155-189.

**АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА ГРАНУЛОЦИТОВ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ,
УСТОЙЧИВЫХ К ОЖИРЕНИЮ, ПРИ ОСТРОМ ВОСПАЛЕНИИ**
Adhesive Properties of Bone Marrow Granulocytes of Obesity-Resistant Mice under Acute Inflammation

Дюкина А.Р., Тихонова И.В., Сафронова В.Г.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ПНЦБИ РАН, г. Пущино, РФ,
dyukina@rambler.ru

Ожирение как следствие переизбытка и/или гиподинамии сопровождается хроническим воспалением, при котором воспалительные клетки, такие как полиморфноядерные гранулоциты (нейтрофилы) проникают в ткани, в том числе жировые, и накапливаются в них, что усиливает воспалительный процесс [1]. Первым этапом выхода нейтрофилов из кровеносного русла в ткани является их адгезия на клетках эндотелия сосудов. Обнаружено изменение функциональной активности нейтрофилов, включая адгезивность, при ожирении. Однако остается открытым вопрос о функциональных свойствах нейтрофилов при устойчивости организма к ожирению, которая обнаруживается у некоторых организмов в условиях, способствующих ожирению. Цель работы – исследовать адгезивные свойства гранулоцитов костного мозга у мышей, устойчивых к ожирению, оценить влияние острого воспаления на адгезию и регуляторную роль митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) в этом процессе.

Работа проведена на самцах мышей линии C57BL/6j, содержащихся 26 недель в барьерных условиях на высокожировой или стандартной диете. Животные контрольной группы получали стандартный корм для лабораторных животных: SNIFF R1/M-H V1534-30, калорийность 306 ккал/100 г. Высокожировая диета включала стандартный корм с добавлением топленого свиного сала; калорийность 516 ккал/100 г. Были исследованы мыши, устойчивые к ожирению, т.е. мыши, получавшие высокожировую диету, но длина и масса их тела не отличались от параметров контрольных животных. В каждой группе были сформированы 2 подгруппы: мыши с острым воспалением (суспензия зимозана, 5 мг/мл в растворе Хенкса, 150 мкл, в/б, 12 ч) и мыши без воспаления (150 мкл раствора Хенкса, в/б, 12 ч). Гранулоциты изолировали из костного мозга методом центрифугирования в градиенте плотности перколла [3]. Пробы интактных и активированных клеток готовили в 96-луночном планшете с покрытием для адгезионных культур. Клетки до прикрепления активировали хемоаттрактантами 1 мкМ N-formyl-MLF (fMLF) или 1 мкМ WKYMVM, которые являются пептидными агонистами высоко- и низкоаффинных рецепторов формилпептидов, соответственно. Роль митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) в адгезии определяли по действию ингибиторов: 10 мкМ SB202190 (p38МАРК), 10 мкМ FR180204 (ERK1/2), 10 мкМ SP600125 (JNK). Количество прикрепившихся клеток оценивали по оптической плотности (ОП) раствора, полученного после окрашивания и лизиса клеток, измеряемой с помощью фотометра Infinity F50 (Tecan, Austria). Эффект агонистов и ингибиторов рассчитывали, как отношение ОП, полученной от клеток, обработанных агентом, к параметру интактных клеток, принятому за 100%.

Способность к прикреплению интактных гранулоцитов не различалась между группами. Локальное воспаление не изменяло адгезию интактных клеток как контрольных, так и мышей, устойчивых к ожирению. fMLF усиливал адгезию гранулоцитов во всех группах, однако его эффект был ниже у мышей, устойчивых к ожирению, чем в контроле. У животных с воспалением в обеих группах эффект был ниже, чем у мышей без воспаления. WKYMVM усиливал адгезию клеток контрольных и устойчивых к ожирению мышей, а локальное воспаление не влияло на данный параметр относительно соответствующих параметров интактных клеток у всех мышей. Ингибиторный анализ показал, что SB202190, FR180204 и SP600125 сами по себе и при совместном действии с хемоаттрактантами значительно усиливали адгезию гранулоцитов в контроле. У мышей, устойчивых к воспалению, адгезия была достоверно ниже при действии ингибиторов p38МАРК и JNK как одних, так и вместе с fMLF, и не менялась при действии ингибитора ERK1/2 по сравнению с контролем. При локальном воспалении адгезия была ниже при действии всех ингибиторов и при их совместном действии с fMLF относительно соответствующих групп мышей без воспаления. Совместное действие FR180204 или SP600125 и WKYMVM усиливало адгезию во всех группах относительно параметров интактных клеток. При действии WKYMVM на фоне SB202190 адгезия гранулоцитов на изменялась в группах мышей с воспалением, тогда как у мышей без воспаления данный параметр был выше, чем у соответствующих интактных клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что острое воспаление приводит к ослаблению адгезии при действии формилированного пептида и его аналога. Острое воспаление приводило к снижению адгезии клеток контрольных животных, тогда как практически не изменяло адгезивные свойства клеток устойчивых к ожирению мышей, что может свидетельствовать об измененном функциональном состоянии нейтрофилов, связанном, вероятно, с наличием хронического воспаления. МАРК вовлечены в регуляцию адгезивных свойств гранулоцитов с значительно более высоким вкладом p38МАРК и JNK в регуляцию адгезии клеток животных с воспалением.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант №22-15-00215).

1. Suzuki K. Chronic Inflammation as an Immunological Abnormality and Effectiveness of Exercise // *Biomolecules*, 2019, vol. 9, no. 6, p. 223, doi: 10.3390/biom9060223.
2. Safronova V.G., Vulfius C.A., Astathev M.E., Tikhonova I.V., Serov D.A., Jirova E.A., Pershina E.V., Senko D.A., Zhmak M.N., Kasheverov I.E., Tsetlin V.I. $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors regulate murine bone marrow granulocyte functions // *Immunobiology*, 2021, vol. 226, no. 1, p. 152047, doi: 10.1016/j.imbio.2020.152047.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА МЫШАХ *IN VIVO* НА МОЛЕКУЛЯРНОМ, КЛЕТОЧНОМ И ОРГАНИЗМЕННОМ УРОВНЯХ

Investigation of the Action of Low-Intensity Femtosecond Laser Radiation on Mice *in vivo* at the Molecular, Cellular and Organismal Levels

Дюкина А.Р.¹, Заичкина С.И.¹, Поцелуева М.М.¹, Ларюшкин Д.П.¹, Минаев Н.В.², Юсупов В.И.²

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино, РФ, dyukina@rambler.ru

² Институт фотонных технологий ФНИЦ Кристаллография и фотоника РАН, г. Москва, г. Троицк, РФ

Одним из ведущих направлений биомедицинских исследований является использование в диагностике и лечении новых лазерных технологий. В настоящее время фемтосекундные (ФС) лазеры являются наиболее перспективными в таких областях как физика, биология, медицина и другие прикладные сферы. Характерными чертами ФС лазеров является малая длительность и высокая средняя интенсивность импульса. Имеющиеся в литературе результаты по исследованию биологических реакций и их последствий у животных, облучённых ФС лазерным излучением трудно сопоставимы между собой в связи с использованием разных объектов, мощностей и доз облучения, а также особенностей самих источников излучения. Поэтому понимание закономерностей действия ФС лазера на живые системы и необходимых условий для их медицинской адаптации является крайне важным.

Целью настоящей работы было оценить действие гипермалых доз неионизирующего низкоинтенсивного импульсного ФС лазерного излучения (длина волны 525 нм, длительность импульса 200 фс) на реакции цельной крови и кроветворных органов мышей в качестве фактора активации естественной защиты с помощью теста радиационный «адаптивный ответ».

Эксперименты проводили на двухмесячных самцах мышей линии SHK. Животных облучали в область носа ФС лазером (АВЕСТА, РФ) (525 нм, 200 фс, 70 МГц) при мощностях 0,05, 0,5 и 5 мВт, и экспозиции от 1 до 50 с, что соответствует дозам излучения 0,1–52 мДж/см². В качестве положительных контролей животные были облучены непрерывным He-Ne лазерным излучением (632,8 нм, 0,7 мВт, 0,16 мВт/см²) в течение 5 и 100 с (2 и 40 мДж/см²) и рентгеновским излучением в дозе 0,1 Гр (4 мДж/см²). Через сутки все группы животных дополнительно облучали рентгеновским излучением в дозе 1,5 Гр (60 мДж/см²) по отработанной ранее нами схеме (0,1 Гр + 1,5 Гр). На каждую экспериментальную точку использовали не менее 5 мышей. С помощью стандартных методик был определен уровень продукции АФК в цельной крови методом люминол-зависимой мимозан-индуцированной хемилюминесценции (СHEMILUM-12, Россия), индекс массы тимуса и селезенки и уровень цитогенетических повреждений в костном мозге с помощью микроядерного теста.

Обнаружено, что при всех исследованных дозах уровни цитогенетических повреждений в кроветворных органах и продукции АФК в цельной крови не отличаются от спонтанного фона. Предварительная обработка животных ФС лазером в дозах 3 мДж/см² (0,05 мВт), 10,4 и 31 мДж/см² (0,5 мВт) и 10 мДж/см² (5 мВт) и последующим воздействием рентгеновского излучения в дозе 1,5 Гр приводила к индукции адаптивного ответа по микроядерному тесту в клетках костного мозга и уровню продукции АФК в цельной крови, как и в случае положительных контролей. Другие дозы ФС лазера не индуцировали защитный эффект. Предобработка мышей всеми дозами ФС лазера не защищала тимус и селезенку от уменьшения клеточности, в отличие от He-Ne лазерного и рентгеновского излучений в дозах 2 и 4 мДж/см², соответственно. Таким образом, при воздействии на мышей неионизирующими импульсным ФС и непрерывным He-Ne лазерами и ионизирующим рентгеновским излучением наблюдается активация естественной защиты организма по тесту «адаптивный ответ» в одном и том же диапазоне доз, что позволяет предположить схожий механизм её индукции.

Полученные данные могут быть использованы для стандартизации применения малых доз ФС лазеров в медицине и дают возможность применения предложенного метода в качестве тест системы при анализе различных физических и химических факторов для активации естественной защиты организма.

**КОНТРОЛЬ ПАРАМЕТРОВ ТЕМПЕРАТУРНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ В ПРЕДПЛЕЧЬЕ
ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПРОЦЕДУРЕ УВЧ-ГИПЕРТЕРМИИ МЕТОДАМИ ПАССИВНОЙ
АКУСТИЧЕСКОЙ ТЕРМОМЕТРИИ И ИНФРАКРАСНОЙ ТЕРМОГРАФИИ**
**Control of Temperature Distribution Parameters in Human Forearm During UHF Hyperthermia by Passive
Acoustic Thermometry and Infrared Thermography**

Ерофеев А.В.^{1,2}, Грановский Н.В.¹, Селиванова П.И.¹, Шугаева А.И.¹, Шаракшанэ А.С.^{1,2},
Щербаков М.И.², Мансфельд А.Д.³, Аносов А.А.^{1,2}

¹ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет),
erofeev_a_v@staff.sechenov.ru, granovsky_nikita@mail.ru, selivanova.polya2010@yandex.ru, goldsib59@mail.ru,
sharakshane_a_s_1@staff.sechenov.ru, anosov_a_a@staff.sechenov.ru

² ИРЭ им. В.А.Котельникова РАН, *info@irtis.ru*

³ ИПФ РАН, г. Нижний Новгород, РФ, *mansfeld@appl.sci-nnov.ru*

Цель исследования. Измерение глубинной температуры тела человека при УВЧ-гипертермии в различных физиотерапевтических дозах.

Нагрев электромагнитным полем частотой $40.68 \text{ МГц} \pm 2\%$ и мощностью $30 \pm 6 \text{ Вт}$ проводился генератором УВЧ-30М (Завод электро медицинской аппаратуры «Эма», Москва, Россия) в физиотерапевтических дозах 10, 15 и 20 минут. Тепловое акустическое излучение измерялось многоканальным акустотермографом, разработанным в ИПФ РАН (полоса пропускания 1,6-2,5 МГц, пороговая чувствительность при времени интегрирования 10 с – 0,2 К). Принимаемые акустические сигналы преобразовывались в электрические, которые усиливались, проходили через квадратичный детектор и усреднялись в течение 30 мс. С выходов многоканального акустотермографа сигналы подавались на 14-ти разрядный многоканальный АЦП E14-140 (ЗАО «L-Card», Москва, Россия) с частотой дискретизации 1 кГц на один канал. Разработанная программа проводила дальнейшее усреднение данных. Для измерения поверхностной температуры использовался портативный компьютерный термограф ИРТИС-2000 (ООО "Иртис", Москва, Россия) с чувствительностью к перепаду температур (на уровне 30°C) 0,05 К, регистрировавший тепловое электромагнитное излучение в инфракрасном (ИК) диапазоне 3-5 мкм.

В работе проводили УВЧ-нагрев предплечья человека и модельных объектов из пластизоля с имитацией кровотока при различных физиотерапевтических дозах. Получены данные о закономерностях распределения тепла в предплечье человека и в фантоме из пластизоля. Данные объективного контроля глубинной и поверхностной температур модельных объектов, полученные методами пассивной акустической термометрии и инфракрасной термографии, хорошо согласуются, что позволило точнее определять параметры ослабления теплового излучения в биологической и модельной средах и повысить точность определения глубинных температур на модельных и биологических объектах. Результаты исследования позволяют предположить, что максимальный нагрев кожи верхней трети предплечья может быть при физиотерапевтических дозах УВЧ-нагрева 15-20 минут. Однако, более достоверный ответ дадут более обширные дальнейшие исследования.

Разработанная методика позволяет объективно оценить параметры температурного распределения в мягких тканях тела человека при гипертермии. Подобные эксперименты могут представлять научный интерес для разработки бесконтактных методик диагностики и лечения на основе гипертермии.

**ВЛИЯНИЕ КВЧ-ТЕРАПИИ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ И
ПУЛЬСА ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 ПОСЛЕ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ**
**EHF Therapy Effect on the Recovery of Blood Pressure and Pulse After Physical Activity of Those Who Have
Recovered from COVID-19**

Каштанова Н.М., Животова Е.Н., Сучкова Г.Г., Дружинин Г.А., Оранская Т.И.
Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, РФ, *elzhivotova@gmail.com*

Целью работы является изучение возможного облегчающего действия КВЧ-терапии при восстановлении после физической нагрузки переболевших COVID-19.

Исследования проводились на студентах-добровольцах 1-го и 2-го курса Казанского государственного медицинского университета. Были образованы контрольные группы девушек и юношей, а также группы переболевших COVID-19 (юноши и девушки). В каждой из 4-х групп было по 11 человек 18-20 лет. С каждым испытуемым проводили всю серию экспериментов в один день; общее время проведения экспериментов занимало меньше одного часа.

Использовался генератор миллиметровых волн Явь-1. Производилась обработка КВЧ-излучением точки на переднемедиальной (внутреннелоктевой) стороне предплечья.

При проведении исследования вначале измерялись с помощью стандартного тонометра артериальное давление и частота сердечных сокращений испытуемого до (контроль) и после 20 приседаний. После чего

подводили КВЧ-излучатель к указанной зоне предплечья, и проводили 3-минутную терапию. Далее вновь проводили измерение артериального давления и частоты сердечных сокращений испытуемого. Проводили и альтернативные серии, с измерением без КВЧ-обработки – только после трех минут ожидания после физической нагрузки. Сравнение средних значений выборок проводили на основании *t*-критерия Стьюдента.

Было выявлено, что у неболевших COVID-19 проведенная КВЧ-терапия достоверно не влияла на исследуемые параметры в группах юношей и девушек. У переболевших COVID-19 юношей наличествует тенденция к более раннему восстановлению после физической нагрузки при использовании КВЧ-терапии. КВЧ-терапия оказывала большее воздействие на девушек, переболевших COVID-19, чем на неболевших. При этом у данной группы испытуемых явно намечен вектор на более полное восстановление после физической нагрузки по всем исследуемым показателям (табл. 1). Однако, достоверно ($p < 0,05$) выравнилось только систолическое давление.

Таблица 1. Артериальное давление и пульс девушек, не болевших и болевших COVID-19

| | Систолическое давление | | | Диастолическое давление | | | Пульс | | |
|-------------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| | исходное | физическая нагрузка + отдых | физическая нагрузка + отдых + КВЧ | исходное | физическая нагрузка + отдых | физическая нагрузка + отдых + КВЧ | исходный | физическая нагрузка + отдых | физическая нагрузка + отдых + КВЧ |
| Девушки, не болевшие COVID-19 | 110,18± ±7,90 | 113,73± ±3,09 | 107,13± ±3,05 | 71,64± ±3,60 | 76,73± ±5,09 | 72,55±3,56 | 78,18± ±3,76 | 91,64± ±9,10 | 88,45± ±6,71 |
| Девушки, болевшие COVID-19 | 103,73± ±6,51 | 121,45± ±3,97 | 111,73± ±5,70 | 69,64± ±3,21 | 76,27± ±4,20 | 72,73± ±2,98 | 79,45± ±4,99 | 99,55± ±8,55 | 93,00± ±7,95 |

Таким образом, выявлено стабилизирующее действие КВЧ-терапии на значение систолического давления у переболевших COVID-19 девушек.

ДЕЙСТВИЕ КВЧ ИЗЛУЧЕНИЯ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 5,6 ММ НА БИООБЪЕКТЫ *IN VITRO* И *IN VIVO*

The Effect of ENF Radiation with a Wavelength of 5.6 mm on Biological Objects *in vitro* and *in vivo*

Жорина Л.В., Матвеев И.Д., Анисеев В.Н.

Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана (национальный исследовательский университет), г. Москва, РФ, larisa7777@li.ru

Терапевтическое воздействие КВЧ излучения с длиной волны 5,6 мм известно в физиотерапии более полувека. Оно оказывает выраженное обезболивающее, спазмолитическое, иммуномодулирующее действие, широко применяется в разных областях медицины: гастроэнтерологии, урологии, гинекологии, пульмонологии, оториноларингологии, проктологии, кардиологии, хирургии, стоматологии, дерматологии, педиатрии, косметологии, ангиологии и др. Однако причина такого лечебного действия до сих пор точно не установлена. В этой работе мы провели исследования на основе предположений других авторов. Источником КВЧ излучения служил прибор КВЧ-НД2, плотность мощности излучения на расстоянии 18 мм, измеренная прибором Narda NBM-550, составила 130 мкВт/см². Длина волны излучения 5,6 мм.

В работах [1, 2] установлено тушение синглетного кислорода при воздействии КВЧ излучения на частоте 41,95 ГГц (длина волны 7,15 мм) плотностью мощности 50 мкВт/см² и диапазоне частот 53,57...78,33 ГГц (диапазон длин волн 5,6...3,8 мм) мощностью 0,2...1,5 мкВт. В методе фотодинамического воздействия одним из результатов передачи энергии, поглощённой фотосенсибилизатором (ФС), является производство синглетного кислорода, в результате чего и происходит гибель клеток, накопивших ФС. Поставленный опыт имел следующую схему. Суспензия эритроцитов в физрастворе (0,9% NaCl) была инкубирована в течение получаса с ФС Радахлорин, а затем одновременно облучалась КВЧ и светодиодным матричным облучателем (максимум излучения на 652 нм, интенсивность 3,5 мВт/см²). На выходе из суспензии эритроцитов плотность мощности КВЧ излучения составила 30 мкВт/см². Обнаружено, что доза начала фотодинамического эффекта (ФДЭ) при облучении только матричным облучателем (4,04 ± 0,23 Дж) и одновременно и матричным облучателем и КВЧ облучателем (3,81 ± 0,31 Дж) совпадают в пределах погрешности измерения. Такой результат может быть вызван

недостаточностью количества потушенного синглетного кислорода. В данном эксперименте на дозу начала ФДЭ не повлияло ни снижение жёсткости мембран, ни повышение прочности эритроцитов при воздействии КВЧ излучения [3].

Терапевтическое действие КВЧ излучения объясняют также расширением мелких сосудов кожи при КВЧ воздействии [3]. Показано, что изменение температуры поверхностью кожи человека, измеренное с помощью термографии, однозначно коррелирует с уровнем микроциркуляции в коже. Нами проведено наблюдение за изменением температуры ладоней правой и левой руки с помощью термографа при воздействии КВЧ излучением на акупунктурную точку ТВ5 (Вай Гуан) на тыльной стороне правого предплечья. В эксперименте принимало участие 12 человек обоих полов от 20 до 70 лет. Наблюдение проводилось в течение 35 минут, 15 из которых проводилось облучение. Обнаружено, что изменение температуры происходило синхронно на обеих ладонях, что говорит о наличии системного эффекта. Повышение средней по площади температуры ладони, соответствующее росту уровня микроциркуляции, наблюдалось только в 41,7% случаев. На обеих ладонях к 35 минуте наблюдения (20й минуте после окончания воздействия) оно составило около 1,5 К. Рост температуры на 1 К к 5 минуте после начала облучения, а затем постепенное падение до уровня на 0,4 К ниже первоначального значения к 35 минуте наблюдались в 16,7% случаев. Вероятно, при воздействии КВЧ излучения возможна активация некоторых веществ, которые заставляют гипоталамус поднимать температуру тела. Подъём температуры на 1 градус в несколько раз активизирует иммунную систему, что, по-видимому, и приводит к лечебному действию КВЧ излучения. Вместе с тем обнаружено понижение температуры ладоней на 3,5 К к 35 минуте наблюдения в 16,7% случаев. Колебания температуры около начального уровня наблюдалось в 25% случаев. Такой результат наблюдений говорит о том, что действие КВЧ излучения на длине волны 5,6 мм существенно зависит от индивидуума и не имеет однозначного характера.

1. Gapeyev A.B., Yakushina V.S., Chemeris N.K., Fesenko E.E. Modification of production of reactive oxygen species in mouse peritoneal neutrophils on exposure to low-intensity modulated millimeter wave radiation // *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1998, vol. 46, pp. 267-272.

2. Овощникова Л.В., Корягин А.С., Елисева А.А. Влияние КВЧ-излучения на систему крови и перекисное окисление липидов при экспериментальной лучевой болезни // *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*. Серия: Биология, 2001, № 2, с. 31-36.

3. Чуян Е.Н., Трибрат Н.С. Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты на процессы микроциркуляции // *Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского*. Серия: Биология, химия, 2008, т. 21 (60), № 1, с. 156-166.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФОСФАТИДНОЙ КИСЛОТЫ НА ТЕМПЕРАТУРУ КОНФОРМАЦИОННОГО ПЕРЕХОДА КОМПЛЕКСОВ [ЦИТОХРОМ С+ ФОСФОЛИПИДЫ] Investigation of the Effect of Phosphatidic Acid on the Temperature of the Conformational Transition of Complexes [Cytochrome C + Phospholipids]

Журавлева Э.Р., Степанов Г.О., Осипов А.Н.

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
г. Москва, РФ, evel99@mail.ru

Изучение молекулярных и клеточных механизмов апоптотических процессов является одной из наиболее актуальных проблем современной медицинской науки. Актуальность проблемы определяется связью с развитием многих заболеваний, в том числе онкологических, нарушений развития и пр. Так, одним из путей инициации апоптоза является митохондриальный механизм [1], который характеризуется увеличением пероксидазной активности цитохрома С, причем величина пероксидазной активности существенно зависит от структуры фосфолипида и от температуры. Однако данному событию предшествует взаимодействие цитохрома С с анионными фосфолипидами митохондриальных мембран [2]. Данное взаимодействие приводит к конформационной перестройке активного центра цитохрома С, изменяя его структуру с нативной шестикоординационной на пятикоординационную, где железо гема открывается для взаимодействия с малыми лигандами, такими как пероксид водорода, оксид азота и др.

Целью данной работы было исследование зависимости изменения структуры комплексов цитохрома С с фосфатидной кислотой при нагревании, а также определение значений температур, при которых данный конформационный переход происходит в присутствии фосфатидной кислоты.

Исследование было проведено при помощи спектрофлуориметрии при значениях длины волны возбуждения и испускания 280 и 335 нм соответственно. Исследование было выполнено в диапазоне температур 25-90 °С с шагом 5 °С. Образцы содержали комплексы цитохрома С с фосфатидной кислотой или фосфатидилхолином.

Ранее при помощи хемилюминесценции было показано, что изменение пероксидазной активности цитохрома С происходит наиболее выражено при добавлении фосфатидной кислоты. В присутствии фосфатидной кислоты значительно изменялась форма кинетической кривой, показывая резкое увеличение интенсивности. А при исследовании зависимости флуоресценции от температуры для аналогичных комплексов

цитохрома С с фосфолипидами показано, что температура конформационного перехода для комплексов [цитохром С+ фосфатидилхолин] и [цитохром С+ фосфатидная кислота] составляла 72°С и 80°С соответственно.

Полученные результаты подтверждают ранее исследованные функциональные изменения цитохрома С и способность фосфатидной кислоты оказывать на них влияние. Можно предположить, что эти отличия связаны с тем фактом, что конформационные переходы для комплексов [цитохром С + фосфатидилхолин] и [цитохром С + фосфатидная кислота] происходят при разных температурах.

1. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death // *Toxicol Pathol.*, 2007, vol. 35, no. 4, pp. 495-516, doi: 10.1080/01926230701320337.

2. Kagan V.E., Tyurina Y.Y., Vlasova I.I. et al. Redox Epiphospholipidome in Programmed Cell Death Signaling: Catalytic Mechanisms and Regulation // *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, vol. 11, p. 628079, doi: 10.3389/fendo.2020.628079.

АВИДНОСТЬ IgG К SARS-CoV-2 У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН КОРРЕЛИРУЕТ С УРОВНЕМ АНТИТЕЛ В КРОВИ И НЕ ЗАВИСИТ ОТ ДАВНОСТИ ПЕРЕНЕСЁННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ COVID-19

Avidity of IgG to SARS-CoV-2 in Pregnant women Correlates with the Antibodies Level in Blood and does not Depend on the Recency of COVID-19 Diagnosed

Иванов А.В.^{1,2,3}, Уварова М.А.³, Семенова Е.В.⁴

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, РФ, *gostyatin@gmail.com*

² Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург, РФ

³ Северо-Западный центр доказательной медицины, г. Санкт-Петербург, РФ

⁴ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт», г. Гатчина, Ленинградская обл., РФ

Одной из наиболее уязвимых групп населения перед глобальной пандемией COVID-19 оказались беременные женщины. В силу присущей беременности иммуносупрессии, особенно по Т-клеточному звену, защита организма беременных значительно ослаблена и переведена на путь усиления роли врождённого иммунитета. Подобное снижение активности адаптивного иммунитета, выраженное, в том числе, в снижении уровней антител к SARS-CoV-2 в крови, делает беременных женщин чрезвычайно уязвимыми к новой коронавирусной инфекции даже после вакцинации противокоронавирусными вакцинами. В таких условиях особое значение приобретает индекс авидности антител - показатель, определяющий прочность связи с вирусным антигеном [1]. В обычных условиях индекс авидности антител, в основном класса IgG, возрастает с течением времени с контакта с инфекционным агентом за счёт постоянного отбора клонов В-лимфоцитов, максимально адаптированных для связи со специфичным эпитопом-мишенью [2]. Для беременных подобные исследования ещё не проводились.

В настоящем исследовании приняли участие 23 женщины-роженицы, перенёвшие COVID-19 на различных сроках беременности. Контрольную группу составили 29 добровольцев. У всех участников диагноз COVID-19 был подтверждён методом RT-PCR, уровень антител класса IgG измерен методом ИХЛ на автоматическом анализаторе Architect Abbot и определён индекс авидности IgG методом ИФА. Проведён анализ корреляции индекса авидности IgG и уровня антител в крови, а также индекса авидности IgG и времени с момента установки диагноза.

В результате оказалось, что у беременных женщин индекс авидности анти-SARS-CoV-2 IgG не зависит от срока давности с момента подтверждённого заражения SARS-CoV-2. Положительная корреляция выявлена только между индексом авидности и уровнем IgG в крови. У небеременных представителей контрольной группы показатели иммунного ответа развивались по более классической схеме, когда уровень IgG растёт постепенно, а индекс авидности также растёт с течением времени. Усреднённые данные приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Усреднённые значения уровня IgG в крови, индекса авидности и времени с момента заражения новой коронавирусной инфекцией

| | Время с момента подтверждения диагноза COVID-19, месяцы | Уровень IgG в крови, AU/мл | Уровень IgG в крови, BAU/мл | Индекс авидности IgG, % |
|--------------------------|---|----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Беременные женщины, N=23 | 4,3±1,1 | 1214,5±1180,1 | 172,5±167,6 | 73,9±18,1 |
| Контрольная группа, N=29 | 7,3±2,8 | 1391,3±1722,7 | 197,5±244,6 | 79,7±13,8 |

Подводя итоги, можно предположить о более быстром созревании высокоавидных антител класса IgG у женщин, заразившихся SARS-CoV-2 в период беременности. Также полученные данные подтверждают отмеченное [3,4] необычное поведение динамики иммунного ответа после перенесённого COVID-19.

1. Bauer G. The potential significance of high avidity immunoglobulin G (IgG) for protective immunity towards SARS-CoV-2 // *Int J Infect Dis.*, 2021, vol. 106, pp. 61-64, doi: 10.1016/j.ijid.2021.01.061.

2. Löfström E., Eringfält A., Kötz A., Wickbom F., Tham J., Lingman M., Nygren J.M., Undén J. Dynamics of IgG-avidity and antibody levels after Covid-19 // *J Clin Virol.*, 2021, vol. 144, p. 104986, doi: 10.1016/j.jcv.2021.104986.

3. Ivanov A., Semenova E. Long-term monitoring of the development and extinction of IgA and IgG responses to SARS-CoV-2 infection // *J Med Virol.*, 2021, vol. 93, no. 10, pp. 5953-5960, doi: 10.1002/jmv.27166.

4. Семенова Е.В., Павлюк В.В., Уварова М.А., Иванов А.В. Особенности гуморального иммунитета после перенесенного COVID-19 // *Медицинская иммунология*, 2022, т. 24, № 2, с. 337-350, doi: 10.15789/1563-0625-FOH-2452.

АКТИВАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ КЛЕТОК ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО СМЫВА В БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ Activation of Peritoneal Lavage Cells by Bacterial Lipopolysaccharide in a Bioelectrochemical Model

Игнатъева М.М., Новаковская М.В., Черенков И.А.

Удмуртский государственный университет, г. Ижевск, РФ, marina.ignateva.97@bk.ru

Липополисахарид (ЛПС) – универсальный фактор патогенеза воспаления. Обладает широким спектром биологической активности и взаимодействует со всеми клетками человека [1]. Многие клеточные популяции реагируют на присутствие ЛПС активацией окислительно-восстановительных процессов, которые можно оценить электрохимическими методами [2]. Интересно реализовать биоэлектрохимическую модель, включающую клетки, иммобилизованные в гидрогелевой среде, имитирующей межклеточный матрикс. Такая модель с гетерогенным клеточным составом может стать основой микрофизиологической системы «воспаление-на-чипе» и использоваться как для углубления представлений о клеточных механизмах воспаления и факторов его вызывающих, так и с прикладными целями – для тестирования противовоспалительных лекарственных субстанций.

Целью настоящей работы стал анализ биоэлектродокаталитической активности перитонеальных клеток, инкубированных с липополисахаридом, иммобилизованных в альгинатном гидрогеле.

Клетки выделяли из перитонеального смыва мышей. Взвесь клеток отмывали стерильным физиологическим раствором. Для идентификации клеток в гидрогеле производилось окрашивание суспензии по Романовскому-Гимза и подсчет общего количества на единицу объема, для понимания количества и типов клеток, расположенных на электроде. Суспензию смешивали с раствором альгината натрия (4%) в соотношении 1:1 и наносили на поверхность рабочего электрода в объеме 1 мкл. Альгинат полимеризовали 2 М раствором CaCl_2 . В ячейку вносили 100 мкл. толуидинового синего (ТС) (10^{-4} М), выступающего в роли окислительно-восстановительного медиатора, и проводили измерения методом циклической вольтамперометрии (ЦВА). Часть образцов клеточной взвеси перед нанесением на электрод подвергали 30-минутной инкубации с ЛПС *Salmonella typhi* («Пирогенал») различной концентрации. Согласно рекомендациям традиционной номенклатуры, на графиках ЦВА отрицательные токи соответствуют процессам электроокисления, а положительные – процессам электровосстановления [3].

Информативным показателем, характеризующим процессы, происходящие на электроде, оказалось соотношение пиковых значений силы тока. Для идеально обратимого электрохимического процесса этот показатель стремится к единице [3]. В условиях наших экспериментов соотношение токов определялось прежде всего присутствием клеток в системе и бактериального ЛПС.

Наиболее заметные изменения на ЦВА получены для образцов клеток, в растворе ЛПС с концентрацией 0,1 мкг/мл и 1 мкг/мл соотношение пиковых значений силы тока I_{pa}/I_{pc} составило 0,45 и 0,62. Это может быть объяснено некоторым преобладанием окисленной формы ТС у поверхности электрода, обусловленным биокаталитическим окислением ТС. В катодной области наблюдается выраженный рост силы тока, достигающий максимума в точке разворота развертки потенциала. Сходные эффекты отмечаются в более простых моделях, где роль биокатализатора, окисляющего ТС выполняет пероксидаза хрена [4].

В присутствии клеток, инкубированных в растворе ЛПС с концентрацией 10 мкг/мл, соотношение пиковых значений силы тока I_{pa}/I_{pc} составило 1,12. Увеличение концентрации эндотоксина не оказывает существенного изменения на пиковые значения силы тока ($I \approx 0,45$ мкА), в сравнении с клеточной системой не подвергавшейся действию ЛПС ($I \approx 0,4$ мкА).

Таким образом, концентрация ЛПС не только влияет на активацию разного рода клеток, но и на их жизнеспособность. При низких концентрациях ЛПС в среде клетки ведут себя активно, выделяя в альгинатный гидрогель различного рода компоненты, участвующие в иммунном ответе. Поэтому при меньших концентрациях «Пирогенала» в системе молекул, участвующих в восстановлении больше. При использовании концентрации

ЛПС 10 мкг/мл, заметны и качественные и количественные изменения в системе, но они не столь явные и значимые. Большая часть клеток неактивны, вследствие, повреждения, из-за чего мы получили сигнал с незначительными изменениями.

1. Журавко А.С., Швец В.И. Свойства бактериальных эндотоксинов и методы их удаления из биофармацевтических препаратов // Вестник МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 2014, т. 9, № 4, с. 27-33.
2. Сарбаева Н.Н., Пономарева Ю.В., Милякова М.Н. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами // Гены и клетки, 2016, № 1.
3. Шольц Ф.М. Электроаналитические методы. Бином «Лаборатория знаний», 2010, 326 с.
4. Черенков И.А., Кривилев М.Д., Игнатъева М.М., Вахрушева ЕВ. Биоэлектрохимическое моделирование диффузии толудинового синего в гидрогеле в присутствии пероксидазы и трипсина // Биофизика, 2021, т. 66, № 5, с. 865-870.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ФОТОДЕСТРУКЦИИ БАКТЕРИЙ В ПРИСУТСТВИИ МОЛЕКУЛ-СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

Bacterial Photodestruction Mechanisms in the Presence of Sensitizer Molecules

Ишемгулов А.Т., Летута С.Н., Дорофеев Д.В., Цюрко Д.Е.

Оренбургский государственный университет, г. Оренбург, РФ, azamat.ischemgulov@yandex.ru

Фотоинактивация микроорганизмов с использованием сенсibilизаторов и различных источников света является одной из альтернатив традиционным антибиотикам. Ранее было показано [1, 2], что возможными механизмами фотодеструкции планктонных бактериальных культур могут являться: (1) фотодинамическое действие активных форм кислорода – при переносе энергии светового возбуждения на кислород; (2) прямая гипертермия – при локальной трансформации энергии возбуждения в тепло; (3) при передаче энергии среде с последующей генерацией ударных волн – при использовании импульсных источников света высокой плотности мощности. В настоящем исследовании оценивался вклад этих механизмов в деструкцию планктонных бактерий в присутствии молекул-сенсibilизаторов для различных случаев фотодинамической активности красителя и степени его связанности с бактериальными стенками.

Объектами исследования служили штаммы *Salmonella typhimurium* LT2 и *Staphylococcus aureus*. Клетки суспендировали в изотоническом растворе NaCl. В качестве сенсibilизаторов использовались эритрозин и родамин С. Эритрозин является анионом (плохо связывается со стенками бактерий), обладает высоким выходом в триплетное возбужденное состояние, отсюда является эффективным генератором АФК. Родамин С является катионом (хорошо связывается с бактериальными стенками, частично нейтрализует отрицательный заряд и способствует агрегации клеток), но практически не выходит в триплетное состояние и не генерирует АФК. Источником облучения служил импульсный твердотельный YAG:Nd лазер. Плотность мощности возбуждения в области, сфокусированной на кювете, регулировалась в пределах 0,1-20 МВт/см². Фотодеструкция бактерий оценивалась по подсчёту колониеобразующих единиц, динамическому рассеянию света и данным электронной сканирующей микроскопии.

Установлено, что механизм фотодеструкции бактерий зависит от фотодинамической активности красителя и характера его взаимодействия с бактериальными стенками. Если сенсibilизатор не связывается с бактериями, но имеет высокий выход в триплетное состояние, то в зоне облучения основным механизмом деструкции бактерий является действие АФК. При росте плотности мощности возбуждения растёт роль ударных волн, образующихся в результате двухквантового поглощения и заселения высоких электронных состояний молекул (релаксация этих состояний происходит с быстрым выделением большого количества тепла). Если сенсibilизатор не генерирует АФК, но связывается с бактериями, то основным механизмом гибели клеток является прямой нагрев, а с ростом плотности мощности возбуждения – ещё и ударные волны.

При соблюдении одновременно двух условий, когда сенсibilизатор связывается с бактериальными стенками и является генератором АФК, все указанные выше механизмы фотодеструкции могут иметь место. При этом эффективность фотодинамического механизма сильно зависит от содержания кислорода в среде, в то время как тепловой механизм и ударные волны требуют только хорошего проникновения света в среду. Тем не менее, в наших экспериментах наблюдалось снижение жизнеспособности бактерий даже в тех областях, куда возбуждающий свет не проникал. Единственным повреждающим агентом в этом случае могут быть только ударные волны, поэтому данный механизм инактивации бактерий в растворах может работать в случае недостаточного проникновения света или кислорода в среду. Полученные результаты могут быть полезны при разработке новых антибактериальных методов.

1. Летута С.Н., Пашкевич С.Н., Ишемгулов А.Т., Никиян А.Н. Фототермическая инактивация микроорганизмов при релаксации высоковозбужденных состояний сенсibilизаторов // Биофизика, 2020, т. 65, № 4, 705-712.

2. Летуга С.Н., Пашкевич С.Н., Ишемгулов А.Т., Никиян А.Н. Инактивация планктонных микроорганизмов ударными акустическими волнами // Журнал физической химии, 2021, т. 95, № 4, с. 646-654.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕГОЧНОЙ СУРФАКТАНТНОЙ СИСТЕМЫ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ГЕНЕРАЦИИ КАПИЛЛЯРНЫХ ВОЛН

Study of the Pulmonary Surfactant System using Electric Generation of Capillary Waves

Казаринов К.Д., Щелконогов В.А., Чеканов А.В., Баранова О.А., Полников И.Г.

ФИРЭ им. В.А.Котельникова РАН, г. Фрязино, Моск. обл., РФ, kazarinov@ms.ire.rssi.ru

В предлагаемой работе разработан новый метод исследования сурфактантной системы человека для диагностики больных, страдающих легочными заболеваниями, в том числе, после заражения COVID-19. Изучение сурфактантной системы легких (ССЛ) в здоровом организме и при патологии стоит в ряду важных задач современной пульмонологии и поэтому методы изучения ССЛ непрерывно совершенствуются, что предполагает более широкие возможности для подробного изучения влияния патологии сурфактантной системы в легочных заболеваниях [1]. В последнее время этот вопрос приобретает особую важность в связи с необходимостью экспресс диагностики больных, пораженных короновирусной инфекцией [2]. Известен способ хроматографического определения качества сурфактанта [3], недостатком которого является длительное время анализа и использование дорогих хроматографов с дорогостоящими расходными материалами. Используется также метод [4], в котором для оценки состояния легочного сурфактанта методом отрыва кольца измеряют поверхностное натяжение конденсата выдыхаемого воздуха. Этот метод дает удовлетворительные результаты при измерении поверхностного натяжения на чистых поверхностях. Однако в случае присутствия на поверхности ПАВ (поверхностно-активных веществ) их применение затруднено необходимостью учитывать значение краевого угла смачивания, а также возможностью налипания пленок на измерительные поверхности, что заметно повышает погрешность измерения поверхностного натяжения жидкости.

Предлагаемый нами способ контроля конденсата выдыхаемого воздуха человека заключается в нанесении пробы конденсата на поверхность водного раствора, на которой создаются за счет явления электрострикции капиллярные волны, изменение амплитуды и фазы которых позволяет определить поверхностное натяжение жидкости и параметры сурфактантного слоя. Для этого нами была разработана конструкция и получен патент на изобретение измерителя параметров жидкости, содержащий кювету для жидкости, генератор, связанный с системой создания на поверхности жидкости капиллярных волн и системой регистрации характеристик колебаний жидкости [5]. Совершенствование технологии процесса контроля ССЛ преследует решение задач сокращения времени измерения ССЛ и снижения стоимости метода.

1. Lewis J.E., Brackenbury A. Role of exogenous surfactant in acute lung injury // Crit. Care Med., 2003, suppl. 4, pp. 324-328.

2. Львов Д.К., Колобухина Л.В., Дерябин П.Г. Коронавирусная инфекция. Тяжелый острый респираторный синдром // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение, 2015, № 3, с. 35-42.

3. Пилипчук Н.С. и др. Способ исследования состояния сурфактанта при туберкулезе легких. 1413528 SU.

4. Мизев А.И. и др. Способ оценки состояния легочного сурфактанта. 2500347 RU. 2013.

5. Казаринов К.Д., Полников И.Г. Патент на изобретение № 2735315. «Измеритель параметров поверхности жидкости».

ОПТИЧЕСКАЯ КОГЕРЕНТНАЯ АНГИОГРАФИЯ ИШЕМИЗИРОВАННОЙ КИШКИ В ОТКРЫТОЙ И ЛАПАРОСКОПИЧЕСКОЙ ХИРУРГИИ

Optical Coherence Angiography in Open and Laparoscopic Surgery in Intestinal Ischemia

Киселева Е.Б.¹, Рябков М.Г.¹, Зарубенко П.А.¹, Сизов М.А.¹, Багрянцев М.В.¹, Геликонов Г.В.²,
Гладкова Н.Д.¹

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, г. Нижний Новгород, РФ

² Институт прикладной физики РАН, г. Нижний Новгород, РФ, kiseleva84@gmail.com

Международные и российские руководства «Ведение острой мезентериальной ишемии» включают открытые и лапароскопические оперативные вмешательства [1]. Метод оптической когерентной ангиографии (ОКА) потенциально способен предоставить хирургам данные о кровообращении в ишемизированной кишке [2]. Однако на сегодняшний день не решена проблема высокой чувствительности технологии ОКА к выраженным перистальтическим движениям желудочно-кишечного тракта, ударам пульсовой волны, респираторным и прочим видам движения, приводящим к появлению многочисленных артефактов на ангиографических

изображениях [3,4]. При лапароскопической операции фиксация тонкой кишки во время исследования представляет еще большие трудности, поэтому поиск способов получения безартефактных ангиографических изображений в режиме реального времени является актуальной задачей современной абдоминальной хирургии.

Цель данной работы - разработать и апробировать устройство атравматичной фиксации исследуемого с помощью ОКА участка стенки тонкой кишки, легко применимого при открытой и лапароскопической хирургии, позволяющего существенно повысить качество ангиографических изображений.

Для получения ангиографических данных использована система мультимодальной оптической когерентной томографии, работающая на спектральном принципе приема сигнала и имеющая зонды разных конфигураций, в том числе в виде длинных трубок, подходящих для лапароскопии (ИПФ РАН, Россия). В ходе работы нами разработаны специальные силиконовые насадки, одевающиеся на зонды и позволяющие временно фиксировать стенку тонкой кишки за счет создания локального контролируемого дефицита давления. Способ временной фиксации тканей стенки тонкой кишки апробирован в двух сериях экспериментов: в открытой и лапароскопической хирургии. Первая серия экспериментов была проведена на минипигах ($n=10$) при открытых хирургических вмешательствах. После моделирования острой мезентериальной ишемии исследовали микроциркуляцию стенки тонкой кишки с помощью метода ОКА. Проведено сравнение эффективности традиционного метода ручной фиксации тонкой кишки и разработанного устройства. Во второй серии экспериментов на кроликах породы шиншилла ($n=6$) также методом ОКА исследовали состояние кровеносных сосудов после моделирования острой мезентериальной ишемии тонкой кишки, но в лапароскопическом варианте.

В результате, в первой серии экспериментов при традиционном способе получения ангиографических изображений без артефактов оказалось лишь 64% данных. Использование вакуумного прижима позволило повысить качество ангиографических изображений у минипигов до 92% ($p=0,001$). Во второй серии экспериментов при ручной фиксации зонда к ткани качественных изображений сосудистых сеток получено не было; при вакуумной фиксации процент безартефактных ангиографических данных составил 75%. Гистологическое исследование в обеих сериях экспериментов подтвердило безопасность разработанного устройства временной вакуумной фиксации тканей: нарушений микроциркуляции и механических повреждений не выявлено.

Таким образом, использование разработанного способа временной вакуумной фиксации тканей позволило добиться получения качественных сеток кровеносных сосудов во время открытых (в 92% случаев) и лапароскопических (в 75% случаев) хирургических манипуляций на тонкой кишке, позволив проводить диагностику интестинального микроциркуляторного русла при ишемии в режиме реального времени.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект № 19-75-10096.

1. Bala M., Kashuk J., Moore E.E., Kluger Y. et al. Acute mesenteric ischemia: Guidelines of the World Society of Emergency Surgery // World Journal of Emergency Surgery, 2017, vol. 12, doi: 10.1186/s13017-017-0150-5.

2. Kiseleva E., Ryabkov M., Baleev M. et al. Prospects of Intraoperative Multimodal OCT Application in Patients with Acute Mesenteric Ischemia // Diagnostics, 2021, vol. 11, no. 4, doi: 10.3390/diagnostics11040705.

3. Spaide R.F., Fujimoto J.G., Waheed N.K. Image artifacts in optical coherence angiography // Retina, 2015, vol. 35, no. 11, doi: 10.1097/IAE.0000000000000765.

4. Kiseleva E.B., Ryabkov M.G., Baleev M.A. et al. Intestinal optical coherence tomography (angiography) imaging: a comparison between animal models and humans // Proc. SPIE, 2022, vol. 11949, no. 1194908, doi: 10.1117/12.2608405.

ТЕРМОДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОЗИНА С РАЗЛИЧНЫМИ ПЕПТИДАМИ Thermodynamics of Interaction between Cytosine and Several Peptides

Колтышев Д.Р., Баранников В.П., Межевой И.Н., Смирнов В.И.

Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Иваново, РФ, damir.koltishev@gmail.com

Взаимодействия между основаниями нуклеиновых кислот в составе матричной РНК и аминокислотами или короткими пептидами являются ключевым этапом в процессе биосинтеза белка. Выяснение молекулярных механизмов взаимодействия и факторов, обеспечивающих устойчивость образуемых комплексов, является предметом многих работ в последние годы. Задачей нашей работы является выявление структурной селективности и предпочтительные типы связывания пептид – нуклеиновой основание в жидких средах с физиологическим значением pH 7.4.

Калориметрическим методом получены величины энтальпий переноса ряда пептидов из фосфатно-солевого буфера в буферный раствор с различными добавками цитозина, как показано на рис. Обработка полученных данных для различных соотношений реагентов по программе HEAT были определены константы комплексообразования, изменения энергии Гиббса, энтальпии и энтропии в процессе образования комплексов с рядом пептидов: глицил-глутаминовой кислотой, аланил-тирозином, аланил-аланином.

Проводится анализ полученных термодинамических величин. Константы комплексообразования принимают небольшие значения, что характерно для многих биохимических процессов. Образование комплексов сопровождается небольшими экзотермическими (в случае глицил-глутаминовой кислоты) или

эндотермическими (в случае аланил-аланина) эффектами. Отмечается предпочтительность взаимодействия цитозина с пептидом, содержащим остаток глутаминовой кислоты. Длинная боковая цепь с карбоксилатной группой на конце может образовывать хелатную структуру вокруг молекулы цитозина. При этом между пептидом и цитозином образуются 3 водородные связи.

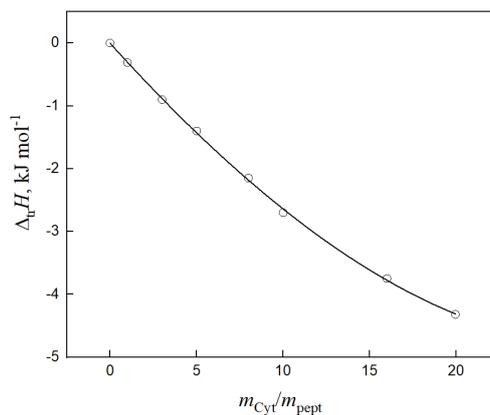


Рисунок 1. Энтальпии переноса глицил-глутаминовой кислоты в буферные растворы цитозина различной концентрации

ИОНИЗИРУЮЩЕЕ ИЗЛУЧЕНИЕ В ДОЗЕ 50 сГр СПОСОБСТВУЕТ ПРОНИКНОВЕНИЮ GC-ОБОГАЩЕННЫХ ПЛАЗМИД В МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА Ionizing Radiation at A Dose Of 50 cGy Promotes the Penetration Of GC-Enriched Plasmids into Human Mesenchymal Stem Cells

Конькова М.С.¹, Ершова Е.С.¹, Вейко Н.Н.¹, Кальянов А.А.¹, Каменева Л.В.¹, Вейко В.П.^{1,2}, Костюк С.В.¹

¹Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, г. Москва, РФ, mkonkova@med-gen.ru

²Институт биохимии имени А.Н. Баха, г. Москва, РФ

Стволовые клетки являются недифференцированными клетками, обладающими потенциалом для неограниченного деления и дифференцировки во многие типы клеток. Поскольку стволовые клетки являются резервным пулом для пополнения разных типов клеток организма, проводятся эксперименты *in vitro* по перетрансформации стволовых клеток в соматические клетки, и исследуются эффективные способы трансфекции плазмид в цитоплазму стволовых клеток. Ранее мы показали, что при облучении дозами радиации 10-50 сГр в результате гибели части клеток в среде культивирования мезенхимных стволовых клеток (МСК) *in vitro* накапливаются окисленные фрагменты внеклеточной ДНК, которые проникают в цитоплазму МСК [1,2]. Предположили, что окислительная модификация ДНК вследствие воздействия радиации приводит к эффективному проникновению ДНК из среды культивирования МСК внутрь клетки.

Для исследования роли окислительной модификации ДНК в проникновении в клетки была создана генетическая конструкция на основе «базового» вектора pEGFP-C1 (pC1), GenBankAccession: U55763, содержащая в качестве вставки искусственно синтезированный фрагмент ДНК, имеющий в своем составе поли-G участок (p12G), служащий мишенью для эффективного окисления клонированного фрагмента ДНК. В качестве «маркера» в составе выбранного вектора содержится ген флуоресцирующего белка EGFP (GFP). В работе использованы МСК, полученные из пяти образцов жировой ткани из коллекции клеточных культур ФГБНУ «МГНЦ». Исследование экспрессии поверхностных белков клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием соответствующих антител на приборе CyFlow (Partec CyFlow® ML, Германия). МСК были типированы по поверхностным антигенам: HLA-ABC +, CD44 +, CD54 (low), CD90 +, CD106 +, CD29 +, CD49b (low), CD105 (low). В МСК плазмиды вводили двумя способами: путем введения плазмид, содержащих ген флуоресцирующего белка, в среду культивирования в концентрации 100 нг/мл с последующим инкубированием 24 часа в CO₂ инкубаторе при 37°C и путем введения плазмид в концентрации 100 нг/мл с последующим облучением через 2-3 минуты рентгеновским излучением в дозе 50 сГр при помощи импульсного рентгеновского аппарата «АРИНА-2» (ООО «Спектрофлэш, С.-Пб.) и инкубированием 24 часа в CO₂ инкубаторе при 37°C. Для анализа проникновения плазмид в клетки применили два метода: флуоресцентной микроскопии (AxioVert, «Carl Zeiss Microscopy», Германия) и проточной цитофлуориметрии (Partec CyFlow® ML, Германия). Анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения Carl Zeiss Microscopy, различия проверяли с помощью расчета U-критерия Манна-Уитни и считали достоверными при $p < 0,01$.

В присутствии плазмид (pC1 и p12G) в клетках появляются слабые сигналы в области цитоплазмы. Исследовали влияние окислительного стресса, вызываемого ионизирующим излучением, на проникновение плазмид в клетки и последующую экспрессию флуоресцирующего белка. Облучение дозой 50 сГр с

последующим культивированием 24 часа в присутствии плазмид pC1 и p12G приводило к повышению уровня флуоресценции в МСК, регистрируемой методом флуоресцентной микроскопии, в 2 и 6 раза, соответственно ($p < 0,01$), что является свидетельством проникновения плазмид в клетки и экспрессии флуоресцирующего белка. Методом проточной цитофлуориметрии показали, что при облучении радиацией в дозе 50 сГр после добавления плазмид pC1 и p12G средняя интенсивность флуоресценции клеток по сравнению с контролем возрастала сильнее, чем в отсутствии радиационного воздействия и изменялась в ряду: $K < pC1 < pG12$.

Таким образом, мы показали методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии, что введение в плазмиды поли-G вставки, способной быстро окисляться в условиях окислительного стресса, приводит к эффективному проникновению плазмид в стволовые клетки. Ионизирующее излучение вызывает изменение окислительного гомеостаза в среде культивирования клеток, что приводит к окислительной модификации фрагментов ДНК и способствует проникновению фрагментов ДНК в клетки.

1. Konkova M., Abramova M., Kalianov A., Ershova E., Dolgikh O., Umriukhin P., Izhevskaya V., Kutsev S., Veiko N., Kostyuk S. Mesenchymal Stem Cells Early Response to Low-Dose Ionizing Radiation // *Front Cell Dev. Biol.*, 2020, vol. 8, p. 584497, doi: 10.3389/fcell.2020.584497.

2. Sergeeva V., Ershova E., Veiko N., Malinovskaya E., Kalyanov A., Kameneva L., Stukalov S., Dolgikh O., Konkova M., Ermakov A., Veiko V., Izhevskaya V., Kutsev S., Kostyuk S. Low-Dose Ionizing Radiation Affects Mesenchymal Stem Cells via Extracellular Oxidized Cell-Free DNA: A Possible Mediator of Bystander Effect and Adaptive Response // *Oxid Med Cell Longev.*, 2017, p. 9515809, doi: 10.1155/2017/9515809.

ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ NBD-PC В DOPC, DOPA И TOCL СОДЕРЖАЩИХ МЕМБРАНАХ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ ЦИТОХРОМА С

Quenching of NBD-PC Fluorescence in DOPC, DOPG and TOCL Containing Membranes with the Addition of Cytochrome c

Конохова С.П., Волков В.В., Степанов Г.О., Осипов А.Н.

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, г. Москва, РФ, *sopfia.k.2000@gmail.com*

В современной молекулярной медицине одним из перспективных подходов к лечению патологий становится использование специфических внутриклеточных механизмов запрограммированной клеточной гибели. Наиболее изученными из видов клеточной гибели являются апоптоз и ферроптоз, в развитии которых играет важную роль окисление фосфолипидов мембран. Причем если окисление кардиолипина является маркером апоптоза, то для ферроптоза специфично окисление фосфатидилэтаноламина с арахидоновой кислотой. Такая специфичность окисления различных фосфолипидов при различных процессах клеточной гибели дало начало новому научному направлению – регуляторная липидомика. Однако до сих пор не все элементы механизма развития программируемой смерти клеток ясны. Например, взаимодействие цитохрома С (CytC) с кардиолипин-содержащими мембранами ведет к увеличению пероксидазной активности CytC и запускает апоптоз, но остается непонятным, почему при наличии кардиолипина и CytC в составе митохондрий нормальных клеток они не погибают. Это может быть связано с тем, что не только кардиолипин (TOCL), но и другие фосфолипиды принимают участие во взаимодействии с CytC. Одним из таких фосфолипидов может быть фосфатидная кислота (DOPA), которая структурно очень похожа на кардиолипин и является составной частью кардиолипина (кардиолипин состоит из двух молекул фосфатидной кислоты). Одновременно количество DOPA регулируется при помощи фосфолипазы D, а фосфолипаза D присутствует на внешней листке митохондриальных мембран.

В данной работе исследовалась способность CytC формировать комплексы с DOPA и TOCL. Материалами, использованные в работе, были фосфатидилхолиновые липосомы с 20% содержанием DOPA или TOCL, а также с 1% примесью флуоресцентно-меченного фосфатидилхолина (NBD (C6) PC). Взаимодействие CytC с мембранами, содержащими флуоресцентную метку, приводит к резкому тушению флуоресценции за счет близкорасположенного гемового железа. При помощи спектрофлуориметрии NBD (C6) PC (λ возбуждения 460 нм, λ испускания 480–590 нм с максимумом в 536 нм) было показано взаимодействие фосфолипидных мембран с CytC.

Так, интенсивность флуоресценции NBD (C6) PC в составе DOPA и TOCL содержащих мембран уменьшается на 30,5% и 17,8% соответственно, при добавлении CytC (20:1). Все сравнения выполнены относительно мембран, состоящих полностью из фосфатидилхолина.

Таким образом однозначно показано, что не только TOCL, но и DOPA содержащие мембраны могут выраженно взаимодействовать с цитохромом С, а значит именно это взаимодействие может играть иницирующую роль в развитии апо- и ферроптоза.

1. Cytochrome c-cardiolipin complex // *Biochemistry Moscow*, 2013, vol. 78, no. 10, pp. 1391-1404.

2. Stepanov G.O., Gnedenko O.V., Osipov A.N. et. al. Evaluation of cytochrome c affinity to anionic phospholipids by means of surface plasmon resonance // *FEBS Letters*, 2006, vol. 583, pp. 97-100.

3. Conrad M., Kagan V.E., Bayir H., Pagnussat G.C., Head B., Traber M.G., Stockwell B.R. Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species // *Genes and Development*, 2018, vol. 32, pp. 602-619.
4. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Алексеев А.В. Молекулярные механизмы апоптоза. Структура комплекса цитохрома с с кардиолипином // *Биохимия*, 2013, т. 78, вып. 10, с. 1391-1404.
5. Льюин Б. и др. Клетки. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011, 951 с.

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С КОМПЛЕКСАМИ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА С β -ЦИКЛОДЕКСТРИНАМИ

Thermodynamic Parameters of the Interaction between Human Serum Albumin and Levofloxacin Complexes with β -Cyclodextrins

Копнова Т.Ю., Якупова Л.Р., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ, kopnovataty@gmail.com

Циклодекстрины (ЦД) – циклические олигосахариды с гидрофильной поверхностью и гидрофобной полостью. Введение заместителей в ЦД способствует изменению их растворимости, а также способности образовывать устойчивые нековалентные комплексы [1]. В данной работе рассмотрено комплексообразование антибактериального препарата – левофлоксацина (ЛФ) с различными производными β -ЦД, имеющими заряженные (амино- β -ЦД (АЦД) и сульфобутиловым эфиром β -ЦД (СБЭЦД)) и незаряженные (2-гидросипропил- β -ЦД (ГПЦД) и метил- β -ЦД (МЦД)) заместители. Образование нековалентных комплексов ЦД с различными лекарственными препаратами может оказывать влияние на фармакокинетические и фармакодинамические свойства молекулы-гостя. Одной из важнейших физико-химических характеристик лекарства является взаимодействие с белками плазмы крови. Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) является основным компонентом плазмы крови, функциями которого является связывание и перенос биологически активных молекул к органам и тканям [2]. Влияние комплексообразования ЛВ с ЦД на взаимодействие с ЧСА является актуальным направлением исследований.

ЛВ связывается с ЧСА в субдоменах ПА и ПИА в гидрофобных карманах альбумина [3] и характеризуется отрицательными значениями изменения энтальпии (ΔH) и энтальпии (ΔS) (Таблица 1). Такие значения термодинамических параметров указывают на то, что комплексообразование ЛФ с ЧСА происходит за счет образования водородных связей и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. При связывании ЛФ с незаряженными ЦД, происходит значительное уменьшение ΔH и ΔS реакции комплексообразования с ЧСА: в $\sim 3,7$ и $\sim 8,4$ раза для ГПЦД; в $\sim 2,4$ и $4,8$ для МЦД (табл. 1). Данный эффект, по всей видимости, объясняется тем, что большие по размеру и более полярные комплексы ЛФ-ЦД (по сравнению со свободным ЛФ) не могут проникнуть в гидрофобные карманы ЧСА и взаимодействуют преимущественно с поверхностью альбумина за счет образования водородных связей. Действительно, более значимые изменения происходят в системе ЛФ-ГПЦД+ЧСА, содержащей дополнительную гидроксильную группу. Противоположные изменения наблюдаются в системах, содержащих заряженные заместители – АЦД и СБЭЦД. В обеих системах увеличиваются ΔH и ΔS реакции, однако лишь в случае СБЭЦД эти изменения значительные. Изменение знака и величины ΔH и ΔS реакции комплексообразования ЛФ-СБЭЦД+ЧСА может свидетельствовать о вкладе электростатических сил в данные взаимодействия. Интересно, что в системе, содержащей АЦД, таких изменений значений ΔH и ΔS не происходит. Вероятно, аминогруппа АЦД способна образовывать как водородные, так и электростатические взаимодействия с поверхностью альбумина, либо она частично задействована во взаимодействиях с карбоксильной группой ЛФ. Таким образом, положительный вклад в ΔH от ионных взаимодействий компенсируется отрицательным вкладом энергии образования водородных связей.

Таблица 1. Термодинамические параметры взаимодействия человеческого сывороточного альбумина с левофлоксацином и комплексами левофлоксацин-циклодекстрин; pH 7,4; 310 K

| Система | ΔH , кДж·моль ⁻¹ | ΔS , Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹ | K_b , 10 ⁵ ·М ⁻¹ |
|-------------------|--|--|--|
| ЧСА+ЛФ | $-57,7 \pm 0,5$ | $-71,4 \pm 0,2$ | $9,9 \pm 0,2$ |
| ЧСА+ЛФ-МЦД | $-134,6 \pm 0,6$ | $-337,7 \pm 0,8$ | $0,89 \pm 0,03$ |
| ЧСА+ЛФ- -ГПЦД | $-217,6 \pm 0,8$ | -596 ± 1 | $3,5 \pm 0,1$ |
| ЧСА+ЛФ- -СБЭЦД | 41 ± 1 | 249 ± 1 | $13,7 \pm 0,3$ |
| ЧСА+ЛФ-АЦД | $-53,0 \pm 0,6$ | $-60,3 \pm 0,5$ | $6,5 \pm 0,2$ |

Полученные результаты позволяют сделать предположения о механизме взаимодействий ЧСА с комплексами ЛФ с ЦД, а также о роли этих взаимодействий в стабилизации комплексов ЛФ с ЧСА (табл. 1). Эти

выводы создают фундамент для направленного варьирования фармакологических свойств фторхинолонов и успешного использования их комплексов с ЦД в медицинской практике.

Работа выполнена с использованием ИК-Фурье спектрометра Tensor 27 Bruker и спектрометра кругового дихроизма Jasco J-815 при поддержке программы развития МГУ.

1. Szente L., Szejtli J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties, and trends in development // Adv. Drug Deliv. Rev. 1999, vol. 36, no. 1, pp. 17-28, doi: 10.1016/S0169-409X(98)00092-1.
2. Fanali G., di Masi A., Trezza V., Marino M., Fasano M., Ascenzi P. Human serum albumin: From bench to bedside // Mol. Aspects Med. Elsevier Ltd, 2012, vol. 33, no. 3, pp. 209-290, doi: 10.1016/j.mam.2011.12.002.
3. Varlan A., Ionescu S., Hillebrand M. Study of the interaction between ofloxacin and human serum albumin by spectroscopic methods // Luminescence, 2011, vol. 26, no. 6, pp. 710-715, doi: 10.1002/bio.1302.

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ СЕНСОРА СAMP И Ca²⁺, ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ Obtaining a Monoclonal Line of Cells Expressing cAMP and Ca²⁺ Sensors for Drug Testing

Котова П.Д., Дымова Е.А., Рогачевская О.А.

Институт биофизики клетки РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино, РФ, polinakotova88@gmail.com

Более трети существующих сегодня лекарственных средств содержат в своем составе лиганды GPCR-рецепторов [1]. При создании лекарственных соединений целью ставится их воздействие на определенный внутриклеточный сигнальный каскад, однако, факт связывания лиганда с рецептором не гарантирует воздействия на желаемый сигнальный процесс. Показано, что один и тот же рецептор, связываясь с различными лигандами, может по-разному воздействовать на различные внутриклеточные сигнальные пути [2]. В случае лекарственных лигандов GPCR-рецепторов нецелевые воздействия могут вести к развитию побочных эффектов, поэтому важно поводить как можно более полное исследование их влияния на внутриклеточные сигнальные процессы на стадии доклинических исследований. В связи с этим разработка методов и создание инструментов для оценки воздействия лигандов на различные сигнальные системы клетки на сегодняшний день крайне актуальны.

Сигнал о связывании GPCR-рецепторов с лигандами усиливается внутри клетки в основном посредством аденилатциклазного и фосфолипазного сигнальных путей, активация которых приводит к значительному изменению концентрации сAMP и Ca²⁺ соответственно. Именно на мониторинге этих внутриклеточных молекул основаны методы исследования сигнальных процессов, активируемых лигандами GPCR-рецепторов. Мониторинг внутриклеточного Ca²⁺ традиционно проводится с помощью синтетических флуоресцентных зондов, которые проникают через мембрану и позволяют изучать внутриклеточные Ca²⁺-процессы в живых клетках. Однако для молекулы сAMP таких зондов не разработано, и проведение мониторинга сAMP внутри живой клетки было невозможно до появления генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров. Недавно были разработаны генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры как для сAMP [3], так и для Ca²⁺ [4], что сделало возможным проведение мониторинга двух этих ключевых молекул одновременно.

Нами была создана моноклональная линия клеток, стабильно и на высоком уровне экспрессирующих сенсоры внутриклеточных сAMP и Ca²⁺. Для этого клетки НЕК-293 трансфицировали плазмидными векторами Pink Flamingo (Addgene plasmid #102356) и CMV-R-GECO1 (Addgene plasmid #32444). С помощью клеточного сортера трансфицированные клетки, обладающие наиболее яркой флуоресценцией обоих сенсоров, помещали по одной в лунку планшета и наращивали моноклональные клеточные линии. Клетки каждой полученной моноклональной линии тестировали физиологически, на основе результатов этого тестирования была отобрана лучшая линия. Полученная клеточная линия позволяет проводить одновременный мониторинг внутриклеточных сAMP и Ca²⁺ с высокой эффективностью, и может быть применена в фармацевтике для выявления нецелевых воздействий лекарственных соединений на внутриклеточные сигнальные процессы.

С помощью клеток полученной моноклональной линии нами было протестировано более двадцати лигандов адренергических рецепторов, применяемых при лечении заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной и мочеполовой систем. Было продемонстрировано, что практически все исследовавшиеся соединения обладают куда более широким влиянием на внутриклеточные сигнальные процессы, чем предполагалось при их разработке. Именно такие нецелевые воздействия на внутриклеточные процессы и лежат в основе широкого круга побочных эффектов, возникающих при приеме лекарственных препаратов, содержащих лиганды адренергических рецепторов.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ МК-67.2021.1.4.

1. Hauser A.S., Attwood M.M., Rask-Andersen M., Schiöth H.B., Gloriam D.E. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indication // Nature Reviews Drug Discovery, 2017, vol. 16, no. 12, pp. 829-842.
2. Lefkowitz R.J. A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture) // Angewandte Chemie International Edition, 2013, vol. 52, no. 25, pp. 6367-6378.

3. Harada K., Ito M., Wang X., Tanaka M., Wongso D., Konno A., Hirai H., Hirase H., Tsuboi T., Kitaguchi T. Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging // *Scientific Reports*, 2017, vol. 7, no. 1, p. 7351.

4. Zhao Y., Araki S., Wu J., Teramoto T., Chang Y.F., Nakano M., Abdelfattah A.S., Fujiwara M., Ishihara T., Nagai T., Campbell R.E. An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators // *Science*, 2011, vol. 333, no. 6051, pp. 1888-1891.

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ АСТАКСАНТИНА В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА У КРЫС С СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

The Protective Effect of Astaxanthin in Brain Mitochondria in Rats with Heart Failure

Крестинина О.В., Крестинин Р.Р., Бабурина Ю.Л., Сотникова Л.Д.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пущино, Московская обл., РФ, ovkres@mail.ru

Сердечная недостаточность является системным заболеванием с серьезными последствиями для функций всего организма. В результате поражения сердца, сердечная недостаточность может индуцировать повреждения головного мозга, поскольку у пациентов с сердечной недостаточностью были обнаружены как анатомические, так и функциональные повреждения головного мозга. Повреждения головного мозга наблюдались в широком диапазоне клинических состояний и сердечных функций, и они могут влиять на результаты лечения пациентов. Существуют данные, показывающие участие нейрогормональных, пищевых и воспалительных механизмов в этом сложном процессе [1]. Митохондрии являются центральной органеллой в клетке. Митохондриальные дисфункции участвуют в этиологии различных заболеваний, таких как нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, диабет, различные формы заболеваний печени и скелетно-мышечной системы, сепсиса и психиатрических расстройств [2]. Головной мозг, часто страдает от поражений в результате сердечной недостаточности, и у пациентов с сердечной недостаточностью были обнаружены как анатомические, так и функциональные повреждения головного мозга [3]. В настоящее время, большое внимание уделяется исследованиям, направленным на повышение защитной реакции на окислительный стресс с помощью различных антиоксидантов, чтобы уменьшить стресс- и возраст-зависимые окислительные повреждения, и дисфункцию митохондрий. Роль защитной системы организма выполняют антиоксиданты. Среди эффективных антиоксидантов следует отметить астаксантин (АСТ). АСТ является производным кетокаротиноидов и обладает сильной антиоксидантной активностью [4].

Недавно мы показали, что хроническое введение АСТ улучшало функциональное состояние митохондрий сердца крыс с сердечной недостаточностью [5]. Изопротеринол (ИЗО) использовали, чтобы вызвать сердечную недостаточность, модель, широко используемую в международном научном сообществе.

В эксперименте были использованы 16 крыс-самцов линии Wistar, массой 240–250 г (возраст 2 месяца). Крыс разделили на четыре группы (по четыре крысы в каждой группе). Первая группа крыс была контрольная, крысам второй и четвертой группы вводили перорально АСТ (150 мг/кг, растворяли в оливковом масле) в течении 2 недель. Через две недели крысам третьей и четвертой групп дважды с интервалом в 24 ч вводили ИЗО (инъекция, подкожно), растворенный в физиологическом растворе (100 мг/кг), чтобы вызвать сердечную недостаточность. Из каждой группа крыс выделяли митохондрии мозга и исследовали функциональное состояние. Для того, чтобы проверить, что сердечная недостаточность была достигнута, измеряли уровень АЛТ, АСТ и ЛДГ в тканевых лизатах левого желудочка сердца. Уровни белков снижались в тканевых лизатах у крыс третьей группы (инъекция ИЗО), что говорит о том, что сердечная недостаточность была достигнута. Для исследования функционального состояния мозга крыс измеряли дыхательные активности и коэффициент дыхательного контроля, который указывает на работоспособность митохондрий. В митохондриях мозга, изолированных из 3 группы крыс (инъекция ИЗО), величина дыхательного контроля снижалась, тогда как в митохондриях из 4 группы крыс (АСТ + ИЗО) повышалась по сравнению с контролем.

Общепринято, что при разобщении окислительного фосфорилирования наблюдается потеря способности митохондрий к накоплению Ca^{2+} . Поэтому, мы измерили набухание митохондрий в наших экспериментальных условиях. Инъекция ИЗО привела к тому, что $T_{1/2}$ (средний полумаксимальный период светорассеяния) снижался в 2 раза по сравнению с контролем, т.е. скорость набухания митохондрий в присутствии ИЗО ускорялась, тогда как в митохондриях мозга, изолированных из 4 группы крыс (АСТ + ИЗО) $T_{1/2}$ повышался в 2 раза по сравнению с таковым значением в митохондриях из группы 3 (ИЗО), т.е. скорость набухания митохондрий замедлялась.

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что АСТ проявляет защитные свойства в митохондриях мозга у крыс с сердечной недостаточностью и может использоваться для предотвращения развития как сердечно-сосудистых заболеваний, так и повреждения мозга.

1. Bock J.S., Gottlieb S.S. Cardiorenal syndrome: new perspectives // *Circulation*, 2010, vol. 121, pp. 2592-600, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.886473.

- Javadov S., Kozlov A.V., Camara Amadou K.S. Mitochondria in Health and Diseases // *Cells*, 2020, vol. 9, no. 5, p. 1177, doi: 10.3390/cells9051177.
- Ofer Havakuk M.D. et al. Heart Failure-Induced Brain Injury // *J Am Coll Cardiol*, 2017, vol. 69, no. 12, pp. 1609-1616, doi: 10.1016/j.jacc.2017.01.022.
- Fassett R., Coombes J. Astaxanthin in cardiovascular health and disease // *Molecules*, 2012, vol. 17, pp. 2030-2048, doi: 10.3390/molecules17022030.
- Krestinin R.R. et al. Isoproterenol-Induced Permeability Transition Pore-Related Dysfunction of Heart Mitochondria is Attenuated by Astaxanthin // *Biomedicines*, 2020, vol. 8, no. 10, p. 437, doi: 10.3390/biomedicines8100437.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ КОНЬЮГАТА ХЛОРИНА E6 С КАБОЗАНТИНИБОМ КАК АГЕНТА С КОМБИНИРОВАННЫМ ДЕЙСТВИЕМ Investigation of the Antitumor Activity of Chlorin e6 Conjugate with Cabozantinib as an Agent with Combined Action

Крылова Л.В., Горохова А.А., Отвагин В.Ф., Нючев А.В., Федоров А.Ю., Балалаева И.В.

Университет Лобачевского, г. Нижний Новгород, РФ, lu.krylova@mail.ru

Принцип комбинированной терапии основан на сочетанном применении нескольких, различных по механизму действия, терапевтических агентов. Данная стратегия направлена на преодоление лекарственной устойчивости опухолевых клеток вследствие гетерогенной природы опухоли. Однако эффективность одновременного применения нескольких препаратов может быть снижена вследствие различия фармакокинетических свойств. В связи с этим в настоящее время ведутся активные разработки многоцелевых агентов [1,2]. Этот подход заключается в объединении в одной молекуле нескольких функциональных модулей с различным механизмом действия и нацеленных на разные мишени в опухолевой клетке.

Целью данной работы явилось исследование противоопухолевой активности конъюгата цинкового комплекса хлорина *e6* с производным мальтозы и присоединенным через фермент-расщепляемый линкер кабозантинибом (ZnChl-Cbz). Хлорин (ZnChl) под действием света запускает фотодинамическую реакцию в клетке. Кабозантиниб (Cbz) представляет собой ингибитор тирозинкиназной активности рецептора с-MET.

В ходе работы исследованы спектральные свойства соединения, определен квантовый выход флуоресценции ZnChl-Cbz. Исследования *in vitro* проводили на культурах клеток карциномы мочевого пузыря человека T-24 и RT-4, отличающихся по уровню экспрессии рецептора с-MET. Проанализировано внутриклеточное распределение ZnChl-Cbz методом конфокальной микроскопии с использованием красителей органелл. Определение цитотоксичности ZnChl-Cbz, а также ZnChl и Cbz производили методом МТТ-теста. Для оценки фотодинамической активности дополнительно облучали клетки в дозе 20 Дж/см² в спектральном диапазоне 655-675 нм. Оценку сочетанного действия производили путем расчета комбинаторного индекса (CI).

Исследованное соединение обладает интенсивным поглощением в коротковолновой и длинноволновой областях спектра, с максимумами при 416 и 642 нм. Флуоресценция наблюдается в длинноволновой области с максимумом при 648 нм. Квантовый выход флуоресценции не превышает 1%. Накопление ZnChl-Cbz в опухолевых клетках происходит в течение 24 часов с локализацией в лизосомах и других везикулах. Показана способность ZnChl-Cbz вызывать фотоиндуцированную гибель клеток при облучении в дозе 20 Дж/см², при этом продемонстрирована более высокая фотодинамическая активность в отношении клеток T-24 с высоким уровнем экспрессии с-MET. Расчитанное значение CI (0,23) указывает на синергический эффект двух терапевтических агентов в составе ZnChl-Cbz.

Полученные данные свидетельствуют об эффективности исследуемого конъюгата и позволяют рассматривать его в качестве потенциального соединения для ФДТ с комбинированным действием, объединяющего активность фотосенсибилизатора и таргетного агента.

Работа осуществлена при финансовой поддержке РФ (грант №21-73-10230), Проекта Министерства науки и высшего образования РФ (0729-2020-0061) Исследования с помощью метода конфокальной микроскопии были выполнены при поддержке Программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

- Otvagin V.F., Kuzmina N.S., Krylova L.V., Volovetsky A.B. et al. Water-Soluble Chlorin/ Arylaminoquinazoline Conjugate for Photodynamic and Targeted Therapy // *Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, vol. 62, pp. 11182-11193.
- Zhang F.-L., Huang Q., Liu J.-Y., Huang M.-D., Xue J.-P. Molecular-Target-Based Anticancer Photosensitizer: Synthesis and *in vitro* Photodynamic Activity of Erlotinib-Zinc(II) Phthalocyanine Conjugates // *ChemMedChem*, 2015, vol. 10, pp. 312-320.

СТАБИЛИЗАЦИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПАПАИНА ПУТЕМ СОЗДАНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ ГИБРИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Papain Proteolytic Activity Stabilization by Nanosized Hybrid Immobilized Enzyme Obtaining

Лавлинская М.С.^{1,2}, Сорокин А.В.^{1,2}, Ольшанникова С.С.¹, Холявка М.Г.^{1,2}, Юдин Н.Е.¹, Артюхов В.Г.¹

¹ Воронежский государственный университет, г. Воронеж, РФ

² Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ, maria.lavlinskaya@gmail.com

Наноразмерные материалы обладают рядом практически важных свойств, причинами которых является их высокая реакционная способность, обширная площадь поверхности и, конечно же, размерный фактор. Наночастицы различного состава нашли широкое применение в биомедицине, сферы их использования включают как разработку систем адресной доставки лекарственных средств и новых форм препаратов, так и создание контрастных средств для современных методов диагностики. Перспективно их применение и для получения наноразмерных препаратов на основе протеолитических ферментов. Например, папаин (КФ 3.4.22.2) широко используется в терапии кариеса и препаратах для ускорения заживления ран. Чаще всего энзим представлен в нативном состоянии, что ограничивает его функциональность в виду низкой стабильности и автолиза. Использование же формы на основе низкотоксичных наночастиц и папаина может не только сохранить активность энзима, но и повысить его биологическую доступность за счет размерного фактора конечного препарата. В связи с этим, целью настоящей работы является стабилизация протеолитической активности папаина путем создания гибридных препаратов на основе наночастиц хитозана.

В работе использованы дисперсии наночастиц, полученные путем ультразвуковой дезинтеграции суспензии хитозана с молекулярными массами 200 и 350 кДа (ООО «Биопрогресс», РФ) при pH=7.0 с добавлением аскорбиновой кислоты и без нее. Протеолитическую активность свободного и конъюгированного папаина определяли с использованием субстрата азоказеина (Sigma, США).

При комплексообразовании папаина с наночастицами хитозана без добавления аскорбиновой кислоты, активность биокатализаторов по сравнению со свободным ферментом составила 94 и 97 % для полисахаридов с молекулярной массой 200 и 350 кДа, соответственно. Значения активности энзима при его конъюгировании с нанонесителями, полученными в присутствии аскорбиновой кислоты, повысились на 3 и 16 % для хитозана с молекулярными массами 200 и 350 кДа, соответственно.

В ходе выполнения эксперимента по определению остаточной активности свободного и конъюгированного папаина при 37 °С в 0.05 М Трис-НСl буфере с pH 7.5, наблюдалось снижение активности всех образцов в течение семи дней. Растворимый папаин после 168 часов инкубации сохранял 15 % своей каталитической активности, а комплексы с наночастицами хитозанов с молекулярной массой 200 и 350 кДа проявляли 29 и 34 % своей каталитической способности, соответственно. Комплексы папаина с наночастицами хитозанов вне зависимости от присутствия аскорбиновой кислоты были более стабильны, чем свободный фермент, в промежуток времени 4–168 часов.

Таким образом, показано, что использование дисперсий наночастиц хитозана с различной молекулярной массой позволяет повысить стабильность папаина при практически полном сохранении его протеолитической активности. Также стоит отметить, что добавление аскорбиновой кислоты при получении наночастиц способствует повышению активности и стабильности наноразмерных препаратов папаина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 21-74-20053.

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАНОКОМПОЗИТОВ ЗОЛОТА И КОБАЛЬТОВОГО ФЕРРИТА ЛЕГИРОВАННОГО Zn/Ga

Evaluation of Cytotoxicity of Gold Composites Supplemented with Metal-Doped Cobalt Ferrite

Моторжина А.В.¹, Пшеничников С.Е.¹, Малащенко В.В.¹, Йованович С.^{2,3}, Литвинова Л.С.¹,
Панина Л.В.^{1,4}, Родионова В.В.¹, Левада Е.В.¹

¹ Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград, РФ, kateryna.levada@gmail.com

² Институт ядерных наук «Винча» – Национальный институт Республики Сербия, Белградский университет, г. Белград, Сербия

³ Отдел продвинутых материалов, Институт Йожефа Стефана, Любляна, Словения

⁴ Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», г. Москва, РФ

Наноконпозиты представляют собой многофазные твердые материалы, сочетающие в себе различные физические и структурные свойства. Наноконпозиты, являются перспективными материалами для применения в тераностике заболеваний, МРТ, антибактериальной терапии. В данном исследовании мы предлагаем три различных наноконпозита (рис. 1) в качестве потенциальных инструментов для биомедицинских приложений. Наночастицы золота использовались в качестве основы для структуры наноконпозита. К наночастицам золота

прикреплены наночастицы феррита кобальта (CFO) для модификации магнитных свойств. Кроме того, в двух видах нанокompозитов наночастицы CFO, были легированы Zn и Ga, для модификации свойств композитов.

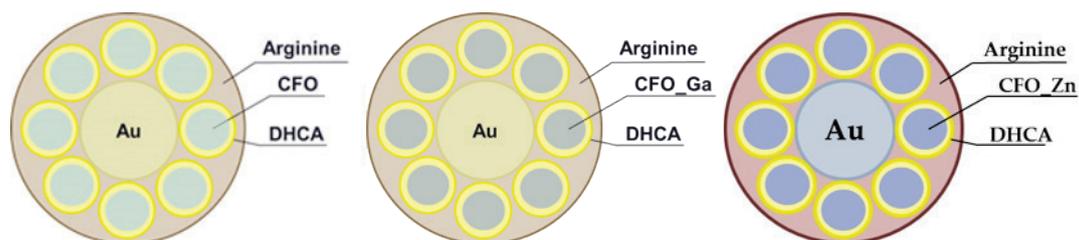


Рисунок 1. Структура нанокompозитов Au(arg):CFO(DHCA), Au(arg):CFO_Zn(DHCA), Au(arg):CFO_Ga(DHCA)

Анализ биосовместимости трех типов нанокompозитов проводили с использованием теста жизнеспособности WST-1, согласно стандартным протоколам и рекомендациям производителя (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Тесты были проведены на клеточной линии Т-лимфобластного лейкоза (Jurkat, Российская коллекция клеточных культур (ИЦ РАН)).

Согласно результатам исследований, все три вида нанокompозитов индуцировали цитотоксический эффект в клетках Jurkat после 24 ч воздействия (рис. 2). Цитотоксический эффект усиливался при повышении концентрации нанокompозитов – при концентрации 100 мкг/мл композиты снижают жизнеспособность клеток Jurkat более чем на 20% ($p < 0,001$). В то же время воздействие при концентрации 10 мкг/мл не оказывает влияния на жизнеспособность клеток.

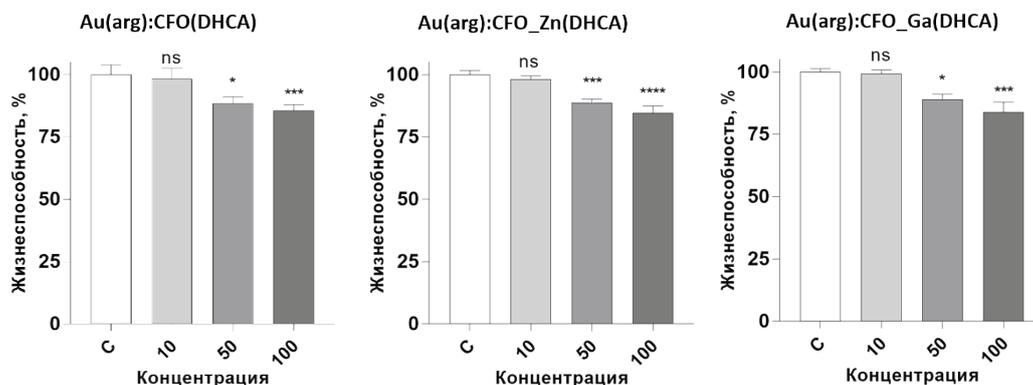


Рисунок 2. Жизнеспособность клеток Jurkat снижается после 24 ч культивирования с нанокompозитами Au(arg):CFO(DHCA), Au(arg):CFO_Zn(DHCA) и Au(arg):CFO_Ga(DHCA) в различной концентрации (10 мкг/мл (10), 50 мкг/мл (50), 100 мкг/мл (100)). Данные нормализованы по значению жизнеспособности контрольных клеток (с) и показаны в виде средних значений \pm SD

На последующих этапах исследования планируется идентификация механизмов цитотоксичности и анализ связи токсических эффектов с особенностями структуры нанокompозитов.

Авторы выражают благодарность к.б.н. Газатовой Н.Д. (Центр иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта) за помощь в реализации экспериментальной части исследования. Исследования выполнены в рамках гранта РФФ 21-72-20158.

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА К АГОНИСТУ АКТИВАЦИИ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИТРОМБОЦИТАРНОЙ ТЕРАПИИ

Evaluation of the Human Blood Platelets Sensitivity to an Activation Agonist by Scanning Flow Cytometry under Conditions of Antiplatelet Therapy

Литвиненко А.Л. Некрасов В.М. Мальцев В.П.

Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, г. Новосибирск, РФ,
roseline.neolis@gmail.com

На сегодняшний день заболевания сердечно-сосудистой системы являются одной из главных причин смертности населения. При этом по сравнению с 2000 годом доля смертей из-за данной группы патологий только возрастает. Данные заболевания тесно связаны с нарушениями в системе гемостаза, что подчёркивает особую

актуальность продолжение проведения исследований в данном направлении. Основной функцией системы гемостаза является остановка кровотечений и поддержание крови в жидком состоянии. Система гемостаза включает в себя тромбоциты – форменные элементы крови, группу белков коагуляции, а также систему, препятствующую распространению свёртывания крови и систему фибринолиза, ответственную за рассасывания тромба после заживления сосуда. Также в последние годы было показано, что тромбоциты не только способствуют остановке кровотечения, но и участвуют в развитии воспалительного ответа, важны при развитии атеросклероза и распространении опухолевых клеток. Это ещё раз показывает необходимость исследования данного элемента крови не только с точки зрения числа, но и с точки зрения оценки выполняемой функции, причём в отсутствие влияния других элементов системы гемостаза.

Золотым стандартом в исследовании функциональных характеристик системы гемостаза остаётся агрегометрия. Однако данный метод исследует влияние агониста активации на систему гемостаза в целом и может оказаться не чувствителен к нарушениям в работе тромбоцитов. Наиболее распространённым рутинным методом исследования тромбоцитов в отсутствие влияния белков коагуляции является метод Култера на основе которого работают многие современные гематологические анализаторы. Данный прибор даёт информацию о количестве тромбоцитов и их распределению по объёму (среднее значение и ширина распределение). Однако этой информации не достаточно для определения реакции тромбоцитов на агонист активации. В работе использовался метод сканирующей проточной цитометрии, позволяющий получать информацию не только о объёме каждого тромбоцита, но и о его форме, а как известно форма тромбоцита является наиболее чувствительным маркером активации и претерпевает значительное изменение в данном процессе.

Благодаря использованию метода сканирующей проточной цитометрии удалось определить не только состояние тромбоцитов в пробе (неактивированные, промежуточное состояние, активированные), но и построить феноменологическую модель данного процесса. Модель включает в себя информацию о состоянии тромбоцитов до забора пробы, максимально возможном состоянии активации, чувствительности тромбоцитов к агонисту активации и предположение о зависимости состояния тромбоцита от количества воздействующего на него агониста активации. Также данная модель позволяет оценить качество проведённой подготовки пробы, что является очень важным при работе с тромбоцитами.

Для оценки влияния антиагрегантной терапии на чувствительность тромбоцитов проводилась работа с двумя антиагрегантами: ацетилсалициловая кислота и клопидогрел. Данные препараты применялись в профилактических дозах коротким курсом. Проводились измерения чувствительности тромбоцитов к аденозинтрифосфату до применения терапии и после. При этом чувствительность к АДФ при применении аспирина увеличилась с $16,382 \pm 0,007$ до $16,5733 \pm 0,0002$, а при применении клопидогрела уменьшилась с $16,366 \pm 0,002$ до $15,967 \pm 0,016$.

Снижение чувствительности тромбоцитов в ответ на аденозиндифосфат при применении клопидогрела является ожидаемым, так как данный препарат блокирует работу рецептора, усиливающего реакцию агрегации в ответ на данный агонист, однако увеличение чувствительности при применении аспирина остаётся не ясным и требует дополнительного исследования.

ПОЛИАМИНЫ И ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ Polyamines And Age-Dependent Diseases

Маклецова М.Г.¹, Рихирева Г.Т.², Вакуленко М.Ю.¹

¹ Донской государственный технический университет, г. Ростов-на-Дону, РФ, *mgm52@bk.ru*

² Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н.Семенова РАН, г. Москва, РФ, *grikhireva@bk.ru*

В настоящее время активно обсуждается роль полиаминов (спермидина и спермина) в патогенезе возраст-зависимых заболеваний: болезни Паркинсона, Альцгеймера, сахарный диабет и др. С возрастом в нервной ткани содержание полиаминов снижается, что играет ведущую роль в возрастных нарушениях памяти (Liu et al., 2008, Маклецова и др., 2013). Установлена четкая корреляционная зависимость между уровнем спермидина в крови и когнитивными показателями при таких заболеваниях как болезнью Альцгеймера и Паркинсона (Paker et al., 2020, Makletsova et al., 2019). Введение полиаминов позволяет избежать когнитивные нарушения и/или повлиять на патогенетические процессы, связанные с прогрессированием патологий. Нейропротекторное действие экзогенно введенного спермидина показано в опытах на животных при моделировании таких патологий как болезни Хантингтона, Альцгеймера, Паркинсона, черепно-мозговой травме, воспалительных заболеваниях, связанных с потерей памяти и др. (Ramos-Molina B., Quiro-Ortuno M.I., 2019). Одним из молекулярных механизмов данного положительного эффекта спермидина на функциональную активность мозга является активация аутофагии, т.н. процесса «очистки» от деформированных белков и органелл, а также антиоксидантный эффект полиаминов. Благодаря этому перорально введенный спермидин продлевает продолжительность жизни, снижает гипертрофию сердца, обладает кардиопротекторными и нейропротекторными свойствами (Eisenberg et al., 2016, Schroeder et al., 2021).

Особое внимание исследователей молекулярно-клеточных механизмов нейродегенеративных заболеваний уделяется оценке уровня окислительного стресса (ОС), который развивается при дисбалансе между патологическим избыточным накоплением АФК и дефицитом антиоксидантных систем. В последнее время активно изучается роль MetHb в развитии ОС, обсуждается возможность использования определения содержания MetHb как маркера ОС. Ранее нами были представлены результаты исследования влияния полиаминов на содержание MetHb при индукции ОС (Маклецова и др., 2021).

Дегенерация межпозвоночных дисков (ДМД) является основной причиной болей в пояснице, которые становятся распространенным возрастным заболеванием. Показано, что введение спермидина нормализует метаболизм полиаминов, подавляет окислительный стресс и, следовательно, задерживает прогрессирование ДМД у старых мышей (Хуэй Че et al., 2022).

С 2018 года в ряде Европейских стран были запущены пилотные проекты, направленные на оценку влияния диеты с высоким содержанием полиаминов на когнитивные процессы (Hirano et al., 2021). Первые результаты показали высокую их эффективность. Важно отметить, что в 2021 году Wirth с соавтор. показали способность спермидина сохранять длину теломеров, тем самым оказывая влияние на механизмы старения. Таким образом, очевидно, что в настоящее время экзогенное введение полиаминов можно рассматривать как эффективный способ коррекции возраст-зависимых нарушений, так и «защитой» от старения.

ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА УРОВЕНЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO* ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТАХ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА

The Effect of Water-Soluble Derivatives of Fullerene C₆₀ on the Level of Reactive Oxygen Species in Human Embryonic Fibroblast Cells (HELFs) *in vitro*

Малиновская Е.М.¹, Савинова Е.А.¹, Сергеева В.А.¹, Ершова Е.С.¹, Проскурнина Е.В.¹, Каменева Л.В.¹, Долгих О.А.¹, Вейко Н.Н.¹, Краевая О.А.², Трошин П.А.², Костюк С.В.¹

¹ МГНЦ, г. Москва, РФ, *m.elena.0402@gmail.com*

² ИПФХ РАН, г. Черноголовка, РФ

Манипуляции с радикалами, находящимися на поверхности фуллера, создали разнообразные популяции водорастворимых производных фуллеренов (ВРПФ), проявляющих различные свойства в отношении биологических объектов, в том числе, культивируемых *in vitro* клеток человека. Выявлено, что данные соединения вызывают активацию ряда генов в клетках [1]. При этом ответ клетки зависит не только от типа клетки, но и от природы функциональных групп производных фуллеренов.

В данной работе изучалось влияние двух производных C₆₀, модифицированных аминокислотными заместителями на прооксидантную активность эмбриональных фибробластов легких человека (ФЛЭЧ). Заместитель Ф1-серин, Ф17 – калиевая соль фенилаланина, фуллерен связан с заместителями по аминогруппе.

В эксперименте *in vitro* использованы культуры ФЛЭЧ из коллекции клеточных культур ФГБНУ «МГНЦ» 2-6-го пассажей. Производные фуллеренов C₆₀ синтезировали из хлорфуллеренов C₆₀Cl₆, как описано в работах [2, 3]. Для определения токсичности соединений в отношении культур клеток проводили стандартный МТТ-тест с детекцией на планшетном ридере («EnSpire», Финляндия). Уровень активных форм кислорода (АФК) определяли с помощью красителя 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA) («Molecular Probes/Invitrogen», «СА», США), который под действием АФК окисляется с образованием флуоресцирующего 2,7-дихлорфлуоресцеина (DCF), детекцию проводили на планшетном ридере («EnSpire», Финляндия). Уровень экспрессии белка NOX4 определяли методом проточной цитофлуориметрии (Partec CyFlow® ML, Германия). Уровень экспрессии гена *NOX4* - методом ПЦР в реальном времени. Статистическую обработку проводили с использованием программы Excel Microsoft Office, Statistica 6.0, StatGraph.

МТТ-тест показал, что диапазон концентраций 0,2 нМ-0,4 мМ исследуемых соединений безопасен для клеток. Исследовали скорость образования активных форм кислорода (АФК) в культуре клеток ФЛЭЧ, культивируемых с Ф1 и Ф17. В концентрации 0,4 мкМ соединения вводили во флаконы с клетками ФЛЭЧ, инкубация проводилась в CO₂-инкубаторе в течение 3 и 24 часов. В качестве контроля использовали клетки без воздействия фуллеренов и среда без клеток (фон). Показали, что при воздействии обоих соединений в концентрации 0,4 мкМ на ФЛЭЧ уровень АФК снижается на протяжении 3 часов после инкубации, но через 24 часа значительно возрастает – в 2-4 раза (p<0,001).

Одним из основных продуцентов АФК в фибробластах является фермент NOX4 – NADPH-оксидаза. Исследовали влияние Ф1 и Ф17 на регуляцию экспрессии NOX4. Уровень экспрессии мРНК фермента NOX4 при добавлении исследуемых соединений в течение 3 часов практически не отличается от уровня контроля, но через 24 часа увеличивается в 1,6-1,8 раз (p<0,01). Уровень белка NOX4 при введении производных в первые 3 часа не отличается от контроля, через 24 часа уровень белка NOX4 в клетках ФЛЭЧ возрастает в 1,8-2,4 раза (p<0,01). Обнаружена прямая корреляция между повышением уровня АФК и увеличением экспрессии гена *NOX4* в ФЛЭЧ.

При введении исследуемых производных в клеточную среду они активно поглощают АФК за счет двойных сопряженных связей в каркасе. В ответ на снижение уровня АФК после введения Ф1 и Ф17 спустя 24 часа

повышается транскрипционная активность гена *NOX4*, возрастает уровень АФК в клетках. Можно предположить, что применение ингибиторов гена *NOX4* может привести к пролонгированию антиоксидантного действия производных фуллеренов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФ: проект 19-13-00411-П (синтез Ф1 и Ф17) и проект 18-15-00437 (влияние Ф1 и Ф17 на ФЛЭЧ).

1. Sergeeva V., Kraevaya O., Ershova E., Kameneva L. et al. Antioxidant properties of fullerene derivatives depend on their chemical structure: a study of two fullerene derivatives on HELFs // *Oxid Med Cell Longev*, 2019, vol. 2019, p. 4398695.

2. Kornev A.B., Khakina E.A., Troyanov S.I., Kushch A.A., Peregudov A., Vasilchenko A., Deryabin D.G., Martynenko V.M., Troshin P.A. Facile preparation of amine and amino acid adducts of [60] Fullerene using chlorofullerene C₆₀Cl₁₆ as a precursor // *Chem. Commun*, 2012, vol. 48, pp. 5461-5463.

3. Fedorova N.E., Klimova R.R., Tulenev Y.A., Chichev E.V., Kornev A.B., Troshin P.A., Kushch A.A. Carboxylic fullerene C₆₀ derivatives: efficient microbicides against herpes simplex virus and cytomegalovirus infections *in vitro* // *Mendeleev Commun*, 2012, vol. 22, pp. 254-256.

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ЦИСТАМИНА И ЦИСТИНА НА ТРАНСПОРТ Na⁺ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

Modulating Effect of Cystamine and Cystine on Na⁺ Transport in Frog Skin

Мельницкая А.В.¹, Крутецкая З.И.¹, Антонов В.Г.², Крутецкая Н.И.¹, Бадюлина В.И.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, РФ, *avmelnitskaya@yandex.ru*

² Военно-Медицинская академия им. С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, РФ

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов трансэпителиального транспорта ионов. Транспорт Na⁺ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие различные Na⁺-транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки, которые являются мишенью для окислительного стресса [1,2].

Дисульфидсодержащие агенты цистин (цистеин дисульфид) и цистамин (цистинамин) – важные внутриклеточные антиоксиданты и радиопротекторы [3,4]. В то же время, влияние окислителей и восстановителей на транспорт Na⁺ в нативных эпителиальных системах, таких как эпителий кожи лягушки, практически не изучено. В связи с этим, целью настоящего исследования являлось изучение влияния цистамина и цистина на транспорт Na⁺ в эпителии кожи лягушки.

Эксперименты проводили на самцах лягушки *Rana temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшка лягушки срезают 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. Транспорт Na⁺ оценивали как амилоридчувствительный I_{SC}.

Показано, что обработка кожи лягушки цистамином или цистином в концентрации 10 мкг/мл снижает электрические параметры кожи лягушки. Наиболее вероятно предположить, что действие дисульфидсодержащих агентов на транспорт Na⁺ связано с их способностью взаимодействовать с функционально значимыми остатками цистеина Na⁺-транспортирующих белков. Нами обнаружено также, что предварительная обработка кожи в течение 20 мин дитиотреитолом (ДТТ), восстанавливающим дисульфидные связи в белках, в концентрации 1 мМ, существенно снижает ингибирующее действие цистина и цистамина на трансэпителиальный транспорт Na⁺. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Влияние окисляющих и восстанавливающих агентов на транспорт Na⁺ показано для ряда эпителиальных тканей [5, 6].

Таким образом, нами показано, что транспорт Na⁺ в эпителии кожи лягушки чувствителен к окислительному стрессу и модулируется дисульфидсодержащими окисляющими агентами, такими как цистамин и цистин. При этом влияние цистамина и цистина на транспорт Na⁺ в эпителии кожи лягушки опосредовано их взаимодействием с функционально важными остатками цистеина Na⁺-транспортирующих белков.

1. Boldyrev A.A., Bulygina E.R. Na/K-ATPase and oxidative stress // *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1997, vol. 834, pp. 666-668.

2. Firsov D., Robert-Nicoud M., Gruender S., Schild L., Rossier B.C. Mutational analysis of cysteine-rich domain of the epithelium sodium channel (ENaC): Identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface // *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, pp. 2743-2749.

3. Coor C., Salmon R.F., Quigley R., Marver D., Baum M. Role of adenosine triphosphate (ATP) and NaKATPase in the inhibition of proximal tubule transport with intracellular cystine loading // *J. Clin. Invest.*, 1991, vol. 87, pp. 955-961.
4. Lesort M., Lee M., Tucholski J., Johnson G.V.W. Cystamine inhibits caspase activity // *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, pp. 3825-3830.
5. Markadieu N., Crutzen R., Blero D., Erneux Ch., Beauwens R. Hydrogen peroxide and epidermal growth factor activate phosphatidylinositol 3-kinase and increase sodium transport in A6 cell monolayers // *Amer. J. Physiol.*, 2005, vol. 288, pp. 1201-1212.
6. Wang H.-Ch., Zentner M.D., Deng H.-Y., Kim K.-J., Wu R., Yang P.-Ch., Ann D.K. Oxidative stress disrupts glucocorticoid hormone-dependent transcription of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel α -subunit in lung epithelial cells through erk-dependent and thioredoxin-sensitive pathways // *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, pp. 8600-8609.

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОЛЕПТИКОВ НА Ca^{2+} -ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ГЛУТОКСИМОМ И МОЛИКСАНОМ В ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГАХ

Neuroleptics Attenuate Ca^{2+} Responses Induced by Glutoxim and Molixan in Peritoneal Macrophages

Миленина Л.С.¹, Крутецкая З.И.¹, Антонов В.Г.², Крутецкая Н.И.¹, Бадюлина В.И.¹, Симонян А.О.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, РФ

² Военно-Медицинская академия им. С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, РФ, l.milenina@spbu.ru,
z.krutetskaya@spbu.ru

Галоперидол (производное бутирофенона) и производные фенотиазина хлорпромазин (ХП, аминазин, торазин) и трифлуоперазин (ТФП, трифтазин, стелазин) относятся к первому поколению типичных нейролептиков (антипсихотических агентов) и имеют долгую историю использования в клинике для терапии шизофрении и других психических заболеваний [1]. Известно многогранное влияние этих нейролептиков на клеточные процессы. Так, выявлено высокое сродство типичных нейролептиков к рецепторам сигма-1 [2]. Рецепторы сигма-1 – повсеместные многофункциональные лигандрегулируемые молекулярные шапероны в мембране эндоплазматического ретикулума, имеющие уникальную историю, структуру и фармакологический профиль. Выполняя функции шаперонов, рецепторы сигма-1 модулируют широкий спектр клеточных процессов в норме и патологии, включая процессы Ca^{2+} -сигнализации [3].

Фармакологические аналоги окисленного глутатиона глутоксим® (динатриевая соль окисленного глутатиона с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) и моликсан® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина) используются как иммуномодуляторы и цитопротекторы в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний [4]. Ранее нами было впервые показано, что глутоксим и моликсан увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргинчувствительных Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы [5]. Для выявления участия рецепторов сигма-1 во влиянии глутоксима и моликсана на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах и в регуляции процессов Ca^{2+} сигнализации в макрофагах в целом, исследовали влияние лигандов рецепторов сигма-1 на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые глутоксимом и моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы.

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar на автоматизированной установке для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM.

Обнаружено, что лиганды рецепторов сигма-1 нейролептики галоперидол, ХП и ТФП подавляют обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимом и моликсаном в перитонеальных макрофагах. Так, предварительная инкубация макрофагов с 30 мкг/мл галоперидола в течение 10 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима приводила к значительному подавлению как мобилизации Ca^{2+} из депо (на $50,3 \pm 8,4\%$, $n = 7$; $P < 0,05$), так и последующего депозависимого входа Ca^{2+} в клетку (на $54,5 \pm 9,5\%$, $n = 7$; $P < 0,05$), индуцируемых глутоксимом. Преинкубация клеток с 25 мкг/мл ХП в течение 10 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима также приводила к значительному подавлению как мобилизации Ca^{2+} из депо (на $58,5 \pm 4,6\%$, $n = 7$; $P < 0,05$), так и последующего депозависимого входа Ca^{2+} в клетки (на $59,1 \pm 6,1\%$, $n = 7$; $P < 0,05$). Преинкубация макрофагов с 2 мкг/мл ТФП в течение 10 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима вызывала подавление фазы мобилизации Ca^{2+} из депо (на $36,2 \pm 5,7\%$, $n = 8$; $P < 0,05$) и депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги (на $60,7 \pm 7,1\%$, $n = 7$; $P < 0,05$), вызываемых глутоксимом. Сходные результаты были получены в экспериментах по влиянию галоперидола, ХП и ТФП на Ca^{2+} -ответы, вызываемые в макрофагах 100 мкг/мл моликсана. Кроме того, выявлено, что добавление 50 мкг/мл галоперидола на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцированного глутоксимом или моликсаном, вызывает значительное (на $51,4 \pm 9,0\%$, $n = 12$; $P < 0,05$) подавление депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги.

Полученные данные свидетельствуют о возможном участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, вызываемом глутоксимом или моликсаном и приводящем к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах, а также об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах. Результаты указывают также

на нежелательность совместного применения в клинической практике препаратов глутоксим или моликсан и нейролептиков галоперидол, ХП и ТФП.

1. Ayano G. First generation antipsychotics: pharmacokinetics, pharmacodynamics, therapeutic effects and side effects: a review // Res. Rev. J. Chem., 2016, vol. 5, pp. 53-63.
2. Tam S.W., Cook L. Sigma opiates and certain antipsychotic drugs mutually inhibit (+)-[3H]SKF 10,047 and [3H] haloperidol binding in guinea pig brain membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, vol. 81, pp. 5618-5621.
3. Schmidt H.R., Kruse A.C. The molecular function of σ receptors: past, present, and future // Trends Pharmacol. Sci., 2019, vol. 40, no. 9, pp. 636-654.
4. Sokolova G.B., Sinitsyn M.V., Kozhemiakin L.A., Perel'man M.I. Glutoxim in the complex treatment of tuberculosis // Antibiot. Khimioter., 2002, vol. 47, no. 2, pp. 20-23.
5. Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The effect of oxidized glutathione and its pharmacological analogue glutoxim on intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages // Cell Tiss. Biol., 2008, vol. 2, no. 3, pp. 322-332.

ФЕНОМЕН АУТОМИКРОБИОТЫ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОМ ЭФФЕКТЕ «МЕТОДА ШЕВЧЕНКО», ВЫЯВЛЯЕМЫЙ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ НАТИВНОЙ КРОВИ

The Autobiota Phenomenon in Antitumor Effect of "Shevchenko Method" Detected by Fluorescent Probing of Native Blood

Морозова Г.И.¹, Лопатина О.А.², Аношин А.А.¹

¹ Российский университет дружбы народов, г. Москва, РФ, gimorozova@mail.ru

² НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, г. Москва, РФ

За последние годы в серии исследований установлено, что бактерии являются частью опухолевого микроокружения, причем, большинство из них расположено внутри клеток. Так оказалось, что микробиома опухоли поджелудочной на 25% совпадает с аутомикробиотой кишечника, но есть и уникальные бактерии [1]. Кишечная микробиота способна активировать CD8⁺ Т-клетки и сопряжённые макрофаги, которые играют ключевую роль в противоопухолевой защите. Этот системный эффект, вероятно, осуществляется за счёт циркуляции особых метаболитов, продуцируемых кишечной микробиотой. За последние годы в нашей стране разработан метод трансплантации фекальной микробиоты, который применяется в онкогематологии для нормализации кишечной микробиоты у пациентов. В связи с этим актуальна задача системного контроля за состоянием и локализацией аутомикробиоты человека и активности его иммунных клеток для обеспечения эффективного управления микробиотой в терапевтических целях.

Такую возможность в принципе можно реализовать на основе цитофизического метода анализа крови, витально окрашенной флуоресцентным полихроматическим зондом-катионом ДСМ [2]. В борьбе с раком многие годы популярен народный метод, развитый Н.В. Шевченко (МШ) [3], согласно которому в целях профилактики и адаптации при онкотерапии используется прерывистая схема приёма (перорально) диспергированной смеси нерафинированного подсолнечного масла и 40% водки в равных пропорциях (по 30 мл). Эффективность этого метода до сих пор объясняли антиоксидантным действием полиненасыщенных жирных кислот в составе масла, которое в диспергированной форме проникает в раковые клетки и способствует их гибели путем стимулированного апоптоза. Однако, в наших исследованиях под люминесцентным микроскопом образцов периферической крови здоровых доноров и онкобольных, взятой через 30 мин после приёма смеси по МШ, были обнаружены сферулы типа липосом (ЛПС) размером 3-8 мкм с зеленой флуоресценцией ДСМ в их липидных оболочках. При этом наблюдается феномен внедрения единичных живых аутобактерий (типа E.coli) внутри ЛПС, которые могут служить контейнерами для их транспортировки.

Цель данной работы – исследование энергетического состояния аутобактерий (микробиоты) и их роли в обеспечении эффективности МШ на основе флуоресцентного зондирования крови с помощью ДСМ. Исследовали образцы витальных мазков флуорохромированной крови здоровых доноров (10 чел.) и крови прооперированных онкобольных (7 чел) с разной локализацией опухолей (легкие, ЖКТ) на фоне последующего применения МШ в течение 1-2 лет в прерывистом режиме. Активность бактерий и митохондрий иммунных клеток в цельной крови оценивали по интенсивности флуоресценции катионного зонда ДСМ, накопленного в клетках соответственно уровням их электрических мембранных потенциалов [2] согласно теории Нернста.

В ходе сравнительного флуоресцентного зондирования образцов в крови онкобольных обнаружены характерные капсулированные остатки микрогистофрагментов (МГФ) с размерами 50-120 мкм, содержащие активные бактерии E.coli с жёлтой флуоресценцией зонда, часто атакованные нейтрофилами и лимфоцитами. Наиболее выражен этот феномен у пациента с раком легких после 1 месяца перерыва в приёме смеси по МШ. В этом случае в мазке крови выявляются крупные капсулы с плотной утолщённой белково-липидной оболочкой, заполненные колонией подвижных энергизированных бактерий, а снаружи образуется плотный слой активных нейтрофилов. На основе анализа результатов этих исследований предполагаются следующие фазы эффекта

разрушения опухоли с участием аутомикробиоты: медленное поступление суспензии ЛПС, содержащих единичные аутобактерии, в кровь и затем в опухолевую зону; проникновение ЛПС в раковые клетки периферийного слоя опухоли, утилизация ЛПС; высвобождение и размножение аутобактерий внутри опухоли, части которой в итоге капсулируются, а изменение биохимии поверхности привлекает активные лимфоциты и макрофаги; опухоль разрушается послойно, часть микрокапсул проникает в кровь. В заключении важно отметить, что эффективность терапии с участием микробиоты зависит от соотношения скоростей размножения аутобактерий и онкоклеток в опухоли. Поэтому перспективно математическое моделирование этих процессов.

1. Erick Riquelme, Yu Zhang, Liangliang Zhang, Maria Montiel, Michelle Zoltan, et. al. Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes // Cell, 2019, vol. 178, pp. 795-806.

2. Морозова Г.И., Онищенко Н.А., Оржеховская И.Г. и др. Микрофлуорометрический метод идентификации и оценки физиологического состояния лимфоцитов и нейтрофилов в цельной нативной крови с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ (в эксперименте и клинике) // Гематология и трансфузиология, 1997, т. 42, № 3, с. 43-47.

3. Шевченко Н.В., Павличенко В.С. Патент RU93054837А. Лечебный препарат и способ его применения. 1993.

НАНОКОМПОЗИТ КОБАЛЬТОВЫЙ ФЕРРИТ/ЗОЛОТО ДЛЯ ФОТОТЕРМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Cobalt Ferrite/Gold Nanocomposite for Photothermal Treatment

Моторжина А.В.¹, Пшеничников С.Е.¹, Йованович С.², Аникин А.А.¹, Беляев В.К.¹, Родионова В.В.¹, Панина Л.В.¹, Левада Е.В.¹

¹ Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград, РФ, motorzhina.anna@yandex.ru

² Институт ядерной физики Винча, Университет Белграда, г. Белград, Сербия

Наноккомпозит, состоящий из наночастиц золота, покрытых аргинином, окруженных наночастицами феррита кобальта, покрытыми дигидрокофеиновой кислотой, был впервые синтезирован и исследован в качестве потенциального агента для фототермической обработки клеток рака печени Huh7.

Комплексное изучение структурных свойств и морфологии частиц наноккомпозита показывает узкое распределение по размерам, а также структурную и морфологическую стабильность во времени [1]. Наночастицы феррита кобальта определяют суперпарамагнитные свойства наноккомпозита, что повышает его устойчивость в водных суспензиях.

Перед тестированием фототермии первичный цитотоксический эффект наноккомпозита исследовали на клеточной линии Huh7 с помощью теста WST-1. Результаты теста показывают усиление цитотоксического эффекта с увеличением времени выдержки клеточной культуры с наноккомпозитом и его концентрации (рис. 1).

Фототермические свойства наноккомпозита исследовались при длине волны около 800 нм, что соответствует области оптической прозрачности тканей. Для этого наноккомпозит разводили в клеточной среде DMEM и добавляли в клеточную суспензию в 3-х концентрациях – 10, 50 и 100 мкг/мл. После 24-часового воздействия наноккомпозита, клеточную суспензию выдерживали под действием лазера с длиной волны 800 нм и измеряли повышение температуры клеточной суспензии с помощью экспериментальной установки. Влияние фототермической обработки на клеточную суспензию также исследовали с помощью теста WST-1. Предполагается, что цитотоксическое действие на раковые клетки будет усиливаться при сочетании с фототермической терапией.

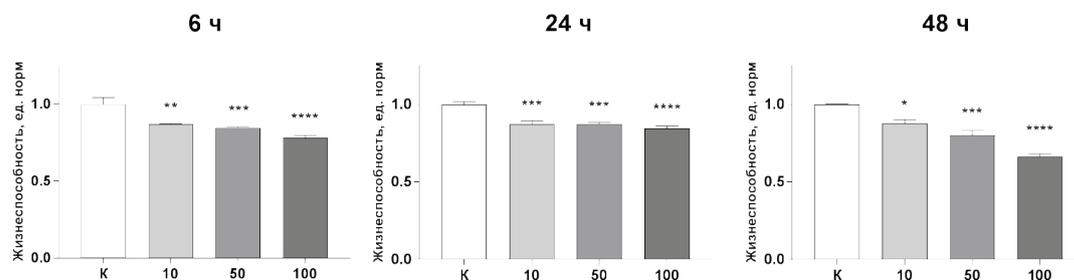


Рисунок 1. Относительная жизнеспособность клеточной линии Huh7 после выдержки с наноккомпозитом в течение 6, 24, 48 часов в нормированных единицах к контрольным данным. Показанные результаты представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение. Столбцы, отмеченные звездочками, показывают результаты, которые статистически отличались от контроля: * $P < 0,05$, * $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа One-way ANOVA

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 21-72-200158.

1. Motorzhina A.V. et al. Innovative Gold/Cobalt Ferrite Nanocomposite: Physicochemical and Cytotoxicity Properties // Processes, 2021, vol. 9, p. 2264, doi: 10.3390/pr9122264.

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕРХВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ПОЛИЭТИЛЕНА ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЕЙ МЕТОДАМИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ Investigation of Ultrahigh Molecular Weight Polyethylene for Medical Purposes by Raman Scattering Methods

Мутовкин П.А.¹, Веляев Ю.О.¹, Мосунов А.А.¹, Василец В.Н.², Евстигнеев М.П.¹, Завьялова О.С.¹, Рыбакова К.А.¹

¹ Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ, aamosunov@sevsu.ru

² Филиал ФГБУН Института энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Московская обл., РФ

Одними из распространённых и актуальных для человека проблем со здоровьем являются болезни и травмы суставов и позвоночника. В зависимости от стадии и формы болезни при лечении таких проблем может использоваться консервативное лечение, однако довольно часто медицинским работникам приходится прибегать к замене повреждённых участков суставов или костей на их искусственные аналоги – эндопротезы. [1]. Материалы, которые используются при таком способе лечения соответствующих болезней, должны обладать рядом параметров, главными из которых являются биологическая инертность и совместимость с окружающими живыми тканями. Кроме того, данные материалы должны соответствовать необходимым трибологическими характеристиками, от которых напрямую зависит срок эксплуатации устанавливаемого имплантата [2].

К сожалению, на сегодняшний день не существует материалов, которые способны идеально заменить человеческие ткани, входящие в состав подвижных частей опорно-двигательного аппарата человека, при этом под «идеальностью» замены подразумевается не только абсолютная биосовместимость материала, но и его полная сохраняемость и неизменность на протяжении всего жизненного цикла человека. Исследования показывают, что максимально для этих целей подходят пары таких материалов, как, например, металл – сверхвысокомолекулярный полиэтилен (СВМПЭ) [3]. Однако все известные на сегодняшний день промышленные образцы СВМПЭ подвержены износу, который приводит к необходимости замены данного имплантата на новый через некоторое время. Такое вмешательство обусловлено тем, что по мере своей эксплуатации внутри сустава СВМПЭ истирается, в процессе чего образуется микростружка, которая инициирует воспалительные и другие деструктивные процессы в области установленного имплантата, при этом в худшем случае происходит полное асептическое рассасывание всех элементов костной ткани (остеолиз) [4]. Стоит отметить, что подобные вторичные вмешательства негативно сказываются на здоровье человека негативно и хуже переносятся уже более возрастными, по отношению к первой замене сустава, больными. Соответственно, повышение прочностных характеристик данного материала является актуальной задачей, востребованной современным медицинским сообществом, особенно в связи с ростом населения планеты и увеличением числа запросов на лечение заболеваний опорно-двигательной системы, касающихся эндопротезирования отдельных её частей.

Нами была предложена схема повышения прочности СВМПЭ на износ за счет его обработки в атмосферной и вакуумной гелиевых плазмах, что приводило к образованию дополнительных поверхностных межслоевых углеродных сшивок между слоями полимерных звеньев СВМПЭ [5] и, тем самым, увеличивало прочностные характеристики его поверхности. Кроме того, нами был получен образец материала, где поверхность СВМПЭ была модифицирована оксидом графена (ОГ). Наибольшую эффективность показал образец с нанесённым слоем ОГ в 755 мкм, о чём свидетельствуют данные измерений коэффициентов трения на машине трения MXD-02. Кроме того, измерения, проведенные методами атомно-силовой микроскопии и наноиндентирования на оборудовании ЦКП «Молекулярная структура вещества» ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет и Томского регионального центра коллективного пользования Национального исследовательского Томского государственного университета, доказали, что проводимая нами обработкакратно повышает прочность поверхностного слоя СВМПЭ, что также коррелирует с данными, полученными с помощью исследования указанных выше образцов методом комбинационного рассеяния.

Таким образом, предлагаемый нами вариант обработки и модификации поверхности значительно улучшает трибологические характеристики исходного СВМПЭ и позволит увеличить его временные эксплуатационные рамки.

1. Salvati E.A., Artz T., Aglietti P., Asnis S.E. Endoprostheses in the treatment of femoral neck fractures // Orthopedic Clinics of North America, 1974, vol. 5, no. 4, pp. 757-777.

2. Pinchuk L.S., Nikolaev V.I., Tsvetkova E.A., Goldade V.A. Materials for joint endoprostheses // Tribology and Interface Engineering Series, 2006, vol. 50, pp. 43-73.

3. Bistolfi A., Giustra F., Bosco F. Ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) for hip and knee arthroplasty: The present and the future // *Journal of Orthopaedics*, 2021, vol. 25, pp. 98-106.
4. Yang D., Qu S., Huang J., Cai Z., Zhou Z. Characterization of alendronate sodium-loaded UHMWPE for anti-osteolysis in orthopedic applications // *Materials Science and Engineering: C*, 2012, vol. 32, no. 2, pp. 83-91.
5. Vasilets V.N., Velyaev Yu., Mosunov A., Evstigneev M., Effect of atmospheric pressure plasma in inert gases on orthopedic ultra-high molecular weight polyethylene // *Key Engineering Materials*, 2022, vol. 910, pp. 795-801.

STRUCTURE OF SILK FIBROIN NANO-PARTICLES: CHARACTERIZATION OF HYDROPHOBIC PATCHES

Mammedzade A.M., Mamedova A.J., Gasymov O.K.

Institute of Biophysics of ANAS, Baku, Azerbaijan, oktaygasimov@gmail.com

Protein nanoparticles (pNP) are widely used for drug delivery in various diseases. By controlling the parameters, such as size, properties of hydrophobic patches, etc., pNPs can be tuned for drug delivery to specific organs. In this study, we have fabricated silk fibroin nanoparticles (SFNP) the average size of which is relevant for the most therapeutic applications. Far-UV circular dichroism spectroscopy (CD) measurements were used to characterize the secondary structure of SFNP. A fluorescent probe 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) was used to characterize the hydrophobic patches of SFNP. ANS emission λ_{\max} and lifetime values are well correlated with the hydrophobicity of protein patches [1,2]. ANS emission decays across the emission spectra with a 5 nm interval were used to build decay-associated spectra (DAS). For DAS, the set of ANS emission decay curves was subjected to Global analysis. Fibroin was purified from the silk of *Bombyx mori* using a widely used method [3]. SFNP (about 120 nm) was fabricated by jetting the solution of silk fibroin into 70% acetone [3].

Far-UV CD of the SFNP solution is drastically different from that of the SF solution (random coil) and exhibits a negative couplet characterized with 222 nm and 205 nm. The spectrum is characteristic for beta-sheet structure. Secondary structure estimation from far-UV CD spectra using the method CDSSTR has yielded 47% beta-structure, 11% turns, and 39% random coil.

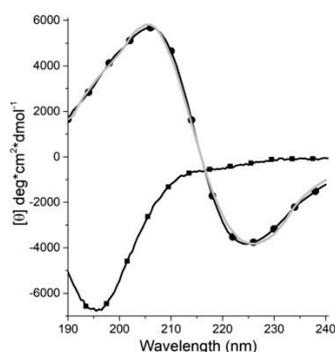


Figure 1. Far-UV CD spectra of SF solution in various states. Solid curves with square and circle symbols represent freshly prepared SF and SFNP solutions, respectively. The Gray solid curve is a calculated spectrum

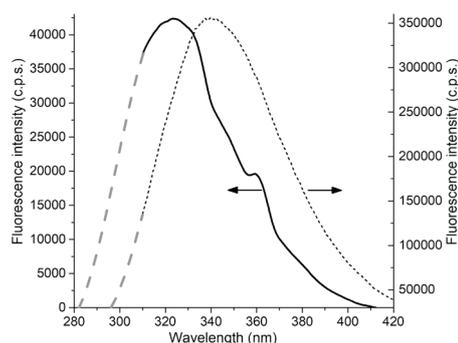


Figure 2. Trp emission spectra of SF in various states. Solid and dotted lines represent SFNP and freshly prepared SF solutions, respectively. Dashed lines were constructed from the best fit to log-normal function. For selective excitation of Trp residues, the excitation wavelength was taken as 295 nm

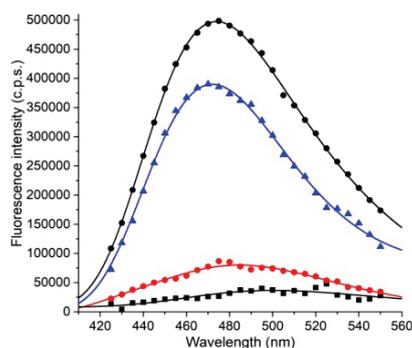


Figure 3. Steady-state fluorescence (black dots) of ANS- NPSF complex and its DAS components (blue triangle- 14.8 ns, red dots- 4.2 ns and black squares- 0.8 ns)

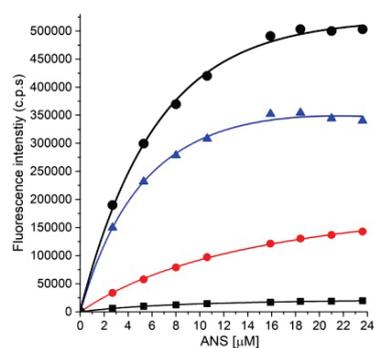


Figure 4. ANS binding to NPSF deconvoluted to the lifetime component. Steady-state ANS emission data were measured at 470 nm. The identities of the symbols are the same as in Fig. 1.

Trp of SFNP demonstrates blue-shifted emission at $\lambda_{\max}=324.0$ nm compared to that of freshly prepared SF solution ($\lambda_{\max}=340.0$ nm). The Quantum yields of Trp emissions in SFNP and SF solutions are about 0.005 and 0.056, respectively. The blue-shifted emission of Trp indicates that Trp residues are buried in the SFNP structure. Thus, during nano-particle formation, SF adopts a beta-sheet structure in which native Trp residues become buried.

The emission of ANS-SFNP complexes shows a maximum of about 474.0 nm indicative of a hydrophobic environment for ANS (Figure 3). The emission of ANS-SFNP could be characterized by three-lifetime components 0.8 ns, 4.2 ns and 14.8 ns, each of which is characterized by individual DAS λ_{\max} . To reveal the binding properties of these sites, a steady-state binding curve of ANS were deconvoluted into lifetime components (Figure 4). The dissociation constants for ANS binding sites in SFNP were found to be 5.9 ± 0.3 μM , 8.3 ± 0.4 μM and 15.0 ± 0.7 μM associated with 14.8 ns, 4.2 ns and 0.8 ns, respectively. Overall, data indicate that SFNP possesses binding sites that have distinct binding affinities, and hydrophobicity. Thus, SFNP has the potential for delivery of drugs of various types.

1. Gasymov O.K., Glasgow B.J. // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics, 2007, vol. 1774, no. 3, pp. 403-411.

2. Guliyeva A.J., Gasymov O.K. // Biochem. Biophys. Reports, 2020, vol. 24, no. August.

3. Rockwood D.N., Preda R.C., Yucel T., Wang X., Lovett M.L., Kaplan D.L. // Nat Protoc., 2011, vol. 6, no. 10, pp. 1612-1631.

КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ СУЛЬФИДА КАДМИЯ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЛКОВ-ПОРИНОВ, КАРРАГИНАНОВ, ХИТОЗАНОВ И ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ Quantum Dots of Cadmium Sulphide Produced with the Use of Proteins-Porins, Carrageanans, Chitosans, and Lipopolosaccharides

Набережных Г.А., Новикова О.Д.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова, г. Владивосток, Россия,
naber1953@mail.ru

Квантовые точки (КТ) представляют собой новое поколение флуорохромов, обладающих значительными преимуществами по сравнению с традиционными органическими красителями. КТ на основе CdS являются перспективными материалами для оптики, оптоэлектроники, биологии и медицины [1-2]. Большой научный и практический интерес представляют КТ в виде коллоидных растворов. Квантовые точки CdS синтезированы методом химической конденсации в водном растворе с использованием белков-порин иерсиний (*Yersinia pseudotuberculosis*), положительно (хитозан) и отрицательно (каррагинан, липополисахарид) заряженные полисахаридов. Максимумы спектров эмиссии для всех образцов составлял 450 нм, что свидетельствует об одинаковом размере КТ, т.е. определяется размером «ячеек» сетчатой матрицы, ограничивающих размер КТ.

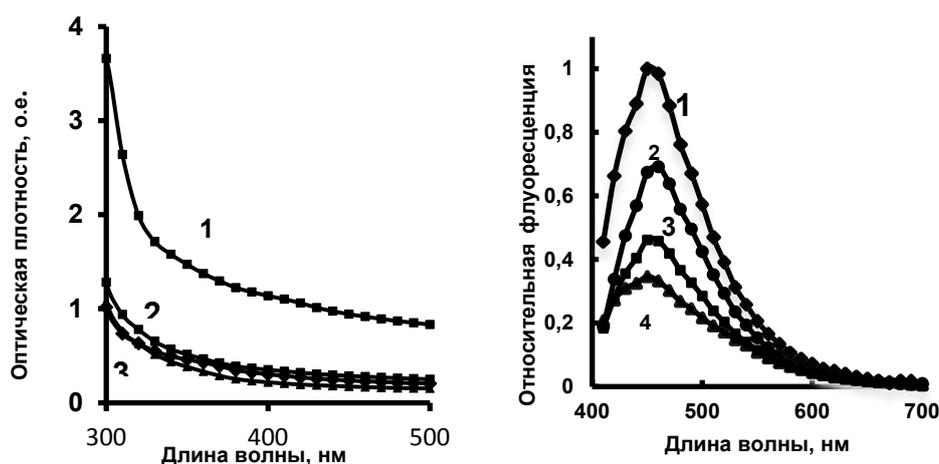


Рисунок 1. Спектр погашения и флуоресценции наночастиц CdS, синтезированных с помощью (1) – липополисахарида, (2) – белка-порина, (3) – каррагиана, (4) – хитозана. Длина волны возбуждающего излучения 380 нм

Показано, что интенсивность флуоресценции КТ, синтезированных в растворах ЛПС, была в два раза выше, чем у остальных образцов. Флуоресценция образцов и максимумы спектров эмиссии (450 нм) сохраняются при интенсивном диализе против буферов, что свидетельствует об устойчивости КТ и возможность использования полученных меченых препаратов. Выдерживание образцов при pH 3 приводит к значительному снижению

флуоресценции, особенно для кислых полисахаридов. Анионный кислород фосфата, гидроксильные группы сахара, атомы азота могут взаимодействовать с ионами металлов, которые являются прекурсорами (предшественниками) для нанокристаллов Cd^{2+} . Обнаружено, что высоко гомологичные и подобные по пространственной организации порины иерсиний формируют отличные по структуре матрицы. Это представляет интерес с точки зрения химической сенсорики и открывает перспективу использования наноструктур на основе поринов, меченных КТ, в качестве биосенсоров.

При поддержке гранта РФФИ № 19-03-00318.

1. Бричкин С.Б., Разумов В.Ф. Коллоидные квантовые точки: синтез, свойства и применение // Успехи химии, 2016, т. 85, № 12, с. 1297-1312.

2. Resch-Genger Ute, Grabollel M., Cavaliere-Jaricot S., Nitschke R., Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels // Nature methods, 2008, vol. 5, no. 9, p. 763.

ПУТИ РЕАЛИЗАЦИИ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННОГО ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА, И ИХ РЕГУЛИРОВАНИЕ

Ways to Implement Apoptosis of Human Lymphocytes Induced by Hydrogen Peroxide and Their Regulation

Наквасина М.А.¹, Артюхов В.Г.¹, Радченко М.С.², Старикова Т.И.¹, Сараджи Н.Г.¹, Щиголева В.А.¹

¹ Воронежский государственный университет, г. Воронеж, РФ

² Воронежский государственный медицинский университет, г. Воронеж, РФ, nakvasina_ma@mail.ru

Изучение механизмов и способов регулирования программированной клеточной смерти иммуноцитов человека – одна из ключевых проблем биофизики клетки, физико-химической биологии и биомедицины [1, 2]. В этой связи с помощью методов иммуноферментного анализа, люминесценции, электрофореза в агарозном геле, ДНК-комет, проточной цитофлуориметрии исследованы пути реализации апоптоза лимфоцитов периферической крови доноров, индуцированного воздействием пероксида водорода (10^{-6} , 10^{-5} моль/л).

С использованием метода иммуноферментного анализа установлено, что в течение 1-5 ч после воздействия H_2O_2 (10^{-6} моль/л) на клетки наблюдается повышение уровня экспрессии мембранных рецепторов смерти – Fas (CD95) – по сравнению с таковым для интактных клеток, обусловленное демаскированием ранее скрытых (предсуществующих) и синтезом новых молекул Fas-рецепторов. На основании анализа результатов проточно-цитофлуориметрических исследований выявлено, что пероксид водорода в концентрации 10^{-5} моль/л вызывает статистически достоверное увеличение уровня экспрессии CD95 лимфоцитов через 1 ч на 17 % и через 2 ч на 76 % по отношению к таковому для интактных клеток (100 %).

Добавление H_2O_2 (10^{-6} моль/л) к суспензии клеток индуцировало активацию иницирующей каспазы-8, ассоциированной с рецепторами смерти Fas. Через 4 ч после воздействия пероксида водорода на лимфоциты зарегистрирован значительный рост величины функциональной активности ведущей эффекторной каспазы-3 (10^{-6} моль/л) по отношению к таковой для контрольных образцов.

Существенное повышение по сравнению с контролем (интактные иммуноциты) активности, иницирующей каспазы-9, участвующей в запуске митохондриального каспазного пути апоптоза, наблюдалось через 1-2 ч после модификации лимфоцитов H_2O_2 (10^{-5} моль/л). Обнаружено статистически значимое повышение уровня внутриклеточных активных форм кислорода через 1 и 2 ч после модификации лимфоцитов H_2O_2 (10^{-5} моль/л) по сравнению с таковым для интактных клеток. Обнаружено статистически значимое снижение интенсивности флуоресценции «митохондриального» флуоресцентного зонда – родамина 123 – по сравнению с таковой для нативных клеток для лимфоцитов, модифицированных воздействием пероксида водорода, что является показателем нарушения функционального состояния митохондрий, связанного с уменьшением их мембранного потенциала. Воздействие пероксида водорода в той же концентрации на лимфоциты индуцировало сначала повышение уровня цитозольного кальция до 150 ± 18 нмоль/л по отношению к таковому для интактных клеток (81 ± 15 нмоль/л); через 1 и 3 часа – снижение соответственно до 45 ± 8 и 34 ± 10 нмоль/л по сравнению с таковым для нативных иммуноцитов (67 ± 10 и 59 ± 8 нмоль/л).

Через 6 ч регистрировали также повышение по сравнению с контролем уровня транскрипционного фактора p53 в лимфоцитах после добавления к их суспензии раствора H_2O_2 (10^{-6} моль/л). После 20 часов инкубации лимфоцитов, модифицированных воздействием H_2O_2 , регистрировали образование фрагментов ДНК, размеры которых составляют 1500-4000 п. н. Сразу после обработки лимфоцитов раствором пероксида водорода наблюдали образование ДНК-комет класса C1, через 6 и 20 ч инкубации модифицированных клеток соответственно – комет C2/C3 и C3/C4 классов. Наибольший объем повреждений ДНК приходился на время 6 ч после обработки лимфоцитов H_2O_2 .

Обработка клеток H_2O_2 (10^{-6} моль/л) через 4 ч и 6 ч приводила к статистически значимому повышению количества фосфатидилсерин-позитивных клеток по отношению к таковому для интактных лимфоцитов.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу представления о реализации рецепторопосредованного каспазного, митохондриального (с участием каспазы-9) и p53-зависимого путей апоптоза лимфоцитов человека в условиях воздействия пероксида водорода.

Выявлено защитное действие транс-ресвератрола (Shaanxi Hongao Bio-Tech Inc., Китай) в концентрации 10^{-6} моль/л по отношению к уровню жизнеспособности лимфоцитов после воздействия H_2O_2 (10^{-5} моль/л). Протекторный эффект ресвератрола обусловлен его способностью снижать уровень активных форм кислорода в интактных и модифицированных пероксидом водорода иммунocyтах.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.

1. Наквасина М.А., Артюхов В.Г. Механизмы клеточной гибели: апоптоз, аутофагия, некроз: учебное пособие. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2019, 164 с.

2. Савицкая М.А., Онищенко Г.Е. Механизмы апоптоза // Биохимия, 2015, т. 80, вып. 11, с. 1613-1627.

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ В СТАДИИ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ Method for Treatment of Oncological Patients in Metastasis Stage

Овсянников В.А.

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, г. Санкт-Петербург, РФ, victorovs@mail.ru

В работе на основе ранее созданной Энергетической модели канцерогенеза был рассмотрен процесс внедрения генетического материала с онкогенными свойствами в живые клетки другого участка организма онкологического больного. Показано, что этот процесс должен сопровождаться выделением энергии в УФ диапазоне, часть которой переходит на основания ДНК в местах воссоединения разрыва, и которые приводят данную клетку к более быстрому развитию и последующему делению. Этим объясняется тот экспериментальный факт, что метастазы, возникающие после удаления первичных опухолей, часто, приводят организм к более быстрой гибели, чем это могли бы сделать первичные раковые опухоли.

Такое понимание роли метастазов в организме позволило создать способ лечения таких больных на основе восстановления собственных защитных систем организма больного с помощью специальных лазерных терапевтических воздействий. После получения положительных результатов при клинических испытаниях предложенного способа, на него был получен Патент № 2741711.

АНАЛИЗ СОЧЕТАННОГО ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ГОМЕОСТАЗА СЫВОРОТКИ КРОВИ СОБАК МЕТОДАМИ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ НЕЛИНЕЙНОЙ ДИНАМИКИ

**Analysis of Combined Changes in the Activity of Homeostasis Enzymes from Dogs' Blood Serum with
Mathematical Non-Linear Dynamic Methods**

Олешкевич А.А.

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии, МВА имени К.И. Скрябина,
г. Москва, РФ, kaffizmgavmib@mail.ru

Изучено сочетанное изменение активности сывороточных ферментов гомеостаза в зависимости от наличия у домашних собак разного возраста и пород внутренних незаразных болезней (ВНБ). Данные могут дать общую картину глубины изменений в органах, тканях и системах организма животного, позволят вводить своевременную корректировку медикаментозного лечения. Работа проведена с использованием современных методов исследования, включающих биохимический анализ показателей сыворотки крови, измерение активности ферментов (лактатдегидрогеназы, липазы, креатинфосфокиназы, трансфераз, щелочной фосфатазы и ряда других) и методы математической нелинейной динамики (кластерный анализ, дисперсионный анализ факторных эффектов). На основе проведенного теоретического исследования и анализа полученных биохимических показателей выявлена связь изменения активности ферментов гомеостаза с конкретными ВНБ собак. Применение кластерного и дисперсионного анализов результатов биохимических исследований позволило:

- выявить характерные изменения ферментативного профиля при наиболее распространенных заболеваниях неинвазивной этиологии домашних собак;
- определить сезонные изменения активности ферментов гомеостаза у собак различных пород.

По результатам факторного, дискриминантного и кластерного анализов составлена карта возможных направлений изменений ферментативной активности при заболеваниях обмена, а также болезнях сердечно-сосудистой и эндокринных систем домашних собак.

Таблица 1. Связь изменения активности ферментов гомеостаза с определёнными ВНБ собак

| Фермент-индикатор | Заболевания |
|--------------------------------------|---|
| Аспартаминотрансфераза ЕС 2.6.1.1 | гемолиз, ишемическая болезнь сердца (ИБС), повреждение клеток сердечной/скелетной мускулатуры, метаболический синдром печени, гепатопатия, атерогенез и диабет I и II типа. |
| Аланинаминотрансфераза ЕС 2.6.1.2 | нарушении метаболизма глюкозы и связанная с ним неалкогольная жировая болезнь печени, атеросклероз, ИБС, метаболический синдром печени, гепатопатия, атерогенез и диабет I и II типа. |
| Гамма-глутамилтрансфераза ЕС 2.3.2.2 | сердечно-сосудистые заболевания, острый инфаркт миокарда, инсульт, гипертония, атеросклероз коронарных артерий, диабет 2 типа, заболевания печени, особенно гиперплазия желчных путей и холестаза |
| Креатинфосфокиназа ЕС 2.7.3.2 | инфаркт миокарда, эндокардит и миокардит, врождённые миопатии, злокачественная гипертермия, гипердренокортицизм, гипотиреозе, дефиците витамина <i>E</i> и <i>Se</i> , кишечная окклюзия кровотечение, панкреатите, перитоните, интоксикация |
| Лактатдегидрогеназа ЕС 1.1.1.27 | заболевания сердца, печени, скелетных мышц, почек, опухолевые и гематологические заболевания, инфаркт миокарда, лимфома, лейкомия, сахарный диабет |
| Липаза ЕС 3.1.1.3 | панкреатит, некроз жира |
| Щелочная фосфатаза ЕС 3.1.3.1 | гипердренокортицизм, сахарный диабет, гипотиреоз и гиперпаратиреоз, неоплазия (недифференцированная саркома, злокачественная меланома и мастоцитомы, аденокарцинома коры надпочечников, смешанная опухоль молочных желёз, гемангиосаркома, лимфома и карцинома полости рта), остеопатии (рахит, остеомалация) и остеодистрофия, заболевания опорно-двигательной системы, холестаза, гепатопатия |

Проведённый анализ изменений биохимических показателей на фоне различных ВНБ показал:

- при почечной недостаточности собак может регистрироваться как гипо-, так и гиперкалиемия;
- повышение активности γ -глутамилтрансферазы тесно коррелирует с повышением активности ЩФ и регистрируется при холестазе и при гиперплазии желчного пузыря;
- изменение биохимических показателей при заболеваниях сердечно-сосудистой системы не информативно.

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СИСТЕМ С БЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТОЙ КАК «МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ» ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИКИ

Thermodynamic Modeling of a Systems with Benzoic Acid as a Model Systems for Pharmaceuticals

Пастухов А.А., Пестов С.М.

Институт органической химии РАН, г. Москва, РФ, pastukhov.2013@mail.ru
МИРЭА – Российский Технологический Университет, г. Москва, РФ, pestovsm@yandex.ru

В настоящее время в фармацевтических исследованиях и медицинской практике используются препараты на основе бензойной кислоты и ее производных. Широкое применение находят ацетилсалициловая, салициловая и парааминобензойная кислоты. В ряде случаев, проблема подбора растворителя для приготовления коммерческих фармацевтических продуктов из производных бензойной кислоты требует решения. Особенно интересно, что ряд соединений производных бензойной кислоты обладает жидкокристаллическими фазами, исследование которых представляет большой интерес в области материаловедения и, в частности, для медицинской техники. В связи с этим до сих пор является актуальным исследование термодинамических свойств и моделирование систем с бензойной кислотой и ее производными для приготовления эффективных фармацевтических препаратов. Таким образом, целью работы является разработка методов термодинамического описания систем с бензойной кислотой.

Для исследования термических свойств бензойной кислоты и ее производных в различных смесях использовались терморектор TP-150, анализатор жидкости Эксперт 001 и термостат TW-2.02. С помощью термического и визуально-политермического анализа были построены фазовые диаграммы плавкости систем бензойная кислота – органический растворитель для исследования растворимости бензойной кислоты.

По экспериментальным данным были построены политермы растворимости бензойной кислоты в растворителях разных классов (рис. 1, 2). Результаты экспериментов по исследованию растворимости бензойной кислоты сравнивались со справочными данными [1,2] и хорошо сопоставлялись с моделями регулярных растворов.

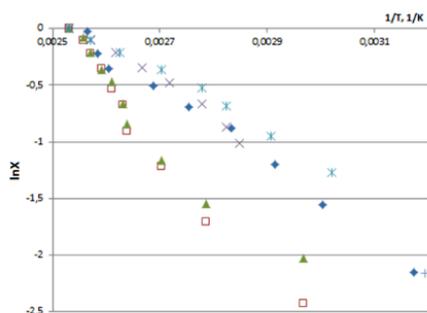


Рисунок 1. Политермы растворимости бензойной кислоты: хлорбензол - ◆, декан - ▲, додекан - ■, дибензоил - ×, бензофенон- ✖

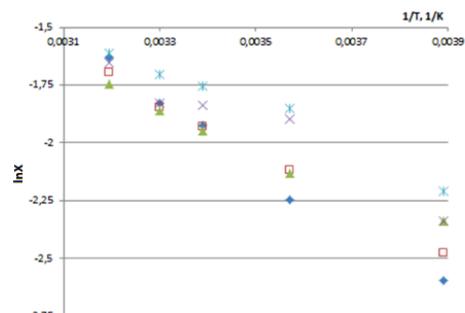


Рисунок 2. Политермы растворимости бензойной кислоты в сложных эфирах: метилацетат - ◆, этилацетат - ■, пропилацетат - ▲, бутилацетат- ×, амилацетат- ✖

С помощью моделей Скотчарда-Гильдебранда, Флори-Хаггинса, UNIFAC были рассчитаны избыточные термодинамические функции - коэффициенты активности $\ln \gamma_i$ (по уравнению 1 и 2) и избыточная свободная энергия Гиббса ΔG_i^E (по уравнению 3) при 25°C.

$$\ln \gamma_i = \frac{V_i^{mi}}{RT} (\delta_j - \sum \delta_i \phi_i) \quad (1)$$

$$\ln \gamma_i = \frac{V_i^{mi}}{RT} \times \phi_j^2 \times \left[(\delta_j - \delta_i)^2 + 2l_{ij} \delta_i \delta_j + 1 - \frac{\phi_j}{x_j} + \ln \frac{\phi_j}{x_j} \right] \quad (2)$$

$$\Delta G_i^E = RT \times \ln \gamma_i \quad (3)$$

Значения избыточной энергии Гиббса бензойной кислоты, рассчитанные по модели Флори-Хаггинса, преимущественно совпадают с экспериментальными значениями бензойной кислоты в растворах разных классов органических растворителей.

Таким образом, были подобраны модели для оценки растворимости бензойной кислоты в разных классах органических растворителей. Полученные результаты показывают, что растворы бензойной кислоты в органических растворителях имеют положительное отклонение от идеальности, что позволяет нам использовать модель регулярных растворов для моделирования систем с бензойной кислотой.

1. Jouyban A. Handbook of solubility data for pharmaceuticals. Boca Raton: CRC Press, 2010, 306 p.

2. Acree W.E. Solubility of Benzoic Acid and Substituted Benzoic Acids in Both Neat Organic Solvents and Organic Solvent Mixtures // Journal of Physical and Chemical Reference Data, 2013, vol. 42, no 3, doi: 10.1063/1.4816161.

ВЛИЯНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА ПАРАМЕТРЫ ВАРИАбельНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ The Effect of Reactive Oxygen Species on the Parameters of Heart Rate Variability during Prolonged Use in the Experiment

Перетягин П.В., Соловьева А.Г.

Приволжский исследовательский медицинский университет, г. Н.Новгород, РФ, peretyaginpv@gmail.com

В настоящее время известно обширное число экспериментальных и клинических исследований влияния активных форм кислорода, и конкретно, озона, на живой организм [1]. Основная часть подобных работ посвящена изучению метаболизма крови и тканей [2]. Функциональное состояние систем организма в целом, и сердечно-сосудистой в частности, при этом остается мало изученным. В связи с этим, целью данной работы явилось выявление адаптивных процессов сердечного ритма при длительном системном применении озона.

Эксперимент выполнен на 60 крысах линии Вистар, разделенных на 6 равных по численности группы. Продолжительность эксперимента составляла 30 дней, в течение которых животным первой опытной группы ежедневно внутривенно вводили по 1 мл раствора 0,9% хлорида натрия с насыщающей концентрацией озона 3000 мкг/л. (доза озона – 0,6 мкг) Для животных второй опытной группы насыщающая концентрация озона составляла 10000 мкг/л (доза озона – 2 мкг), для третьей опытной группы – 40000 мкг/л (доза озона – 8 мкг). Животные контрольной группы 1 получали эквивалентный объем физиологического раствора, контрольной группы 2 – оксигенированного, соответственно. Оценивали вариабельность сердечного ритма по завершении эксперимента методом кардиоинтервалографии с помощью аппарата ВНС-Микро («Нейрософт», Иваново). Изучали уровень вариабельности сердечного ритма (по частоте сердечных сокращений, индексу напряжения). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0.

Уровень частоты сердечных сокращений в контрольных группах не отличается от интактных значений. Озонированный физиологический раствор способствует интенсификации ЧСС, при этом низкие дозы наиболее эффективны. Индекс напряжения при этом претерпевает разнонаправленные изменения. Животные с инъекциями физиологического раствора сопоставимы со здоровыми животными, барботаж раствора усиливает централизацию управления сердечным ритмом, в меньшей степени при участии кислорода и низкой дозы озона, а при средних и высоких дозах озона – в большей степени, данные приведены в таблице 1:

Таблица 1. Значения временного анализа ВСР на фоне хронического воздействия АФК

| Показатель ВСР | Интактные | Контроль 1 | Контроль 2 | Оз 0,6 мкг | Оз 2 мкг | Оз 8мкг |
|-------------------|--------------|--------------|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| ЧСС, уд./мин | 228,31±21,55 | 234,73±24,94 | 235,11±21,34 | 334,42±30, 11*/** | 275,35±25, 23*/** | 271,62±25, 05*/** |
| ИН, у.е. | 381,82±34,63 | 390,41±26,69 | 1295,01±117,2 2* | 2176,18±1 98,21*/** | 5470,11±4 97,85*/** | 3569,12±3 24,78*/** |

Проведенное исследование разных доз озона при хронических 30-дневных воздействиях озонированного физиологического раствора на экспериментальных животных позволило выявить отличия в характере ответных реакций со стороны вегетативной регуляции variability сердечного ритма между воздействиями кислорода и его АФК. При этом использование всего диапазона доз озона при длительной оксидативной нагрузке сопровождалось, как и при воздействиях кислороднасыщенным физиологическим раствором, активацией симпатических влияний. Высокие дозы озона (2 и 8 мкг) значимее модулировали как симпатические, так и парасимпатические влияния на сердечную деятельность, проявлявшиеся в увеличении индекса напряжения Баевского.

1. Bartz R.R., Piantadosi C.A. Clinical review: oxygen as a signaling molecule // Crit. Care, 2010, vol. 14, no. 5, p. 234.
2. Sukhotnik I., Starikov A., Coran A.G. et al. Effect of ozone on intestinal epithelial homeostasis in a rat model // Rambam Maimonides Med. J, 2015, vol. 6, no. 1, p. e0006.

СПЕКТРОМЕТРИЯ РАСТВОРА СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИ АКТИВИРОВАННОЙ ВОДЕ Spectrometry for Serum Albumin Solution in Electrochemically Activated Water

Погорелов А.Г., Ипатова Л.Г., Кузнецов А.Л., Погорелова В.Н., Панат А.И., Суворов О.А.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино, РФ, agpogorelov@rambler.ru

Наряду с жирами и углеводами, протеиновая составляющая биологической матрицы, которая представляет основу сырья для пищевой промышленности, подвергается разнообразным изменениям и превращениям в течение технологических процессов с применением воды и водных растворов. Выявление закономерностей взаимодействия электрохимически активированной воды с молекулами пищевых ингредиентов, в частности белков, является актуальным и интересным с точки зрения перспектив безреагентного управления свойствами и поведением биологического сырья в технологической цепочке производства пищевых продуктов. Ряд проблем, связанных с потерями пищевых веществ в результате переработки пищевого сырья, может быть решен при использовании электрохимической активации [1]. Ресурсосбережение и щадящие условия технологических процессов могут стать положительным итогом применения указанной технологии в пищевом производстве [2]. Цель данной работы состояла в изучении свойств сывороточного альбумина в образцах водного раствора, подвергнутого электрохимической активации в анодной или катодной камере электрохимического реактора методами UV-спектроскопии и времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов (TOF-SIMS) [3].

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 20-16-00019.

1. Bakhir V.M., Pogorelov A.G. Universal electrochemical technology for environmental protection // Int. J. Pharm. Res. Allied Sci., 2018, vol. 7, pp. 41-57.
2. Pogorelov A.G., Chernykh V.Ya., Bulavina T.A., Suvorov O.A., Kuznetsov A.L., Ipatova L.G. Investigation of the rheological parameters of a complex homogenate (dough model) prepared from flour and fractions of an electrochemically activated water // IOP Conference Series: Earth and Environmental Scienc, 2021, vol. 3, pp. 27-35.
3. Pogorelov A.G., Ipatova L.G., Pogorelova M.A., Kuznetsov A.L., Suvorov O.A. Properties of serum albumin in electrolyzed water // Foods and Raw Materials, 2022, vol. 10, pp. 117-126.

СПЕКТРОСКОПИЯ ЯМР СЛЮНЫ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ NMR Spectroscopy of Saliva in Patients with Chronic Forms of Cerebral Circulation Disorders

Прокопов А.А.^{1,2}, Митронин А.В.¹

¹Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова
Минздрава РФ, г. Москва, РФ, *pral@mail.ru*

²Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, г. Москва, РФ

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – эффективный инструмент для изучения метаболического скрининга при исследовании биологических жидкостей [1]. В стоматологии мы впервые подошли к метаболическому профилированию слюны методом ЯМР на ядрах ¹H, ¹³C, ³¹P, ¹⁹F [2]. Сформировавшаяся концепция саливаомики (ораломики), включающая в себя геномику, транскриптомику, протеомику, метабономику и ряд сопредельных дисциплин, привела к созданию профессиональной информационной базы по различным видам коморбидной патологии [3,4]. Имеются первые публикации, отражающие исследования по неврологическим заболеваниям и сосредоточенные на диагностическом и прогностическом выявлении в составе слюны новых биомаркеров заболеваний [5-7].

Целью исследования было изучение спектров ЯМР ¹H, ¹³C и ³¹P слюны пациентов с хроническими формами нарушения мозгового кровообращения в сравнении с группой здоровых людей для установления признаков данной патологии как фрагмента её комплексного изучения. Для этого провели обследование 46 пациентов в возрасте от 45 до 74 лет, распределённых на две группы в соответствии с диагнозом. Основную исследуемую группу составили 23 пациента с подтверждённым диагнозом 167.8-ЦВБ: Дисциркуляторная энцефалопатия, декомпенсация. Контрольную группу составили 19 пациентов без соматической патологии в анамнезе. По общему виду спектров ЯМР ¹H органических молекул слюны можно идентифицировать здоровых людей и пациентов с хроническими формами нарушения мозгового кровообращения. Сигналы органических молекул в спектрах контрольной группы пациентов совпадают по величинам химсдвигов и пиковым интенсивностям, а у пациентов с цереброваскулярной патологией эти сигналы существенно различаются, они характеризуются индивидуальным набором химсдвигов и пиковых интенсивностей. Многомерные методы корреляционной спектроскопии ЯМР ¹H и ¹³C показали, что в слюне исследуемой группы увеличен уровень молочной кислоты и снижена концентрация пировиноградной, что согласуется с особенностями энергетических процессов в головном мозге, отличительной чертой которых является преимущественное окисление глюкозы в реакциях аэробного гликолиза [7]. Анализ спектров ЯМР на ядрах ³¹P ротовой жидкости условно здоровых пациентов и слюны пациентов с диагнозом ЦВБ показал, что все спектры состоят из одного сигнала с небольшой разницей в величинах химсдвига ³¹P. У контрольной группы пациентов химсдвиги совпадают, а химсдвиги сигналов у пациентов исследуемой группы на 0,5-0,7 м.д. меньше. Нами было показано [2], что группы (PO₄)_n ротовой жидкости входят в состав структурированных жидких плёночных полимерных структур разной толщины, а величина *n* зависит от состояния здоровья или стадии болезни пациента. Форма сигналов и химсдвиги указывают, что в слюне пациентов без соматических заболеваний толщина плёнок меньше, чем у пациентов с ЦВБ. В результате действия защитных механизмов в слюне больных с хронической формой нарушения мозгового кровообращения происходит утолщение биополимерной плёнки, которая является одним из источников неорганического фосфора, необходимого для функционирования фосфоорилазы, катализирующей добавление фосфатной группы к акцептору.

1. Methodologies for metabolomics: experimental strategies and techniques Ed. by N.W. Lut, J. Sweedler, R. Wevers. Cambridge; New York: Cambridge univ. press, 2013, 627 p.
2. Митронин А.В., Прокопов А.А., Сребная Е.А., Привалов В.И. Спектроскопия высокого разрешения ЯМР ¹H ротовой жидкости молодых пациентов с клиновидными дефектами зубов // Эндодонтия today, 2020, № 4, с. 20-25.
3. Chen-Zi Zhang, Xing-Qun Cheng, Ji-Yao Li et al. Saliva in the diagnosis of diseases // Int. J. Oral Science, 2016, vol. 8, pp. 133-137, doi: 10.1038/ijos.2016.38.
4. W LAB. Liquid Biopsy, Salivaomics, Saliva Exosomics, Wound Healing, Oral Cancer. ENTER W Lab UCLA School of Dentistry (Электронный ресурс).
5. Farah R., Haraty H., Salame Z. et al. Salivary biomarkers for the diagnosis and monitoring of neurological diseases // Biomedical J., 2018, vol. 41, iss. 2, pp. 63-87, doi: 10.1016/j.bj.2018.03.004.
6. Janigro D., Bailey D. M., Lehmann S. et al. Peripheral Blood and Salivary Biomarkers of Blood–Brain Barrier Permeability and Neuronal Damage: Clinical and Applied Concepts // Front. Neurol., 2021, doi: 10.3389/fneur.2020.577312.
7. Муратова С.К., Хайдаров А.М., Хажиметов А.А., Шукурова Н.Т. Состояние клеточного состава и микрофлоры мукозального эпителия ротовой полости больных хронической ишемией мозга // Узбекский медицинский журнал, 2021, т. 2, № 3, С. 34-41, doi: 10.26739/2181-0664-2021-3-6.

ЭФФЕКТ МАЛЫХ ДОЗ РАДИАЦИИ НА ОКСИДАТИВНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ КРОВИ

Effect of Low-Dose Radiation on Oxidative Metabolism of Blood Neutrophils and Monocytes

Проскурнина Е.В.¹, Долгих О.А.¹, Созарукова М.М.², Костюк С.В.¹

¹Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, г. Москва, РФ, proskurnina@gmail.com

²Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова РАН, г. Москва, РФ, s_madinam@bk.ru

Малые дозы ионизирующего излучения оказывают стимулирующее действие как на клеточные структуры, так и *in vivo*, приводят к увеличению продолжительности жизни экспериментальных животных и выживаемости клеток (явление гормезиса) [1]. Нейтрофилы являются радиочувствительными клетками крови, которые участвуют в уникальной воспалительной реакции, вызванной рентгеновским излучением [2]. Исследования, направленные на изучение молекулярных механизмов, включающихся в нейтрофильных гранулоцитах и моноцитах в ответ на воздействие малых доз рентгеновского излучения, немногочисленны.

При помощи импульсного рентгеновского аппарата «АРИНА-2» (Монотест, Москва) было проведено облучение цельной гепаринизированной крови практически здоровых доноров и изолированных из этих проб моноцитов в дозах 10, 30, 50 и 70 сГрей. Оксидативный метаболизм нейтрофилов был оценен при помощи оригинальной хемилюминесцентной методики с двухстадийной стимуляцией в присутствии люминола как активатора. В качестве праймирующего стимула использовали форбол-12-миристинат-13-ацетат (ФМА), в качестве основного стимула — *N*-формилметионил-лейцил-фенилаланин (фМЛФ) [3]. Согласно хемилюминесцентному протоколу, в случае моноцитов крови анализировали влияние одного из стимулирующих агентов, ФМА или фМЛФ, поскольку эффекта от двухстадийной стимуляции (ФМА+фМЛФ) для этих клеток не выявлено. Были исследованы образцы крови практически здоровых доноров разного возраста ($n = 10$).

Примеры зависимостей «доза – интенсивность хемилюминесценции» при облучении цельной крови (хемилюминесценция обусловлена преимущественно нейтрофилами) и изолированных моноцитов практически здорового донора приведены на рисунке 1.

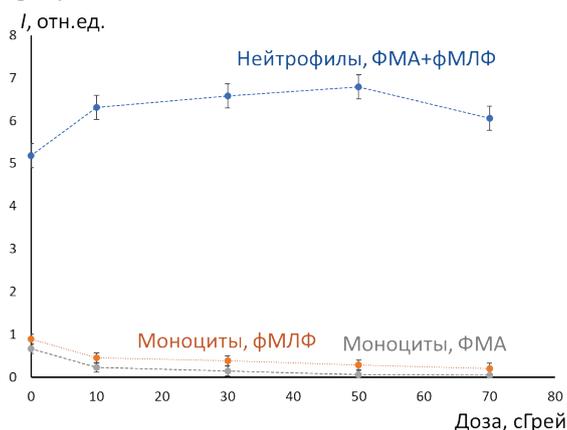


Рисунок 1. Зависимость интенсивности люминол-активированной хемилюминесценции нейтрофилов при двухстадийной стимуляции (ФМА+фМЛФ) и моноцитов при одностадийной стимуляции (ФМА или фМЛФ) от дозы рентгеновского излучения. Для нейтрофилов происходит начальное усиление активности, затем ее снижение. На моноциты излучение оказывает дозозависимое угнетающее воздействие. Приведены средние значения из четырех параллельных измерений

Выраженность эффекта варьировала в зависимости от пробы. Угнетение активности моноцитов при облучении дозой 70 сГрей составило от 2,0-4,2 раз для стимуляции ФМА до 10-15 раз для стимуляции фМЛФ. Усиление активности нейтрофилов составило до 1,2-1,5 раз. Все дозы в диапазоне до 70 сГрей являются стимулирующими, однако максимальную стимуляцию наблюдали при 30-50 сГрей. Активирующее действие рентгеновского излучения на нейтрофилы может быть объяснено по аналогии с действием ультрафиолетового излучения праймирующим эффектом вследствие радиационного окислительного стресса.

Полученные зависимости позволяют сделать вывод о стимулирующем действии малых доз рентгеновского излучения на нейтрофильные гранулоциты крови и угнетающем действии на моноциты. Результаты свидетельствуют в пользу нелинейных эффектов малых доз на нейтрофилы и могут внести ясность в понимание патогенеза воспаления, вызванного рентгеновским излучением, и механизма иммунного ответа при этом воспалении.

1. Baldwin J., Grantham V. Radiation Hormesis: Historical and Current Perspectives // Journal of Nuclear Medicine Technology, 2015, vol. 43, pp. 242-246, doi: 10.2967/jnmt.115.166074.

2. Fujiwara H., Yamazaki T., Uzawa A., Nagata K., Kobayashi Y. Transient infiltration of neutrophils into the thymus following whole-body X-ray irradiation in IL-10 knockout mice // *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, vol. 369, pp. 432-436, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.043.

3. Образцов И.В., Годков М.А., Полимова А.М., Дёмин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двухстадийной стимуляции: новый подход к хемилюминесцентному анализу // *Российский иммунологический журнал*, 2015, т. 9, № 18, с. 418-425.

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НАНОКОМПОЗИТА ЗОЛОТА И ЛЕГИРОВАННОГО ГАЛЛИЕМ КОБАЛЬТОВОГО ФЕРРИТА Cytotoxic Effects of Nanocomposite of Gold and Gallium-Doped Cobalt Ferrite

Пшеничников С.Е.¹, Моторжина А.В.¹, Малащенко В.В.¹, Йованович С.^{2,3}, Литвинова Л.С.¹,
Панина Л.В.^{1,4}, Родионова В.В.¹, Левада Е.В.¹

¹ Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград, РФ, *SPshnikov@gmail.com*

² Институт ядерных наук «Винча» – Национальный институт Республики Сербия, Белградский университет, г. Белград, Сербия

³ Отдел продвинутых материалов, Институт Йозефа Стефана, г. Любляна, Словения

⁴ Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», г. Москва, РФ

Наноконпозиты представляют собой многофазные материалы, которые могут сочетать в себе широкий спектр физических и структурных характеристик. Каждый структурный компонент влияет на физические свойства и потенциальную применимость наноконпозита. Сочетание различных характеристик позволяет создавать многофункциональные материалы для решения конкретных медико-биологических задач.

В рамках данного исследования использован наноконпозит (рис. 1) золота и легированных галлием наночастиц кобальтового феррита (CFO_Ga), покрытых гидрокафеиновой кислотой (DHCA). Наноконпозит покрыт аргинином (arginine) для снижения цитотоксичности.

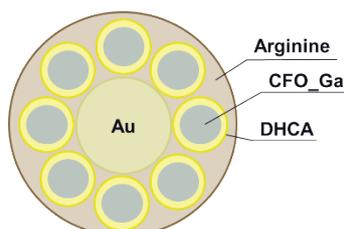


Рисунок 1. Структура конпозита Au(arg):CFO_Ga(DHCA)

Биосовместимость наноконпозита была проанализирована с помощью теста WST-1 (Roche Diagnostics GmbH, Germany), согласно стандартным протоколам и методике производителя. Эксперименты были проведены на мононуклеарных клетках периферической крови (МНК), клеточной линии Т-лимфобластного лейкоза (Jurkat) и клеточной линии гепатомы (Huh7). Средний размер наночастиц золота составляет $13,9 \pm 3,8$ нм, размер наночастиц CFO_Ga составил $5,2 \pm 1,1$ нм. Тест цитотоксичности выявил дозозависимый цитотоксический эффект наноконпозита в трех исследованных клеточных линиях человека (рис. 2).

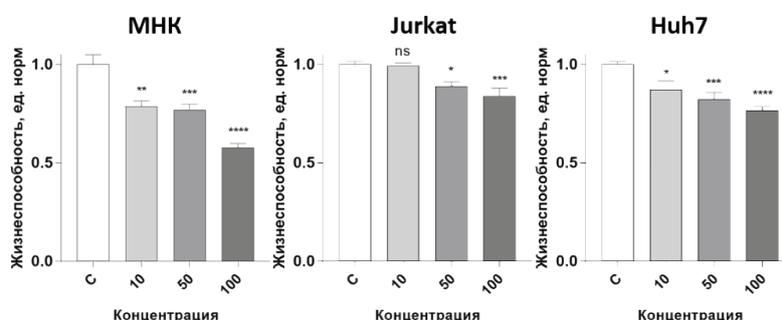


Рисунок 2. Жизнеспособность клеток МНК, Jurkat и Huh7 снижается после культивирования в присутствии наноконпозита Au(arg):CFO_Ga(DHCA) в питательной среде. Клетки подвергались воздействию трех концентраций: 10 мкг/мл (10), 50 мкг/мл (50), 100 мкг/мл (100). Данные нормализованы по значению жизнеспособности контрольных клеток (с) и показаны в виде средних значений \pm SD

Нанокompозит снизил жизнеспособность МНК и Huh7 во всех трех концентрациях после 24 ч воздействия. В то же время жизнеспособность клеток Jurkat не была снижена при концентрации 10 мкг/мл. Анализ клеточной морфологии с использованием конфокальной микроскопии не выявил изменений в клетках Huh7 после культивирования в течение 24 ч при концентрации нанокompозита 100 мкг/мл (данные не показаны). Следующим этапом исследований является определение механизмов цитотоксичности для сопоставления токсического действия композита со структурными характеристиками. Авторы выражают благодарность к.б.н. Газатовой Н.Д. (Центр иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта) за помощь в реализации экспериментальной части исследования.

Исследования выполнены в рамках гранта РНФ 21-72-20158.

ПОКАЗАТЕЛИ ТКАНЕВОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ДЕЙСТВИИ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО МИЛЛИМЕТРОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Indicators of Tissue Oxidative Metabolism under the Exposure of Low-Intensity Millimeter Radiation

Раваева М.Ю., Чуян Е.Н., Черетаев И.В.

Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, РФ, ravaevam@yandex.ru

Известно, что в условиях развития патологических процессов в тканях и/или стресс-реакции в организме меняется относительная концентрация флуорофоров, являющихся частью механизма энергетического обмена, в частности, восстановленных пиридиннуклеотидов (НАДН, НАДФН) и окисленных флавопротеидов (флавинадениндинуклеотид, ФАД). Каждое из данных соединений характеризуется специфичными конкретно для него спектрами поглощения и эмиссии. В процессе адаптации организма к воздействию различных факторов изменяется также морфология тканей и ее спектральные и оптические характеристики, что является точной характеристикой клеточного и тканевого метаболизма.

Низкоинтенсивное электромагнитное излучение крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ), или миллиметрового (мм) диапазона, проявляет высокую биологическую и терапевтическую активность при целом ряде заболеваний, которые сопровождаются изменением окислительного метаболизма в тканях организма. Вероятно, что высокая терапевтическая эффективность мм-излучения связана с изменением окислительных процессов. Проверка данной гипотезы лежит в основе настоящего исследования.

Исследование проводилось с использованием 40 крыс самцов линии Вистар, при этом 20 крыс являлись биологическим контролем (плацебо воздействие), а остальным 20 крысам (экспериментальные) проводилось ежедневное 10-тикратное мм-воздействие (аппарат КВЧ-терапии «КВЧ-НД»: рабочая длина волны 7,1 мм, плотность потока мощности облучения – 4-12 мВт/см², экспозиция 30 минут, локализация – шейно-воротниковая область (Производство: ООО «Научно-коммерческая фирма РЭСЛА», Россия; Декларация соответствия № РОСС Ру. МЕ67.Д00227; Рег. удостов. № ФСР 2007/00763 от 18.09.2007). На 10-е сутки мм-воздействия проводили регистрацию показателей тканевой флуоресценции диагностическим комплексом «ЛАЗМА МЦ» (Модификация ЛАЗМА-МЦ-III, производство ООО НИП «ЛАЗМА», Москва, Россия). Опволоконный зонд прибора «Лазма-МЦ» фиксировали тканевым пластырем перпендикулярно у основания хвоста. Запись сигнала велась в тот момент, когда животное находилось в спокойном состоянии. Методом флуоресцентной спектроскопии оценивали следующие показатели: индекс тканевого содержания для восстановленного НАДН; индекс тканевого содержания для окисленной формы FAD; редокс-соотношение амплитуды флуоресценции НАДН и амплитуды флуоресценции FAD.

Результаты настоящего исследования показали, что у крыс, подвергшихся 10-тикратному мм-воздействию, отмечено повышение значений нормированных амплитуд флуоресценции НАДН и увеличение амплитуд FAD на 82,5 % ($p \leq 0,05$) и 42,6 % ($p \leq 0,05$) соответственно по сравнению с таковыми в контрольной группе крыс, показатели которых пребывали в пределах физиологической нормы. Увеличение нормированных величин флуоресценции НАДН и FAD свидетельствует об увеличении вклада аэробного метаболизма у крыс за счёт окислительного фосфорилирования. При этом, оценивая функциональное состояние митохондрий и активность процессов окисления и восстановления в клетках, важным является не столько концентрация коферментов, сколько их соотношение, отображающее кислородный метаболизм – редокс-потенциал. Именно по величине данного показателя можно говорить о скорости протекания окислительно-восстановительных реакций. После 10-тикратного мм-воздействия редокс-потенциал увеличился на 36,9 % ($p \leq 0,05$) относительно контрольной группы, что является свидетельством увеличения окислительного фосфорилирования в тканях.

Исходя из вышеизложенного можно заключить, что при 10-тикратном воздействии низкоинтенсивного мм излучения в тканях животных экспериментальной группы происходит увеличение концентрации и интенсивности флуоресценции НАДН, повышение FAD и редокс-соотношения, что свидетельствует о росте потребности клеток в АТФ и преобладании окислительного фосфорилирования над другими процессами [1], что в целом свидетельствует об активации дыхательной цепи.

1. Серёгина Е.С., Стельмашук О.А., Пьявченко Г.А., Воробьев Е.В., Кузнецова Е.А., Алексеев А.Г., Жеребцов Е.А., Подмастерьев К.В., Дунаев А.В. Оценка влияния антиоксидантных веществ на метаболические

процессы клеток головного мозга методом флуоресцентной спектроскопии // Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии, 2018, № 1, с. 62-66.

ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ ВЫСОКОЙ НАПРЯЖЕННОСТИ НА ИЗМЕНЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ

Influence of a Pulsed Electromagnetic Field of High Intensity on the Change in the Antibacterial Activity of Beta-Lactam Antibiotics

Роденко Н.А.^{1,2}, Васильева Т.И.², Глушечков В.А.^{1,2}, Беляева И.А.^{1,2}

¹ Самарский федеральный исследовательский центр РАН, г. Самара, РФ, t.rodenco@mail.ru

² Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, г. Самара, РФ

Бета-лактамы антибиотики часто используют в медицинской практике при лечении инфекционных заболеваний. Антимикробная терапия инфекционных заболеваний осложняется нечувствительностью возбудителей к антибиотикам. Ранее нами были получены данные по увеличению биологической активности бензилпенициллина натриевой соли (Sigma-Aldrich, США) на 18-31% в отношении бактерий *Escherichia coli M17* (*E. coli*) [1]. Важным является изучение причины изменения биологической активности антибиотика после обработки ИМП с целью управления параметрами ИМП, приводящими к увеличению антибактериальной активности антибиотика.

Были проведены эксперименты по исследованию антибактериальной активности других бета-лактамов антибиотиков: амоксициллин (Нетофарм, Сербия) и цефтриаксон натрия (Рафарма, Россия) после воздействия ИМП высокой напряженности. Воздействие на лекарственные препараты осуществлялось в порошкообразном виде в пенициллиновых флаконах при следующих параметрах обработки: напряженность магнитного поля $H=(0,09\div 0,82) \cdot 10^6$ А/м, частота $f=30-70$ кГц и количество импульсов $n=1$ [2].

Оценку антибактериального эффекта осуществляли методом диффузии в агар с применением бумажных дисков в отношении бактерий *Escherichia coli M17*.

Были получены данные об изменении биологической активности бета-лактамов антибиотиков после воздействия на них ИМП. Результаты экспериментов представлены в таблице 2.

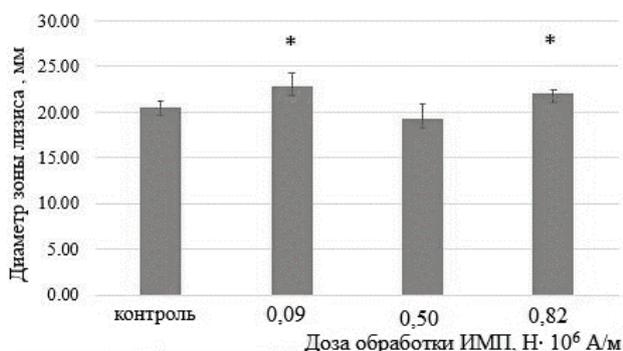


Рисунок 1. Диаметры зон подавления роста *E. coli* при воздействии ИМП на порошкообразный аптечный амоксициллин

* – отличие диаметров зон подавления роста *E. coli* при воздействии ИМП на бета-лактамы антибиотики в зависимости от контроля достоверны с уровнем значимости $p < 0,05$.

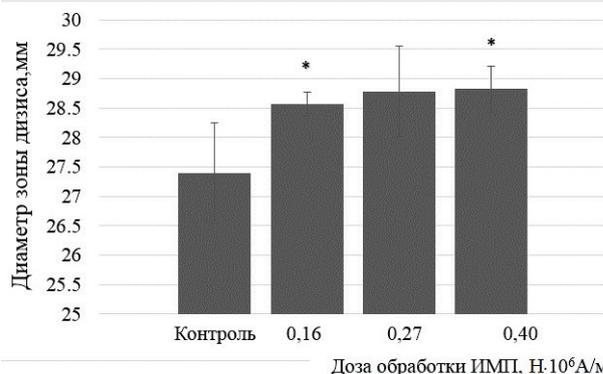


Рисунок 2. Диаметры зон подавления роста *E. coli* при воздействии ИМП на порошкообразный препарат цефтриаксон натрия

В результате обработки ИМП лекарственного препарата амоксициллин было отмечено достоверное увеличение его биологической активности при напряженностях $H=0,09 \cdot 10^6$ А/м, $H=0,82 \cdot 10^6$ А/м с количеством импульсов $n=1$ и частотой $f=40$ кГц на 7 и 11 % соответственно. При воздействии ИМП на цефтриаксон натрия с напряженностью $H=0,16 \cdot 10^6$ А/м, частотой $f=71$ кГц и напряженностью $H=0,40 \cdot 10^6$ А/м, частотой $f=30$ кГц с количеством импульсов $n=1$ было зафиксировано увеличение антибактериальной активности на 4-5%.

Отличия в степени повышения активности бензилпенициллина натриевой соли, амоксициллина и цефтриаксона натрия после обработки ИМП связано с различными группировками в радикале бета-лактамов антибиотиков. Предполагается, что воздействие ИМП способствует переходу молекулы бета-лактамов антибиотика в возбужденное состояние, при этом молекула лекарственного препарата может характеризоваться гибкостью в зависимости от заданных параметров магнитного поля. При некоторых изменениях у молекулы антибиотика повышается сродство к активному центру фермента, и антибактериальная активность увеличивается.

1. Glushchenkov V.A., Vasilyeva T.I., Purigin P.P., Belyaeva I.A., Rodenko N.A., Madyarova A.K., Jusupov R.Yu. Changes in the Antibacterial Activity of Benzylpenicillin Exposed to a Pulsed High-Intensity Magnetic Field // *Biophysics*, 2019, vol. 64, iss. 2, pp. 214-223.
2. Прокофьев А.Б., Беляева И.А., Глушечков В.А., Карпучин В.Ф., Черников Д.Г., Юсупов Р.Ю. Магнитно-импульсная обработка материалов. Самара: АНО Издательство СНЦ, 2019, 140 с.

СИСТЕМА ЦИТОХРОМА P450 МОЖЕТ УЧАСТВОВАТЬ В СВЕТОИЗЛУЧЕНИИ ВЫСШИХ ГРИБОВ

Cytochrome P450 System May be Involved in the Light Emission of Higher Fungi

Ронжин Н.О., Посохина Е.Д., Могильная О.А., Пузырь А.П., Гительзон И.И., Бондарь В.С.

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, РФ, roniol@mail.ru

Несмотря на успехи, достигнутые за последнее время в исследованиях биолюминесценции высших грибов, некоторые биохимические аспекты этого феномена недостаточно ясны и требуют дальнейшего изучения. Ранее была высказана гипотеза об участии оксидаз и активных форм кислорода (АФК) в механизмах свечения базидиомицетов [1], которая подтверждается результатами наших исследований [2-4]. В частности, в этих работах мы высказывали предположение, что в процесс свечения высших грибов может вовлекаться система цитохрома P450, катализирующая с участием АФК окисление органических соединений, включая субстрат люминесцентной реакции. В предлагаемой работе приводятся экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу участия системы цитохрома P450 в реакции грибного светоизлучения.

Для исследований использовали биомассу глобулярного мицелия разных видов светящихся базидиомицетов (*Neonothopanus nambi*, *Armillaria borealis*, *Armillaria* sp., *Mycena citricolor*, *Panellus stipticus*) из Коллекции культур микроорганизмов ССIBSO 836 Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск). Экстракты, содержащие грибные люминесцентные системы, получали разрушением биомассы ультразвуком с последующим осветлением гомогенатов центрифугированием при 40000 g [5,6]. В качестве субстрата люминесцентной реакции использовали экстракт из мицелия несветящегося высшего гриба *Pholiota squarrosa* (Коллекция ССIBSO 836), содержащий гиспидин. Доказано, что гиспидин является предшественником субстрата реакции светоизлучения высших грибов, который преобразуется НАД(Ф)Н-зависимой гидроксилазой в 3-гидроксигиспидин (люциферин) и затем окисляется люциферазой с излучением квантов видимого света [7].

Экстракты, полученные из мицелия светящихся базидиомицетов, содержат грибную люминесцентную систему, которая обеспечивает свечение *in vitro*. Ранее было установлено, что светоизлучающая система грибов представляет собой комплекс белковых и небелковых компонентов, участвующих в свечении [5]. Условия выделения люминесцентных систем (см. выше) указывают на наличие в экстрактах мембранных структур, о чем свидетельствует положительный эффект Тиндаля. В частности, такими структурами могут являться микросомы, образующиеся при ультразвуковом разрушении эндоплазматического ретикулаума (ЭПР). Дифференциальный спектральный анализом в обработанных дитионитом натрия и СО экстрактах выявлено наличие двух пиков поглощения с λ_{\max} при 410 нм и 450 нм, что указывает на наличие в образцах цитохромов P450 и b₅. Свечение экстрактов стимулируется восстановленными пиридиновыми нуклеотидами, однако установлено, что больший уровень свечения регистрируется при добавках НАДФН, по сравнению с НАДН. Значения V_{max} световой эмиссии при использовании НАДФН практически в 2 раза выше, а значения кажущихся K_m в 2 раза ниже, чем при использовании НАДН. Пероксид водорода значительно (от нескольких раз до 1-2 порядков) увеличивает интенсивность свечения экстрактов, активированных добавками НАД(Ф)Н. Известно, что азольные соединения являются ингибиторами цитохромов P450 [8]. В экспериментах установлено, что добавки флуконазола (5-60 мкг в пробе) к экстрактам существенно ингибируют их световую эмиссию – наблюдается снижение как исходного уровня свечения, так и свечения при добавках НАД(Ф)Н. Совокупность полученных данных свидетельствует, что в механизме светоизлучения высших грибов может участвовать ассоциированная с мембранами ЭПР система цитохрома P450 с вовлечением в процесс электронно-транспортных ферментных систем: (i) НАДФН-зависимая редуктаза цитохрома P450 – цитохром P450, (ii) НАДН-зависимая редуктаза цитохрома b₅ – цитохром b₅ – цитохром P450. В этом случае цитохром P450 может осуществлять гидроксилирование гиспидина с образованием люциферина и катализировать его окисление в присутствии АФК с излучением квантов видимого света.

1. Shimomura O. The role of superoxide dismutase in regulating the light emission of luminescent fungi // *Journal of Experimental Botany*, 1992, vol. 43, no. 256, pp. 1519-1525.
2. Bondar V.S. et al. Luminescence of higher mushrooms // *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 2012, vol. 4, no. 5, pp. 331-351
3. Bondar V.S. et al. On the mechanism of luminescence of the fungus *Neonothopanus nambi* // *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2013, vol. 449, doi: 10.1134/S1607672913020075.
4. Kobzeva T.V. et al. Stimulation of luminescence of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi* by ionizing radiation // *Luminescence*, 2014, vol. 29, doi: 10.1002/bio.2656.

5. Bondar V.S. et al. Isolation of luminescence system from the luminescent fungus *Neonothopanus nambi* // *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2014, vol. 455, doi: 10.1134/S1607672914020045.
6. Puzyr A.P. et al. Luminescence of cold extracts from mycelium of luminous basidiomycetes during long-term storage // *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2017, vol. 7, doi: 10.5943/cream/7/3/9.
7. Purto K.V. et al. The chemical basis of fungal bioluminescence // *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, vol. 54, doi: 10.1002/anie.201501779.
8. Kelly S.L. et al. An old activity in the cytochrome P450 superfamily (CYP51) and a new story of drugs and resistance // *Biochemical Society Transaction*, 2001, vol. 29, doi: 10.1042/0300-5127:0290122.

СЕНСОРНЫЙ КОМПОЗИТ НАНОВОЛОКНА γ -Al₂O₃ / НАНОАЛМАЗЫ / Cu²⁺ С УВЕЛИЧЕННОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ФЕНОЛОВ В ВОДНОЙ СРЕДЕ

Sensor Composite γ -Al₂O₃ Nanofibers / Nanodiamonds / Cu²⁺ with Enhanced Catalytic Activity for Detection of Phenols in Aqueous Medium

Ронжин Н.О.¹, Посохина Е.Д.¹, Михлина Е.В.², Рыжков И.И.^{2,3}, Бондарь В.С.¹

¹ Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, РФ, roniol@mail.ru

² Институт вычислительного моделирования ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, РФ

³ Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, РФ

Определение и мониторинг уровня концентрации вредных и токсичных веществ в водной среде являются крайне востребованными и глобальными задачами в современном мире. При этом возрастает спрос на разработку простых в использовании и эффективных аналитических систем, позволяющих проводить оценку состояния водной среды *in situ*. В данной работе получен функционализированный композит нановолокна γ -Al₂O₃ / наноалмазы / Cu²⁺ с увеличенной каталитической активностью, изучены кинетика и изотерма адсорбции ионов меди на композитный материал, исследованы сенсорные характеристики полученного композита на примере тестирования фенола и 4-хлорфенола в водной среде.

Для получения композитного материала использовали наноалмазы детонационного синтеза со средним размером кластеров 70 нм и высокой коллоидной устойчивостью в водных суспензиях [1]. В качестве матрицы для фиксации наноалмазов использовали нановолокна γ -Al₂O₃ марки NafenTM (ANF Technology, Эстония) с диаметром волокон 10–15 нм [2]. Композиционный материал получали по изложенной ранее схеме [3]. Образцы композита функционализировали с помощью адсорбции на их поверхность ионов Cu²⁺, инкубируя образцы в водном растворе 25 мМ CuSO₄ при 22 °С после чего трижды отмывая раствором 120 мМ NaCl. Оценку каталитической активности функционализированного и исходного композита проводили с помощью реакции соокисления фенолов с 4-аминоантипирином в присутствии пероксида водорода.

Изучение процесса адсорбции ионов Cu²⁺ на композит показало, что наибольшая их адсорбция наблюдается в деионизованной воде при нейтральном значении pH, а адсорбционное равновесие при этих условиях достигается через 45 минут. Аппроксимация экспериментальных данных изотермы адсорбции ионов показала наилучшее соответствие с моделью изотермы Ленгмюра. Это позволяет сделать заключение, что при использованных экспериментальных условиях ионы Cu²⁺ адсорбируются на гетерогенную поверхность композита в виде монослоя, взаимодействуя с ее функциональными группами (сайтами связывания). В сравнительных экспериментах установлено, что удельная величина адсорбированных на композит ионов Cu²⁺ на 15% выше, по сравнению с удельной величиной адсорбированных ионов на контрольную матрицу из нановолокон оксида алюминия. Это позволяет сделать вывод, что инкорпорированные в матрицу наноалмазы, обладающие большей площадью поверхности и наличием химически активных сайтов для связывания ионов, обеспечивают композитному материалу большую сорбционную емкость к ионам Cu²⁺, по сравнению с чистой матрицей из нановолокон γ -Al₂O₃.

В результате функционализации композита ионами Cu²⁺ была существенно (более чем в два раза) увеличена его каталитическая эффективность в реакции соокисления фенолов с 4-аминоантипирином. В свою очередь, это позволило в два раза снизить предел обнаружения аналитов (фенола и 4-хлорфенола) в диапазоне низких концентраций, по сравнению с исходным композитом. В работе было установлено, что функционализированный композит обеспечивает линейный отклик в широком диапазоне концентраций фенола (0,25–100 мкМ) и 4-хлорфенола (0,5 – 25 мкМ), превосходя аналогичные характеристики ряда сенсоров, ранее разработанных другими авторами [4, 5]. Исследования показали, что адсорбированные ионы Cu²⁺ прочно связаны с композитом, не десорбируются и не инактивируются реагентами реакции соокисления, что подтверждается результатами повторного тестирования аналитов. В модельных экспериментах продемонстрирована применимость функционализированного композита в качестве многоазового сенсора при последовательном многократном (4 раза и более) тестировании фенола в водных образцах.

1. Puzyr A.P., Bondar V.S. Method of production of nanodiamonds of explosive synthesis with an increased colloidal stability. RU Patent № 2252192, 2005.

2. Kutuzov M. Method and system for alumina nanofibers synthesis from molten aluminum, US Patent №2013/0192517 A1, 2013.
3. Ronzhin N.O., Posokhina E.D., Mikhлина E.V., Mikhlin Y.L., Simunin M.M., Tarasova L.S., Vorobyev S.A., Bondar V.S., Ryzhkov I.I. A new composite material based on alumina nanofibers and nanodiamonds: synthesis, characterization, and sensing application // Journal of Nanoparticle Research, 2021, vol. 23, no. 199, doi: 10.1007/s11051-021-05309-y,
4. Congur G., Gül U.D., Phenol monitoring in water samples using an inexpensive electrochemical sensor based on pencil electrodes modified with DTAB surfactant // Journal of Environmental Chemical Engineering, 2021, vol. 9, no. 105804, doi: 10.1016/j.jece.2021.105804.
5. Qiu C., Chen T., Wang X., Li Y., Ma H. Application of horseradish peroxidase modified nanostructured Au thin films for the amperometric detection of 4-chlorophenol // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, vol. 103, pp. 129-135, doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.10.017.

ИССЛЕДОВАНИЕ АМИЛОИДОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОРИНОВ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

A Study of the Amyloidogenic Potential of Non-Specific *Yersinia Pseudotuberculosis* Porins

**Рыбинская Т.В., Портнягина О.Ю., Зелепуга Е.А., Ким Н.Ю., Чингизова Е.А., Менчинская Е.С.,
Хоменко В.А., Чистюлин Д.К., Новикова О.Д.**

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток, РФ,
tati2099.k@gmail.com

В настоящее время известно, что в природе широко распространены так называемые внутренне неупорядоченные белки (IDP) и белки с внутренне неупорядоченными белковыми регионами (IDPRs), которые выполняют в живой клетке самые разнообразные функции [1]. При определенных условиях IDPRs способны образовывать амилоидоподобные структуры. Амилоиды представляют собой фибриллярные белковые агрегаты с упорядоченной пространственной структурой, называемой «кросс-β». Различные патогенные виды бактерий используют амилоидные белки для взаимодействия с эукариотическими организмами. До 2014 года в литературе встречались данные о механизмах и кинетике формирования амилоидов из водорастворимых глобулярных белков. В последние годы активно идут исследования пространственной организации и свойств амилоидов, образуемых мембранными белками. В настоящей работе были исследованы динамика образования и некоторые биологические свойства амилоидоподобных агрегатов поринов OmpC и OmpF наружной мембраны грамотрицательной бактерии *Yersinia pseudotuberculosis*.

С помощью Web ресурсов, таких как D2P2 [2] и ODINPred [3], в последовательности исследуемых поринов были определены участки IDPRs, с помощью теоретических моделей мономеров OmpC и OmpF проведено картирование и определена их локализация. Результаты биоинформатического анализа позволили классифицировать неспецифические порины *Y. pseudotuberculosis* как умеренно неупорядоченные белки (табл. 1).

Таблица 1. Содержание предсказанных неупорядоченных участков в молекуле неспецифических поринов *Y. pseudotuberculosis*, %.

| Вид бактерии | PPIDR* в OmpF | PPIDR в OmpC |
|------------------------------------|---------------|--------------|
| <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | 12.4 | 29.1 |

* PPIDR - Percent of predicted intrinsically disordered residues

С помощью спектроскопии КД, было показано, что олигомеры, отличающиеся повышенным содержанием структуры β-листа, в случае OmpF порина формируются только после прогрева белка в жестких условиях (pH 4,5, 95 °C, 5 часов). В ИК спектре этого образца белка наблюдается увеличение относительного содержания полосы при 1630 см⁻¹, характеристичной для «кросс-β» структуры. При длительной (14 и 28 дней) инкубации в мягких условиях (pH 4,5, 42 °C,) в пространственной структуре OmpF порина существенных изменений не наблюдается, а в случае OmpC белка в полипептидной цепи белка происходит обратимое накопление α-спиральных участков. Тем не менее, все образцы белков, полученные в результате инкубации, окрашивались тиофлавином Т, специфическим для амилоидов красителем. Данные конфокальной микроскопии позволили охарактеризовать агрегаты, образованные OmpF/OmpC поринами как промежуточные продукты амилоидогенного пути – олигомеры.

Показано, что амилоидоподобные олигомеры, формирующиеся при нейродегенеративных заболеваниях, обладают способностью разрушать мембраны, вызывая неконтролируемый нейротоксический поток ионов через клеточные мембраны. Существует предположение, что токсичность амилоидогенных белков обусловлена не столько нерастворимыми фибриллами, сколько префибриллярными олигомерными интермедиатами, возникающими на ранних стадиях амилоидогенеза [4]. В электрофизиологических экспериментах с

использованием модельной эукариотической мембраны полученные олигомеры OmpF/OmpC белков не показали мембранолитической активности. Однако, было обнаружено, что эти промежуточные олигомеры поринов в отличие от исходных образцов обладают гемолитической активностью по отношению к эритроцитам III и IV групп крови и цитотоксической активностью по отношению к клеткам нейробластомы мыши Neuro-2aCCL-131™.

1. Uversky V. Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2013, vol. 1834, pp. 932-951.
2. Oates M.E., Romero P., Ishida T., Ghalwash M., Mizianty M.J., Xue B., Dosztányi S., Uversky V.N., Obradovic Z., Kurgan L., Dunker A.K., Gough J. D2P2: Database of Disordered Protein Predictions // *Nucleic Acids Research*, 2013, vol. 41, pp. 508-D516.
3. Dass R., Mulder F.A.A., Nielsen J.T. ODINPred: comprehensive prediction of protein order and disorder // *SciRep.*, 2020, vol. 10, p. 14780.
4. Lashuel H.A., LaBrenz S.R., Woo L., Serpell L.C. Kelly J.W. Protofilaments, filaments, ribbons, and fibrils from peptidomimetic self-assembly: implications for amyloid fibril formation and materials science // *Am. Chem. Soc.*, 2000, vol. 122, pp. 5262-5277.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ РЕКОМБИНАТНОГО РЕЦЕПТОРА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ BLAR-CTD

Structural and Functional Stability of Recombinant Receptor of Beta-Lactam Antibiotics BlaR-CTD

Серченя Т.С.¹, Горбачева И.В.¹, Семижон П.А.², Счесленок Е.П.², Вашкевич И.И.¹, Свиридов О.В.¹

¹ Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь, serchenya@iboch.by

² РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, Беларусь, pavel.semizhon@gmail.com

Рецепторный анализ как альтернатива иммуноанализу является перспективным биотехнологическим подходом к количественному определению антибиотиков в продуктах питания и предусматривает создание высокочувствительных лиганд-связывающих тест-систем. В таких системах применяются бактериальные белки, которые *in vivo* выполняют функции рецепторов антибиотиков в клеточных системах лекарственной устойчивости. Так, клетки *Bacillus licheniformis* содержат трансмембранный рецепторный белок BlaR, связывающий бета-лактамы антибиотиков и играющий роль сенсора-трансдуктора синтеза бета-лактамаз. Рецепторный сайт BlaR локализован во внеклеточном С-концевом домене (CTD). В биотехнологических исследованиях именно этот фрагмент белка BlaR-CTD гетерологически экспрессируется, очищается и приобретает форму базового реагента биоаналитических систем контроля содержания остаточных количеств бета-лактамов в пищевой продукции животного происхождения.

В нашей работе для технологий биоанализа бета-лактамы антибиотиков получен высокоочищенный рекомбинатный рецептор бета-лактамов BlaR-CTD. Для продуцирования рекомбинатного полипептида осуществляли трансформацию клеток *E.coli*, штамм BL21 (DE3), гибридной плазмидой pJ40 со вставкой, кодирующей последовательность BlaR-CTD. Выделение белка проводили металлохеллатной хроматографией с последующей адсорбционной хроматографией на гидроксипатите. Разработана специальная тест-система для количественного определения BlaR-CTD, обладающего рецепторной активностью и иммунореактивностью, в процессах его гетерологической экспрессии, выделения и приготовления реагентных форм. Исследована структурно-функциональная стабильность рекомбинатного BlaR-CTD, установлены его иммунохимические свойства и способность связывать бета-лактамы антибиотиков. Так как основным условием применения рекомбинатного рецептора BlaR-CTD является получение его в активной форме, нами было проведено сравнительное исследование устойчивости рецепторного белка при действии ряда химических агентов, изменений pH среды и температуры в процессах его получения и очистки. Для установления биоактивности BlaR-CTD после воздействия химических и физических факторов применяли разработанную рецепторно-иммунную сэндвич-систему. Особенностью этой тест-системы является оценка двух независимых биоспецифических реакций BlaR-CTD, включающих его взаимодействия за счет рецепторного сайта и при участии иммунореактивных эпитопов. В анализе рекомбинатный рецептор вначале связывается с бета-лактамым антибиотиком в составе белкового конъюгата, иммобилизованного на внутренней поверхности лунок полистирольного планшета. Далее экспонированный в раствор эпитоп связанного рецептора в роли антигена взаимодействует с поликлональными антителами к BlaR-CTD, ковалентно присоединенными к пероксидазе из корней хрена. В качестве калибровочных проб в системе используются растворы очищенного BlaR-CTD с установленными характеристиками лиганд-связывающей активности и иммунореактивности. В работе структурно-функциональные свойства BlaR-CTD оценивали в условиях различного микроокружения. При установлении воздействия на белок химических факторов – мочевины, гуанидингидрохлорида, додецилсульфата натрия и pH среды растворы BlaR-CTD инкубировали в растворах с различными концентрациями денатурантов, а также при pH в диапазоне 3–12, после чего пробы разводили буфером для анализа в 100 раз для нивелирования действия агентов и проводили анализ. В тест-системе измеряли концентрации исследуемых проб по

калибровочному графику и рассчитывали активность как отношение концентраций в исследуемой и контрольной пробах. В качестве контрольной пробы был выбран раствор белка в натрий-фосфатном буфере, pH 7,0. В результате исследования установлена достаточно высокая устойчивость BlaR-CTD к действию денатурантов. Так, даже в условиях 4 М мочевины или 4 М гуанидингидрохлорида белок сохраняет до 80–90 % своей лиганд-связывающей активности и иммунохимических свойств. Происходящие структурные изменения при действии более высоких концентраций денатурантов – 6 М гуанидингидрохлорид и 8–10 М мочевина – также не приводят к полной инактивации этого рецепторного белка. Показано, что оптимум pH для взаимодействия между BlaR-CTD и твердофазным бета-лактамом находится в пределах pH 5–7. В условиях уменьшения или увеличения pH среды в буферных растворах с pH 2–3 или pH 10–12 в результате структурных изменений наблюдается подавление связывающих свойств рецепторного белка, и BlaR-CTD характеризуется остаточной активностью в пределах 30–55 %. Анализ стабильности при воздействии тепловой обработки в диапазоне 25–100 °C показал, что происходят изменения активности BlaR-CTD при действии повышенных температур, и в результате инкубации при 55 °C в течение 1 ч остаточная активность составила 30 %. Найдено, что после воздействия денатурирующих факторов BlaR-CTD обладает способностью к ренатурации. Таким образом, в результате работы получен в чистом виде рекомбинатный микробный белок BlaR-CTD, связывающий бета-лактамы антибиотиков, и с помощью разработанной системы рецепторно-иммунного анализа исследована его структурно-функциональная стабильность в процессах экспрессии, очистки и биоаналитического применения.

ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МИЛЛИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА НА КУЛЬТУРЫ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Influence of Low-Intensity Electromagnetic Radiation of a Millimeter Range on Cultures of Gram-Positive and Gram-Negative Opportunistic Pathogenic Bacteria

Сидякин А.И., Джелдубаева Э.Р., Чуян Е.Н., Чмелёва С.И., Туманянц К.Н., Ливенцов С.Ю.
Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, г. Симферополь, РФ, acid2302@mail.ru

В настоящее время широко распространено использование в медицине и физиотерапии электромагнитных колебаний различной частоты, длины волны, и мощности, которые могут оказывать различные биологические эффекты.

В настоящее время во время физиотерапевтических процедур наиболее часто используются диапазоны колебаний волн от 42 до 65 ГГц с длиной волны от четырех до восьми миллиметров. Такие электромагнитные колебания вследствие их взаимодействия с макроорганизмами как животных, так и человека оказывают хорошо известные физиологические эффекты, включая активацию неспецифического адаптационного потенциала, активацию конформационных перестроек организма и иные.

Одной из проблем современной медицинской микробиологии является довольно широкое распространение различных, в том числе и внутрибольничных инфекций вызываемых различными штаммами бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Первые два вида бактерий – грамотрицательные неспорообразующие палочки, третий вид относится к грамположительным неспорообразующим коккам. Все три вида бактерий, в зависимости от штаммовой принадлежности могут являться как возбудителями оппортунистических инфекций, развивающихся при ослаблении иммунитета, так и яркими представителями патогенной микрофлоры, которые вызывают патологические состояния различной степени тяжести. Так как известно, что КВЧ-терапия оказывает благоприятное воздействие на организм животных и человека, а вот эффекты которое оказывает КВЧ-терапия на микробиом человека, который подвергается процедуре КВЧ-терапии в доступной нам научной литературе не описаны, поэтому, задачей настоящего исследования являлось установить какие именно эффекты сопровождают влияние низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ (НИ ЭМИ КВЧ) длина волны – 7,1 мм; частота излучения – 42,3 ГГц; плотность потока мощности облучения – 0,1 мВт/см²) на чистые культуры указанных видов грамположительных и грамотрицательных видов бактерий в модельном эксперименте.

Для изучения оказываемых на бактерии эффектов нами использовались штаммы *E. coli* – И10, *Ps. aeruginosa* И4 и *St. aureus* И1 из коллекции кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий, выделенные от клинически здоровых пациентов в 2019 году. Указанные штаммы являются типичными, и, согласно паспортам, проявляют типовые для указанных видов физиолого-биохимические и морфолого-культуральные свойства.

Дизайн эксперимента: изолированные колонии суточных культур указанных штаммов, после их реактивации из системы хранения при -80°C выращенные на ГРМ-агаре (производитель - ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск), перевивались в жидкую среду – ГРМ-бульон, и в течение 12-18 часов культивировали на подвесной двухъярусной качалке с угловым (степень отклонения от центральной оси 4°) роторным типом перемешивания с частотой вращения 320 об/мин и Ø эксцентрика 250 мм. Полученную маточную культуру с титром не менее 0,5 по стандарту мутности по МакФарланду (титр около $1,5 \times 10^8$ КОЕ / мл) использовали в эксперименте: по

8,0 мл культуры переносили в стерильные пластиковые стаканы, диаметром четыре сантиметра. Контрольный образец оставляли без обработки, а экспериментальный вариант в течение 30 минут обрабатывали НИ ЭМИ КВЧ (параметры излучения: длина волны – 7,1 мм; частота излучения – 42,3 ГГц; плотность потока мощности облучения – 0,1 мВт/см²) периодически помешивая. После обработки культур по 1,0 см³ в трех аналитических повторностях засеивали в колбы со свежим ГРМ-бульоном и еще 24 часа культивировали на качалке, после чего стандартными микробиологическими методом пластинок с высевом в глубину ГРМ-агара с добавкой 5,0 г/л глюкозы определяли титр жизнеспособных клеток в контрольных и опытных аналитических повторностях. Полученные данные по титру КОЕ в опытных (после обработки НИ ЭМИ КВЧ) и контрольных (необлученных КВЧ) вариантах обрабатывались статистически с применением t-критерия Стьюдента пакета прикладных программ Microsoft Office Excell применительно к малым выборкам.

Наши исследования показали, что в культурах грамотрицательных бактерий под действием НИ ЭМИ КВЧ наблюдаются различные эффекты. Так, количество жизнеспособных клеток культуры *E. coli* составило в опытных вариантах, т.е. тех, которые были подвергнуты КВЧ не менее 32×10^7 КОЕ/см³. При этом в контрольном варианте этого же штамма количество жизнеспособных клеток составило 22×10^7 КОЕ/см³, что на 42,5% выше, чем в опыте ($p \leq 0,01$). Под действием НИ ЭМИ КВЧ количество клеток *P. aeruginosa* в опыте составило $23,8 \times 10^7$ КОЕ/см³, а в контроле – $27,8 \times 10^7$ КОЕ/см³, что на 16,8% ниже, чем в контроле ($p \leq 0,02$). При исследовании влияния ЭМИ КВЧ на культуру стафилококка, нами показано, так же как и для культуры *E. coli* наблюдается увеличение титра клеток в опытном варианте по сравнению с контролем: в контроле (без обработки КВЧ) средний титр культуры *St. aureus* составил $9,1 \times 10^8$ КОЕ/см³, а в варианте с обработкой КВЧ средний титр составил $21,4 \times 10^8$ КОЕ/см³, что на 136% выше, чем без обработки КВЧ ($p \leq 0,05$).

ИЗМЕНЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ОБЪЕМА ЭРИТРОЦИТА

Changes in the Erythrocyte Hemoglobin Conformation and Distribution during RBC Volume Changes

Слатинская О.В., Максимов Г.В.

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

В настоящее время большой интерес вызывают исследования, связанные с механизмом регуляции конформации и распределения гемоглобина при изменениях ионного гомеостаза эритроцита. Вероятно, изменения морфологии или объема эритроцита приводят к изменению способности гемоглобина (Гб) связывать или сбрасывать лиганды (в том числе O₂ и NO_x). Очевидно, эти процессы могут как вызвать нарушения газообмена в организме, так и быть последствием ряда патологий [1]. Так, увеличение внутриклеточной концентрации ионов Na⁺ выявлено у больных с хронической почечной недостаточностью и при уремии [2]. Важно, что перераспределение ионов в эритроците сопровождается изменениями мембранного потенциала, которые модифицируют состояние мембранных белков и липидов. Существенную роль в регуляции объема и формы эритроцита выполняет фермент Na-K-АТФаза (Na-K-аденозин трифосфатаза EC 3.6.3.9) [3]. Важную роль в изменении функций эритроцитов выполняет процесс регуляции Na⁺/K⁺ - баланс содержания ионов в цитоплазме клетки [4]. Однако мало известно, каким образом изменения ионного гомеостаза и/или мембранного потенциала при работе Na-K-АТФазы в эритроците регулируют распределение и конформацию гемоглобина. Целью работы было исследование конформации и перераспределения Гб в эритроците при блокировании активности Na-K-АТФазы убаином.

С помощью методов оптической спектроскопии (Раман-спектроскопия, инфракрасная спектроскопия, лазерная интерференционная микроскопия) были исследованы изменения морфологии и конформации Гб в эритроците в результате увеличения [Na⁺]_{in} в клетке. Установлено, что блокирование Na⁺/K⁺-АТФазы приводит не только к увеличению [Na⁺]_{in} в клетке, но и увеличению положительного заряда на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны. В этих условиях выявлены изменения конформации как гема, так и белковой глобулы Гб, а именно, снижение плотности упаковки молекулы Гб, которые могут быть связаны как с сорбцией Na⁺ с Гб, так и увеличением количества молекул воды в клетке и перераспределением Гб в клетке. Вероятно, перераспределение Гб и изменение плотности упаковки участка глобина оказывают влияние на конформацию гема, увеличивая вероятность нахождения гема гемоглобина в куполообразной конформации и, таким образом, повышает способность связывать O₂.

Таким образом, увеличение [Na⁺]_{in} в клетке может привести как к деполяризации плазматической мембраны и изменению конформации примембранного Гб, так и к перераспределению и изменению конформации цитоплазматического Гб. Все вышеперечисленное нарушает способность эритроцитов переносить кислород и является причиной гипоксии в норме и при патологии.

1. Иванова С.М., Лабеецкая О.И., Анисимов Н.А., Максимов Г.В., Паршина Е.Ю., Юсипович А. И. Морфобиохимические показатели эритроцитов и состояния гемопорфиринов гемоглобина у обследуемых в динамике кратковременной изоляции в гермообъеме // Авиакосмическая и экологическая медицина, 2019, т. 53, № 2, doi: 10.21687/0233-528X-2019-53-2-62-67.

2. Weiler E.W., Saldanha L.F., Khalil-Manesh F., Prins B.A., Purdy R.E., Gonick H.C. Relationship of Na-K-ATPase inhibitors to blood-pressure regulation in continuous ambulatory peritoneal dialysis and hemodialysis // Journal of the American Society of Nephrology, 1996, vol. 7, no. 3, doi: 10.1681/ASN.V73454.

3. Katyukhin L.N., Kazennov A.M., Maslova M.N., Matskevich Y.A. Rheologic properties of mammalian erythrocytes: relationship to transport ATPases // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1998 vol. 120, no. 3, doi: 10.1016/S0305-0491(98)10035-4.

4. Погорелое А.Г., Русаков А.В., Погорелова, В.Н. Цитоплазматический К/Na-баланс в мышечной клетке сердца при кислород-субстратном дефиците у молодых и старых крыс // Биофизика, 2006, т. 51, № 5, doi: 10.1134/S0006350906050149.

АТФ-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ТОНУСА КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ В ГИПООСМОТИЧЕСКОЙ СРЕДЕ

ATP-Dependent Regulation of Vascular Tone in Hyposmotic Medium

Смаглий Л.В., Гусакова В.С., Гусакова С.В., Калинина А.А., Рязанцева П.Е., Сафарова А.Ш., Шарипханова Ж.А.,

Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск, РФ, lud.smagly@yandex.ru

Тонус кровеносных сосудов регулируется многими факторами. В частности, к таким факторам относятся внеклеточные нуклеотиды – аденозин-5'-трифосфат (АТФ) и уридин-5'-трифосфат (УТФ). Их основными источниками служат симпатические окончания нервных волокон, эндотелиальные клетки, эритроциты. АТФ неселективно активирует пуринергические рецепторы P2X и P2Y, регулируя сократимость гладкомышечных клеток кровеносных сосудов, что влияет на показатели артериального давления. УТФ же действует на рецепторы группы P2Y, так же участвуя в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток [1]. Кроме нуклеотидов важными компонентами системы регуляции тонуса кровеносных сосудов являются газотрансмиттеры. Известно, что посредником в передаче сигнала от пуринергических рецепторов является оксид азота. Повышение концентрации внеклеточного АТФ в кровеносном русле сопровождается усилением продукции оксида азота в эндотелиальных клетках, что способствует расслаблению гладкомышечных клеток сосудов [2]. Цель исследования. Исследовать вклад эндотелия в пуринергическую регуляцию гладкомышечных клеток легочной артерии при набухании в гипосмотической среде.

В качестве объекта исследования использовали изолированные кольцевые сегменты ЛА (СЛА) крыс линии Wistar с интактным эндотелием (Э+) и деэндотелизированные (Э-). Исследование сократительной активности гладких мышц проводили методом механографии с использованием четырехканальной механографической установки Myobath II (WPI). Гипосмотическую стрижку вызывали инкубацией сегментов в гипосмотическом растворе, содержащем 40 мМ NaCl. Амплитуду ответов рассчитывали в процентах от контрольного сокращения на действие гиперкалиевого раствора Кребса (30 мМ KCl), которые принимали за 100%.

Результаты. Добавление 10-100 мкМ АТФ не влияло на базальный тонус СЛА с интактным и удаленным эндотелием. В СЛА (Э-) 500 и 1000 мкМ АТФ вызывали развитие низкоамплитудных транзиторных сократительных ответов амплитудой 3,1 (1,9; 4,0) и 20,2 (16,9; 28,5) % ($p < 0,05$; $n = 6$) % от контрольного сокращения, тогда как в СЛА (Э+) - 9,1 (8,8; 9,4) и 11,5 (10,9; 11,9) %, соответственно. Помещение СЛА (Э-) в гипосмотический раствор (40 мМ NaCl) приводило к развитию транзиторного сокращения амплитудой 69,5 (65,3; 85,4) % и длительностью 32,5 (30,0; 39,0) мин ($n=11$). Амплитуда сокращений СЛА (Э+) в гипосмотической среде составила 63,1 (59,2; 67,5) %, а длительностью 27 (25,0; 29,0) мин ($n=6$). АТФ (500 мкМ) не оказывал статистически значимого влияния на амплитуду гипосмотической стрижки (61,4 (57,0; 71,5) % ($p>0,05$, $n=6$), однако подавлял фазу расслабления в СЛА (Э-), но не СЛА (Э+). Этот эффект устранялся буметанидом и нифлумовой кислотой - ингибиторами НКСС и Ca²⁺-активируемых Cl-каналов, соответственно. Предобработка сосудистых сегментов блокатором NO-синтазы L-NAME (50 мкМ, 60 мин) не оказывала статистически значимого влияния на величину гипосмотической стрижки, а также гипосмотической стрижки в присутствии АТФ (500 мкМ). Предобработка сегментов ингибитором гуанилатциклазы ODQ (5 мкМ, 30 мин) увеличивала величину гипосмотической стрижки до 90,8 (90,2; 91,5) % ($n=6$, $p<0,05$), которая приобретала поддерживаемый характер. Амплитуда гипосмотической стрижки в присутствии АТФ также достоверно увеличивалась по сравнению с гипосмотической стрижкой в присутствии АТФ без ингибирования гуанилатциклазы, составив 89,6 (73,2; 90,8) % ($n=6$, $p<0,05$), однако не отличалась от стрижки на фоне ингибирования гуанилатциклазы в отсутствие АТФ ($p>0,05$). При этом сегменты частично сохраняли способность к расслаблению: величина остаточного МН после гипосмотической стрижки составила 32,0 (29,5; 44,4) % от контрольного гиперкалиевого сокращения ($n=6$, $p<0,05$). Полученные данные могут быть связаны с активацией синтеза NO внеклеточным АТФ, который дополнительно активирует ГЦ и последующее расслабление сегментов.

Выводы. АТФ оказывает констрикторное действие на СЛА с интактным и удаленным эндотелием. В СЛА (Э-) АТФ подавляет фазу расслабления гипосмотической стрижки, что связано с активацией Ca²⁺-

активируемых С1-каналов и НКСС. Эндотелий препятствует проявлению констрикторного действия АТФ на гипеоосмотическую стрижку за счет активации цГМФ-зависимой сигнальной системы.

1. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission // *Physiol. Rev*, 2007, vol. 87, pp. 659-797.
2. Sprague R.S., Ellsworth M.L. Erythrocyte derived ATP and perfusion distribution: role of intracellular and intracellular communication // *Microcirculation*, 2012, vol. 19, pp. 430-439. doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00158.x.

**КАТАЛИТИЧЕСКИЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ
АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ОКСИДА АЗОТА**
**Catalytic and Kinetic Properties of Antioxidant Protection Enzymes in the Blood during Experimental Thermal
Injury under the Influence of Nitric Oxide**

Соловьева А.Г.

Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, г. Нижний Новгород, РФ,
sannag5@mail.ru

Изучение механизмов функционально-биохимической перестройки организма, попадающего в экстремальные условия, а также разработка методов, позволяющих повысить устойчивость организма к пребыванию в таких условиях, является фундаментальной медико-биологической проблемой. Термическая травма – один из наиболее распространенных видов бытового травматизма, учащающийся в условиях обострения военной обстановки. Цель исследования – изучить особенности регуляции ферментов антиоксидантной защиты в крови при экспериментальной комбинированной термической травме (КТТ) под воздействием оксида азота.

Эксперимент проведен на 30 белых крысах-самцах линии Wistar. Животных разделили на 3 равные по численности группы: 1 – интактные крысы; 2 – контрольная – животные с КТТ; 3 – опытная – животные с КТТ, получавшие ингаляции NO (иNO). Крысам под наркозом (Золетил 100 (60 мг/кг) + Ксила (6 мг/кг)) наносили контактный ожог (20% поверхности тела) и термоингаляционное воздействие. Животных выводили из эксперимента после КТТ на 10 сутки. В эритроцитах крови определяли активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионредуктазы (ГР) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-фДГ). Ингаляционно-наружное воздействие NO при КТТ осуществляли ежедневно в течение 10 дней по 10 мин, скорость подачи газовой смеси – 2 л/мин. Синтез газовой смеси производили с помощью аппарата для генерации NO (РФЯЦ-ВНИИЭФ, г. Саров) [1]. Рассчитывали кинетические параметры ферментативной реакции: Kt – время полупревращения субстрата (мин); Vmax – максимальная скорость накопления продукта реакции (мкмоль/мин); Vmax/Kt – коэффициент каталитической эффективности (мкмоль/мин²). Статистическую обработку результатов проводили с помощью Statistica 6.0 (Statsoft Inc., USA).

В эритроцитах выявлено падение активности антиоксидантных ферментов на 10 сутки после КТТ по сравнению со здоровыми животными: СОД – на 25% (p=0,021), каталазы – на 48% (p=0,011), ГР – на 30% (p=0,026), Гл-6-фДГ – на 29% (p=0,033), что может быть связано с усилением окислительно-восстановительных процессов и снижением энергетического обмена в митохондриях при КТТ и конформационной модификацией молекул ферментов в условиях окислительного стресса. При этом, постожоговое снижение активности Гл-6-фДГ в эритроцитах периферической крови следует рассматривать как индикатор перенапряжения физиологической глутатионовой системы в условиях КТТ [2]. Уменьшение удельной активности СОД и каталазы в эритроцитах при КТТ сопровождалось снижением сродства ферментов к субстратам реакции и Vmax/Kt. При КТТ Kt увеличилось для СОД в 2,2 раза (p<0,001), для каталазы – в 2,4 раза (p<0,001), Vmax/Kt уменьшилась для СОД в 3,2 раза (p<0,001), для каталазы – в 3,6 раза (p<0,001). Для ГР и Гл-6-фДГ было характерно снижение Vmax и Vmax/Kt при КТТ.

В эритроцитах при КТТ выявлена активация СОД под влиянием иNO по сравнению с показателями крыс с КТТ и здоровых крыс на 55,03% (p=0,014), 15,61% (p=0,017), что препятствует образованию ONOO⁻. Показано, что экзогенная NO-терапия активировала удельную активность ГР, приводя к повышению содержания НАДН или НАДФН. В эритроцитах удельная активность каталазы возросла при КТТ под влиянием ингаляций NO на 92,71% (p<0,001) по сравнению с показателем крыс с КТТ. NO вызвал рост активности Гл-6-фДГ в эритроцитах при КТТ по сравнению с показателями крыс с ожогом без лечения на 99,34% (p<0,001). Активация СОД, Гл-6-фДГ, ГР в эритроцитах при КТТ под влиянием иNO обусловлена ростом сродства фермента к субстрату реакции и Vmax/Kt. При КТТ в эритроцитах для СОД Vmax/Kt увеличилась под влиянием ингаляций NO – в 4,4 раза (p<0,001), для Гл-6-фДГ – в 3,1 раза (p<0,001), по сравнению с показателями крыс с КТТ без лечения. Kt и Vmax для каталазы нормализовались под влиянием ингаляций NO при КТТ.

Таким образом, на фоне снижения активности антиоксидантных ферментов в крови при КТТ наибольшее ингибирование отмечено для каталазы. Кинетическим методом анализа впервые установлен характер ингибирования ферментов при КТТ: для СОД и каталазы в эритроцитах – двухпараметрически согласованное, для ГР и Гл-6-фДГ – каталитическое. иNO при КТТ активировал СОД, каталазу, ГР и Гл-6-фДГ.

1. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Карелин В.И., Селемир В.Д. Влияние NO-содержащего газового потока на некоторые параметры энергетического метаболизма эритроцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2014, т. 158, № 7, с. 40-42.

2. Spolarics Z. et al. Increased incidence of sepsis and altered monocyte functions in severely injured type A-glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient African American trauma patients // Crit. Care Med., 2001, vol. 29, pp. 728-736.

СТАБИЛИЗАЦИЯ АКТИВНОСТИ БРОМЕЛИНА, ПАПАИНА И ФИЦИНА ПУТЕМ ИХ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ С ГРАФТ-СОПОЛИМЕРАМИ НАТРИЕВОЙ СОЛИ КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ И *N*-ВИНИЛИМИДАЗОЛА
Activity Stabilization of Bromelain, Papain, and Ficin by Complexation with Graft Copolymers of Sodium Carboxymethyl Cellulose and *N*-vinylimidazole

Сорокин А.В.^{1,2}, Ольшанникова С.С.¹, Лавлинская М.С.^{1,2}, Холявка М.Г.^{1,2}, Юдин Н.Е.¹, Артюхов В.Г.¹

¹ Воронежский государственный университет, г. Воронеж, РФ

² Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ, andrew.v.sorokin@gmail.com

Растительные цистеиновые протеазы – бромелин (КФ 3.4.22.32/ 3.4.22.33), папаин (КФ 3.4.22.2) и фицин (КФ 3.4.22.3) – известны широким спектром терапевтических свойств, среди которых антибактериальная, противовоспалительная, противовирусная и ранозаживляющая активности. Однако использование этих энзимов в биомедицинских целях ограничено в виду низкой их стабильности в растворе и склонности к автолизу. Решить эту проблему можно путем получения иммобилизованных ферментных препаратов, в которых в качестве носителя используются низкотоксичные модифицированные биополимеры. В связи со сказанным выше, целью настоящей работы является стабилизация активности бромелина, папаина и фицина путем их комплексообразования с графт-сополимером натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола.

Для синтеза графт-сополимеров использовали натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы со средней молекулярной массой 90 кДа и степенью замещения 0,7 и мономер *N*-винилимидазол (оба Sigma Aldrich, Германия), который перегоняли в вакууме непосредственно перед использованием. Графт-сополимеры получали растворной радикальной полимеризацией в воде в присутствии иницирующей смеси персульфат калия-метабисульфит натрия (1:1 мол.). Синтезированные продукты охарактеризовывали методами ИК-спектроскопии, лазерного доплеровского микроэлектрофореза, динамического рассеяния света и просвечивающей электронной микроскопии. Для привитых боковых цепей определены значения молекулярных масс. Выявлено, что все полученные графт-сополимеры растворимы в воде, а также обладают склонностью к самоассоциации в водном растворе. Более того, полученные продукты характеризуются рН-чувствительностью и проявляют амфифильные свойства в зависимости от рН среды.

Исследование механизмов взаимодействия цистеиновых протеаз и синтезированных графт-сополимеров осуществляли методами ИК-спектроскопии, а также *in silico* гибким молекулярным докингем. Из результатов ИК-спектроскопии выявлено, что между макромолекулами графт-сополимеров и бромелина, папаина, фицина происходит конъюгирование, в процесс которого вовлечены как функциональные группы карбоксиметилцеллюлозы, так и боковые привитые цепи поли-*N*-винилимидазола. Исследование *in silico* показывает, что в процессе образования комплекса фермент-носитель участвуют аминокислотные остатки, формирующие активные центры протеаз. Таким образом, логично предположить, что конъюгирование бромелина, папаина и фицина графт-сополимерами окажет влияние на каталитическую активность получаемых биокатализаторов.

Протеолитическая активность (в ед на мл раствора) полученных ферментных препаратов, измеренная в реакциях гидролиза субстрата азоказеина, составила 159±2,6 для бромелина, 137±5,8 для папаина и 157±3,2 для фицина, что составляет 161, 144 и 163 % от активности нативных ферментов. Анализ содержания белка в комплексном ферментном препарате (мг белка на г носителя), осуществленный по модифицированному методу Лоури, показал следующие значения: 32,8±1,5 мг/г для бромелина, 37,5±1,1 мг/г для папаина и 30±1,8 мг/г для фицина. Удельная активность (в ед на мг белка) иммобилизованных ферментных препаратов составила 102,9±2,2 для фицина, 73±3,1 для папаина, 95±1,5 для бромелина. По-видимому, высокая активность полученных биокатализаторов обусловлена высоким содержанием в них энзимов, а не формированием их глобулами более каталитически выгодных конформаций.

Исследование стабильности полученных препаратов было осуществлено путем измерения остаточной каталитической активности (в ед на мл раствора) после инкубации образцов при 37 °С в 50 мМ Трис-НСI буфере, рН 7,5. После 1 суток иммобилизованные ферменты сохраняли более 80 % своей каталитической активности. По истечению 21 суток и при дальнейшем увеличении времени инкубации различия в потере каталитической способности ферментов в растворе и в комплексах с носителями стали более выражены. Активность свободных ферментов составила для бромелина 5.8 %, для папаина 15 %, для фицина 3.8 %, а иммобилизованных ферментов – 31% для бромелина, 25 % для папаина и 39 % для фицина.

Таким образом, использование графт-сополимеров натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола в качестве матрицы для получения комплексных препаратов бромелина, папаина и фицина с высокой протеолитической способностью является перспективным для потенциального создания лекарственных препаратов и биокатализаторов нового поколения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект № 21-74-20053.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИАЦИИ ФЕРРОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ КОМПЛЕКСОВ ЦИТОХРОМА С С ФОСФАТИДНОЙ КИСЛОТОЙ **Molecular Mechanisms of Initiation of Ferroptotic Processes under the Action of Cytochrome C Complexes with Phosphatidic Acid**

Сучков М.Ю., Степанов Г.О., Осипов А.Н.

РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, г. Москва, РФ, *max.suchkov3001@yandex.ru*

Биофизические механизмы апоптоза, которые характеризуется увлечением пероксидазной активности цитохрома С после его взаимодействия с митохондриальными фосфолипидами сегодня достаточно хорошо изучены. Сегодня внимание ученых во всем мире привлечено к исследованию молекулярных и клеточных механизмов ферроптоза связанных с действием свободного железа. Так очень затруднительным является вопрос об источнике свободного железа, который является катализатором перекисного окисления биологических мембран, которое происходит при ферроптозе [2].

Целью данной работы было исследование между способностью цитохрома С терять ион железа при возрастающих концентрациях пероксида водорода, а также изменением его пероксидазной активности на протяжении данного процесса. Полученные зависимости сравнивались как для образцов, содержащих только цитохром С, так и для цитохрома с образующего комплексы с различными анионными фосфолипидами (фосфатидилхолином, кардиолипином и фосфатидной кислотой).

Оценка содержания ионов железа в цитохроме С выполнялась при помощи спектрофотометрии (по интенсивности полосы Core), эти спектры сравнивались кинетической кривой люминол-зависимой хемилюминесценции, отражающей пероксидазную активность цитохрома С

Хорошо известно, что при взаимодействии высокой концентрации перекиси водорода с цитохромом С происходит падение полосы Core при 410 нм, что и объясняет выход гемового железа, который может влиять на развитие ферроптотических процессов. Было показано, падения полосы Core цитохрома С в присутствии фосфатидной кислоты начинается много быстрее (при концентрациях пероксида водорода 300 мкМ), чем в контрольных образцах, где изменение поглощения начиналось с 500 мкМ концентраций. При этом также было видно, что образцы содержащие фосфатидную кислоту сначала (до начала падения полосы Core) уже проявляют пероксидазную активность, которая была примерно в 10 раз выше, чем у комплексов цитохрома С с фосфатидилхолином.

В результате проведенных экспериментов было показано, что снижение интенсивности полосы Core сопровождается увеличением интенсивности хемилюминесценции, что в свою очередь говорит о повышении пероксидазной активности цитохрома С.

Таким образом, показано, что цитохром С при взаимодействии с перекисью водорода может способствовать повышению концентрации железа, что в свою очередь индуцирует процесс ферроптоза.

1. Kagan V.E. et al. Redox phospholipidomics of enzymatically generated oxygenated phospholipids as specific signals of programmed cell death // *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, vol. 147, pp. 231-241.

2. Ursini F., Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4 // *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, vol. 152, pp. 175-185.

СТЕПЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК И ПОЛИМОРФИЗМ rs652438 ГЕНА *MMP-12* ПРИ МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

The Degree of Oxidative Damage to DNA and MMP-12 gene rs652438 Polymorphism in Multifactorial Diseases under Oxidative Stress

Текуцкая Е.Е., Гусарук Л.Р., Павлюченко И.И.

Кубанский государственный университет, г. Краснодар, РФ, tekytska@mail.ru

Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, РФ, gusaruk@yandex.ru

Известно, что ксенобиотики, высокорезакционные клеточные метаболиты, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение приводят к активации процессов свободно-радикального окисления и, как следствие, накоплению в клетках активных форм кислорода (АФК). Вызывая окислительную модификацию различных клеточных структур, они воздействуют, в том числе, на ее генетический материал, приводя к повреждению азотистых оснований ДНК, дестабилизируя геном. В связи с этим крайне важным является выявление степени окислительной модификации геномной ДНК у больных генетически обусловленными заболеваниями, такими как буллезный эпидермолиз (БЭ) и бронхиальная астма (БА), протекающий в условиях индуцирования окислительного стресса (ОС).

Наиболее распространенным продуктом окислительной модификации азотистых оснований является 8-оксо-7,8-дигидрогуанин (8-охоG). Степень окислительного повреждения ДНК оценивали по уровню концентрации 8-охоG в сыворотке крови, содержание которого определяли методом иммуноферментного анализа с моноклональными антителами наборами реагентов DNA Damage, ELISA на микропланшетном ридере Thermo Fisher Scientific Multiskan. Выделение ДНК производили сорбционным методом, используя наборы реагентов «ДНК-Сорб В». Типирование полиморфного варианта rs652438 гена *MMP12* осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе Rotor-Gene (Qiagen, Германия). Для определения устойчивости геномного материала к окислительной модификации в условиях окислительной нагрузки образцы цельной крови в выборке из 8 больных БЭ (орфанная патология, ограниченное число больных и трудности с забором биоматериала для исследований,) 20 больных БА и 20 условно здоровых доноров [1] обрабатывали электромагнитным полем (ЭМП) частотой 3, 30 и 50 Гц в соответствии с методикой, описанной ранее [2].

В группе больных БЭ уровень содержания 8-охоG изменялся от 10,0 до 22,2 нг/мл и в среднем составлял $14,8 \pm 2,1$ нг/мл, что в 1,9 раза выше, чем в контроле. При БА уровень изучаемого метаболита составил в среднем по выборке $9,4 \pm 1,7$ нг/мл, что сопоставимо с контролем. Это дает основание не рассматривать БА как фактор выраженного ОС, проявляющегося на субклеточном уровне и значимо влияющего на целостность наследственного аппарата. Почти двукратное увеличение концентрации 8-охоG при БЭ свидетельствует о значительной степени нарушения структуры молекулы ДНК. Так как большая часть 8-охоG образуется в результате воздействия АФК, наблюдаемая в данном случае дестабилизация генома происходит в результате наличия окислительного генотоксического стресса, который формируется в результате активации реакций свободно-радикального окисления и недостаточности систем антиоксидантной защиты. Выработанная в организме система защиты, призвана восстановить повреждения, однако, имеющее место при БЭ накопление 8-охоG, может служить триггером мутаций, которые способны ослабить процессы эксцизионной репарации, не позволяя обеспечить восстановление структуры ДНК.

При воздействии ЭМП частотой 3 Гц концентрация 8-охоG достоверно увеличивалась при БЭ, достигая 14,8 нг/мл. Дальнейшее увеличение частоты до 30 Гц и 50 Гц не изменяло этот параметр, оставляя количество 8-охоG на уровне 14,4 и 13,4 нг/мл соответственно, что говорит о максимальной модификационной подверженности к окислительной модификации в условиях нормально функционирующей системы антиоксидантной защиты. При БА воздействие ЭМП частотой 3 Гц достоверно увеличивало концентрацию изучаемого метаболита до 18,0 нг/мл. При 30 Гц показатель 8-охоG оставался на уровне предыдущего значения – 17,4 нг/мл, а при 50 Гц снижался до 8,2 нг/мл.

Таким образом, установлено, что характер окислительного повреждения ДНК, вызванного действием ЭМП, свидетельствует о более раннем по сравнению с контролем истощении адаптационных механизмов генома при БА. Определены частоты генотипов и аллелей полиморфного локуса rs652438 гена *MMP12* в контрольной группе и при БА. Показан протекторный эффект в отношении развития БА у носителей аллеля G в популяции Краснодарского края.

1. Павлюченко И.И., Гусарук Л.Р., Текуцкая Е.Е. База данных результатов исследования полиморфных вариантов генов и степени окислительных повреждений ДНК в популяции жителей отдельного региона. Свидетельство о регистрации базы данных 2022621020, 05.05.2022. Заявка № 2022620895 от 28.04.2022.

2. Текуцкая Е.Е., Гусарук Л.Р., Ильченко Г.П. Влияние переменного магнитного поля на хемилуминесценцию лимфоцитов периферической крови человека и производство ими провоспалительных цитокинов // Биофизика, 2022, т. 67, № 1, с. 113-120, doi: 10.31857/s0006302922010112.

ГИДРОГЕЛИ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ КАРРАГИНАНОВ И 5-ФТОРУРАЦИЛА

Carrageenan Hydrogels with 5-Fluorouracil for Medical Application

Никитина М.Е., Агафонов М.А., Делягина Е.С., Кочкина Н.Е., Терехова И.В.

Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, г. Иваново, РФ, ivt@isc-ras.ru

В настоящее время гидрогели на основе биополимеров становятся все более популярными и востребованными в медицинских технологиях, поскольку обладают биосовместимостью, низкой токсичностью, возможностью управляемого и пролонгированного высвобождения фармакологически активного ингредиента. Разработка научных основ получения и управления свойствами гидрогелей медицинского назначения является актуальной задачей, решение которой позволит получить новые эффективные и безопасные лекарственные материалы.

В данной работе рассматривается получение гидрогелей на основе каррагинанов и 5-фторурацила. Как известно, 5-фторурацил используется в лечении различных видов онкологических заболеваний. Альтернативой наиболее распространенным лекарственным формам перорального и парентерального введения могут быть формы, предназначенные для наружного использования, к числу которых относятся гели и мази. Матрицей для создания гелей могут служить каррагинаны – сульфатированные гетерополисахариды, получаемые из красных морских водорослей и обладающие способностью к гелеобразованию. В семействе каррагинанов наилучшими гелеобразующими свойствами обладают йота- и каппа-каррагинаны, имеющие в своем строении, соответственно, две и одну сульфатные группы. Было исследовано влияние 5-фторурацила на структурно-механические свойства гелей каррагинанов. На основе полученных экспериментальных данных проведен сравнительный анализ реологических характеристик гелей йота- и каппа-каррагинанов с содержанием 5-фторурацила. Результаты работы обсуждаются с точки зрения особенностей возможных взаимодействий 5-фторурацила с йота- и каппа-каррагинанами.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №22-23-00891. Авторы выражают благодарность ЦКП ИНХС РАН и лично чл.-корр. Куличихину В.Г. и к.х.н. Ариной М.П. за помощь в проведении реологических исследований.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СПОСОБНОСТИ АПОВ-СОДЕРЖАЩИХ ЛИПОПРОТЕИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Determination of the Antioxidant Capacity of ApoB-containing Serum Lipoproteins

Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Осипов А.Н.

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, г. Москва, РФ, teselkin-box@mail.ru

Методы определения антиоксидантной способности (АОС) сыворотки/плазмы крови широко внедряются в практику клинических исследований. Большой популярностью пользуется хемилюминесцентный метод, основанный на взаимодействии антиоксидантов, входящих в состав сыворотки крови, с пероксильными радикалами, образующимися при термическом распаде 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида (АБАП) и индуцирующими окисление люминола [1]. Однако модельная система АБАП-люминол позволяет оценивать главным образом радикалперехватывающую активность водорастворимых низкомолекулярных антиоксидантов сыворотки крови. Между тем антиоксидантная защита липопротеинов низкой и очень низкой плотности (апоВ-содержащих липопротеинов), являющихся наиболее легко окисляемыми липопротеинами сыворотки крови, обеспечивается за счет жирорастворимых антиоксидантов.

Цель исследования – разработка метода определения АОС апоВ-содержащих липопротеинов (апоВ ЛП) сыворотки крови на основе предложенной нами ранее модифицированной системы АБАП-люминол [1].

В исследовании использовали сыворотку крови 20 практически здоровых добровольцев обоих полов в возрасте 19–40 лет. АпоВ ЛП выделяли методом осаждения из 0,4 мл сыворотки крови с использованием CaCl_2 и гепарина [2]. Полученную суспензию липопротеинов промывали 63 мМ раствором CaCl_2 , суспензировали в 0,4 мл физиологического раствора и хранили при 4°C в течение 5–6 ч. Содержание витамина Е в апоВ ЛП измеряли флуорометрическим методом.

Определение АОС апоВ ЛП проводили при температуре 37°C на 12-канальном хемилюминометре Lum-1200 (ООО «ДиСофт», Россия). Реакционная среда имела следующий состав: 50 мкМ люминола, 1 мМ ЭДТА, 0,1% (по объему) тритона X-100 в 50 мМ трис-НСl-буфере, содержащем 0,14 М NaCl, pH 8,0. Окисление люминола индуцировали добавлением АБАП в конечной концентрации 250 мкМ. АпоВ ЛП (10–40 мкл) добавляли в реакционную среду после выхода кинетики свечения системы АБАП-люминол на стационарный уровень.

Введение в систему АБАП-люминол апоВ ЛП сопровождалось появлением латентного периода хемилюминесценции, продолжительность которого была прямо пропорциональна количеству добавленных липопротеинов. Окончание латентного периода обусловлено инактивацией антиоксидантов липопротеинов и возобновлением процесса окисления люминола. В отсутствие детергента тритона X-100 латентного периода не наблюдали. Это свидетельствует о том, что для эффективного взаимодействия содержащихся в апоВ ЛП жирорастворимых антиоксидантов с пероксильными радикалами липопротеины необходимо солюбилизовать. Для подтверждения влияния жирорастворимых радикальных ингибиторов на хемилюминесценцию системы АБАП-люминол в нее были добавлены α -токоферол и бутилгидрокситолуол, а также тролокс – водорастворимый структурный аналог витамина Е. Указанные радикальные ингибиторы вызывали появление латентного периода хемилюминесценции, который увеличивался прямо пропорционально концентрации добавленного антиоксиданта. При этом для проявления активности жирорастворимых антиоксидантов так же, как и в случае липопротеинов, требовалось присутствие в системе детергента. АОС бутилгидрокситолуола была больше АОС α -токоферол и тролокса соответственно в 2,1 и 3,6 раза.

Известно, что витамин Е является основным антиоксидантом липопротеинов сыворотки крови человека [3]. Нами исследована взаимосвязь между АОС апоВ ЛП, представленной в виде тролокс-эквивалента (нмоль/мг белка) [1], и содержанием в них витамина Е (нмоль/мг белка). Установлено, что между этими показателями существует сильная взаимосвязь с коэффициентом корреляции $+0,920$ ($p < 0,001$).

Разработанный на основе системы АБАП-люминол метод определения АОС апоВ ЛП сыворотки крови может использоваться для оценки радикалперехватывающей активности жирорастворимых антиоксидантов при проведении исследований, направленных на изучение молекулярных механизмов развития оксидативного стресса и его роли в патогенезе заболеваний.

1. Teselkin Yu.O., Babenkova I.V., Osipov A.N. A modified chemiluminescent method for determination of the antioxidant capacity of biological fluids and tissues // *Biophysics*, 2019, vol. 64, no. 5, pp. 708-716, doi: 10.1134/S0006350919050233.

2. Srinivasan S.R., Webber L.S., Whitaker C.F., Berenson G.S. Quantification of lipoprotein cholesterol in serum from children with different lipoprotein profiles: heparin-calcium precipitation and ultracentrifugation compared // *Clinical Chemistry*, 1983, vol. 29, no. 3, pp. 481-485.

3. Hirowatari Y., Yoshida H., Kurosawa H., Manita D., Tada N. Automated measurement method for the determination of vitamin E in plasma lipoprotein classes // *Scientific Reports*, 2014, vol. 4, p. 4086, doi: 10.1038/srep04086.

РАДИКАЛПЕРЕХВАТЫВАЮЩИЕ И ЖЕЛЕЗОХЕЛАТИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА КОФЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Radical Scavenging and Iron Binding Properties of Caffeic Acid

Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любичкий О.Б., Осипов А.Н.

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, г. Москва, РФ,
teselkin-box@mail.ru

Известно, что оксидативный стресс является важным патогенетическим фактором многих заболеваний человека: сердечно-сосудистых, бронхолегочных, онкологических, нейродегенеративных и других [1]. Ключевую роль в развитии оксидативного стресса играют усиление продукции свободных радикалов и ослабление антиоксидантных механизмов защиты клеток. В связи с этим актуальной задачей является разработка новых лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище, обладающих антиоксидантными свойствами. В качестве перспективных антиоксидантов рассматриваются вещества природного происхождения. К числу таких веществ относится кофеиновая кислота (КК), которая входит в состав многих растительных экстрактов [2]. Полагают, что механизм антиоксидантного действия КК заключается в способности перехватывать свободные радикалы и связывать ионы металлов переменной валентности, в частности ионы Fe^{2+} . Однако отдельные стороны этого механизма нуждаются в дальнейшем исследовании.

Цель работы – изучение антиоксидантных свойств КК.

Антиоксидантные свойства КК изучали: (а) по восстановлению катион-радикалов диаммониевой соли 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (АБТС⁺), которое оценивали спектрофотометрическим методом, измеряя оптическую плотность раствора при 734 нм [3]; (б) по торможению окисления люминола, индуцированного 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлоридом (система АБАП-люминол), которое регистрировали методом хемилюминесценции [4]; (в) по торможению процесса пероксидного окисления липосомальных фосфолипидов, которое также регистрировали методом хемилюминесценции; (г) по связыванию ионов Fe^{2+} , которое изучали, измеряя спектры поглощения исследуемых растворов в УФ- и видимой области спектра.

Обнаружено, что КК (2,5–15 мкМ) дозозависимым образом восстанавливала АБТС⁺, что проявлялось в уменьшении оптической плотности раствора при 734 нм. При добавлении КК (0,025–0,25 мкМ) в систему АБАП-люминол наблюдалось появление латентного периода хемилюминесценции. Наблюдаемый латентный период увеличивался прямо пропорционально концентрации КК, что обусловлено взаимодействием КК с пероксильными радикалами, образующимися при термогидролизе АБАП. Антиоксидантная способность КК в системе с АБТС⁺ не отличалась от антиоксидантной способности тролокса, который использовали в качестве стандартного антиоксиданта, и в 3,6 раза превышала значение этого показателя у тролокса в системе АБАП-люминол. При добавлении КК (0,5–8 мкМ) к суспензии липосом наблюдалось уменьшение времени достижения амплитуды хемилюминесценции и понижение ее интенсивности, что свидетельствует соответственно о железохелатирующей и радикалперехватывающей активности исследуемого вещества.

Добавление ионов Fe²⁺ к раствору КК (в 50 мМ трис-НСl-буфере, рН 7,0) приводило к изменению спектров поглощения. В УФ-части спектра происходил сдвиг полосы поглощения с максимумом 325 нм в более длинноволновую область спектра (344 нм). В видимой части спектра появлялась полоса поглощения с максимумом в области 600 нм. Установлено, что наблюдаемые изменения спектров поглощения КК обусловлены образованием комплекса с ионами Fe²⁺. Для определения параметров связывания ионов Fe²⁺ с КК были выполнены прямое и обратное титрование. Изменение оптической плотности раствора регистрировали при длине волны 600 нм. Полученные результаты обрабатывали с помощью методов Клотца и Скэтчарда. Значение константы связывания ионов Fe²⁺ с КК составило $(1,29 \pm 0,05) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, стехиометрический состав комплекса – 2:1, т.е. в образовании комплекса участвуют две молекулы КК и один ион Fe²⁺.

Таким образом, КК обладает способностью перехватывать свободные радикалы и связывать ионы Fe²⁺, что, по-видимому, определяет антиоксидантные эффекты многих растительных экстрактов, наблюдаемые *in vitro* и *in vivo*.

1. Hajam Y.A., Rani R., Ganie S.Y. et al. Oxidative stress in human pathology and aging: Molecular mechanisms and perspectives // *Cells*, 2022, vol. 11, no. 1, p. 552, doi: 10.3390/cells11030552.

2. Khan F.A., Maalik A., Murtaza G. Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid // *Journal of Food and Drug Analysis*, 2016, vol. 24, no. 4, pp. 695-702, doi: 10.1016/j.jfda.2016.05.003.

3. Teselkin Yu.O., Babenkova I.V., Osipov A.N. A modified chemiluminescent method for determination of the antioxidant capacity of biological fluids and tissues // *Biophysics*, 2019, vol. 64, no. 5, pp. 708-716, doi: 10.1134/S0006350919050233.

4. Teselkin Yu.O., Babenkova I.V., Pavlova L.A., Lee A., Kochetova A.A., Osipov A.N., Vladimirov Yu.A. The antioxidant capacity of aqueous extracts from yerba mate (*Plex paraguayensis*) // *Biophysics*, 2021, vol. 66, no. 1, pp. 125-132, doi: 10.1134/S0006350921010176.

ИЗМЕНЕНИЯ СЕКРЕТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПРИ СДВИГЕ БАЛАНСА ДЕЙТЕРИЯ И ПРОТИЯ В ОРГАНИЗМЕ

Changes in Thyroid Gland Secretion Produced Shift in the Balance of Deuterium and Protium in the Body

Тимохина Е.П., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В.

Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского», г. Москва, РФ, rodich_k@mail.ru

Основное действие, оказываемое водой с модифицированным изотопным составом со сниженным содержанием дейтерия на организм – это постепенное снижение содержания дейтерия в жидких средах и тканях за счёт реакций изотопного обмена [1]. В научной литературе имеются единичные публикации по влиянию изменения концентрации дейтерия во внутренней среде организма на функции эндокринной системы и контролируемые ими метаболические процессы [2, 3]. При этом исследование функциональной активности щитовидной железы в условиях снижения концентрации дейтерия во внутренней среде организма ранее не проводилось. Целью работы было изучение морфологических и функциональных изменений щитовидной железы самцов крыс после двухнедельного понижения содержания дейтерия во внутренней среде организма. Крысы опытной группы потребляли в течение 2 недель воду с содержанием дейтерия в 15 раз меньше, чем в водопроводной воде. Контрольная группа потребляла водопроводную воду.

Проведенное исследование показало, что снижение содержания дейтерия во внутренней среде организма крыс через 2 недели приводило к морфологическим и функциональным изменениям щитовидной железы крыс. Отмечались признаки снижения синтеза тироглобулина, то есть значительного снижения функциональной активности щитовидной железы, подтвержденные значительным снижением уровня тиреоидных гормонов в крови. Также отмечалось усиление процессов резорбции тироглобулина. Концентрация гормона ТТГ в крови также была статистически значимо ниже, чем в контрольной группе.

Ранее проведенное нами исследование показало, что кратковременное потребление воды с пониженным содержанием дейтерия (1 сутки) приводит к стимуляции функциональной активности щитовидной железы [4]. При этом настоящее исследование показывает, что более длительный период потребления воды с пониженным

содержанием дейтерия, приводящий к более значительному снижению дейтерия во внутренней среде организма, подавляет секреторные процессы и приводит к морфологическим изменениям в паренхиме щитовидной железы, а также к функциональным нарушениям гипоталамо-гипофизарной системы. Отмеченное нарушение синтеза тиреоидных гормонов происходило вследствие недостаточности стимулирующего действия тиреотропного гормона.

Таким образом, выраженное снижение дейтерия во внутренней среде организма приводит к структурным перестройкам в щитовидной железе и ее секреторной активности. Значительно сниженный уровень ТТГ указывает на развитие гипоталамо-гипофизарного гипотиреоза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00236 А.

1. Джимаков С.С., Басов А.А., Федулова Л.В., Дыдыкин А.С., Быков И.М., Лясота О.М., Наумов Г.Н., Барышев М.Г. Коррекция метаболических процессов у крыс при хроническом эндотоксикозе с помощью реакций изотопного (D/H) обмена // Известия Российской академии наук. Серия биологическая, 2015, № 5, с. 518-527, doi: 10.7868/S0002332915050069.

2. Somlyai G., Somlyai I., Fórizs I., Czuppon G., Papp A., Molnár M. Effect of Systemic Subnormal Deuterium Level on Metabolic Syndrome Related and other Blood Parameters in Humans: A Preliminary Study // *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 6, p. 1376, doi: 10.3390/molecules25061376.

3. Halenova T., Zlatskiy I., Syroeshkin A., Maximova T., Pleteneva T. Deuterium-depleted water as adjuvant therapeutic agent for treatment of diet-induced obesity in rats // *Molecules*, 2019, vol. 25, no. 1, p. 23, doi: 10.3390/molecules25010023.

4. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Реакция гипофизарно-тиреоидной оси на кратковременное изменение содержания дейтерия в организме // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2021, т. 171, № 2, с. 232-234, doi: 10.47056/0365-9615-2021-171-2-232-234.

ОБРАЗОВАНИЕ КОРОТКОЖИВУЩИХ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ГОМОГЕНАТЕ СЕРДЦА КРЫСЫ. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ЭПР EPR Study of Short-Life Oxygen Active Species Generation in Rat Heart Homogenate

Тимошин А.А.¹, Лакомкин В.Л.¹, Абрамов А.А.¹, Рууге Э.К.^{1,2}

¹ ФГБУ «НМИЦ кардиологии им. ак. Е.И.Чазова» Минздрава России, г. Москва, РФ

² Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, г. Москва, РФ, *timoshin_a_a@mail.ru*

Известно, что образование короткоживущих высокотоксичных активных форм кислорода (АФК) является одним из основных факторов, вызывающих существенные и необратимые повреждения органов и тканей. В данной работе на модели гомогената сердца крыс проводилось исследование скорости генерации этих токсичных соединений. При этом изучалось действие доксорубина (антибиотик антрациклинового ряда, используемый для лечения злокачественных новообразований), обладающего дозозависимым кардиотоксическим действием, способным стимулировать образование АФК в ткани, а также такого антиоксиданта направленного действия, как пластомитин (SkQ, ионы Скулачёва). Важной задачей является анализ действия этих препаратов на интегральную скорость образования АФК в миокарде.

Основной целью данной работы являлся анализ антиоксидантного действия пластомитина на модели гомогената сердца крыс в условиях окислительного стресса, инициированного введением животным доксорубина.

Для анализа скорости образования короткоживущих АФК применялись спиновые ловушки, в качестве которых использовался гидроксилламин СРН ((3S)-1-гидрокси-2,2,5,5-тетрамethyl пирролидин-3-карбоксилная кислота). При этом использовались животные, принадлежащие к трём экспериментальным группам – контрольные (1), получавшие доксорубин (2), а также после введения им совместно доксорубина и пластомитина (3). Регистрация спиновых аддуктов в образцах гомогената сердца крыс проводилась методом ЭПР, оценивались скорости их образования для всех экспериментальных групп животных.

Установлено, что диамагнитная ловушка СРН приобретала парамагнитные свойства в результате взаимодействия с короткоживущими АФК, образующимися в гомогенате ткани сердца. В результате этого часть молекул ловушки переходила в форму нитроксильных радикалов, обладающих характерным триплетным сигналом ЭПР. Образование спиновых аддуктов СРН в данных экспериментальных условиях было показано также на модельной системе, способной генерировать супероксидные анион-радикалы (ксантинооксидаза-ксантин). В результате анализа гомогената сердца крыс установлено, что в результате перехода от контрольной группы животных к крысам, получавшим доксорубин, скорость генерации АФК увеличивалась на 19%. При этом в случае совместного применения доксорубина и пластомитина эта скорость практически не отличалась от значений, полученных в контроле.

Таким образом, методом ЭПР с использованием в качестве спиновой ловушки гидроксилламина СРН показано, что в результате введения крысам доксорубина достоверно увеличивается скорость образования

короткоживущих АФК в гомогенате сердца крыс, а в случае совместного применения доксорубина и пластомитина этот эффект в значительной степени подавлялся.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ОКСИДА АЗОТА В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ Specific Functions of Nitric Oxide in Embryogenesis

Титов В.Ю.^{1,2,3}, Осипов А.Н.¹, Кочиш И.И.², Долгорукова А.М.³

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, г. Москва, РФ, vtitov43@yandex.ru

² Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина, г. Москва, РФ, kochish.i@mail.ru

³ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства, г. Сергиев Посад, РФ, anna.dolg@mail.ru

Эмбриогенез сопровождается интенсивным синтезом оксида азота (NO). Это показано рядом исследователей [1,2]. Но, в связи с низкой специфичностью используемых методик и невозможностью оперативного контроля состава метаболитов NO в тканях эмбриона, нет представления об особенностях его метаболизма в различных частях эмбриона. Нами разработан ферментный сенсор, основанный на обратимом ингибировании фермента каталазы нитритом и нитрозосоединениями и утрате ими способности ингибировать под действием ряда веществ, специфичных для каждой группы этих соединений. Он позволяет оперативно, без какой-либо подготовки объекта, определить концентрацию нитрозотиолов (RSNO), динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), высокомолекулярных нитросоединений, способных трансформироваться в ДНКЖ (RNO₂), а также нитрита (NO₂⁻), нетиолатных нитрозосоединений (RNO) и нитрата (NO₃⁻) с точностью до 50 нМ [2]. При помощи него установлены следующие закономерности:

Эмбриогенез птиц сопровождается интенсивным накоплением соединений – доноров NO сначала в амниотической жидкости, а затем в тканях зародыша. Блокаторы NO-синтазы предотвращают это накопление. Начиная с некоторого момента соединения — доноры NO трансформируются до нитрата. Интенсивность синтеза NO одинакова в эмбрионах птиц одного вида, но интенсивность трансформации до нитрата различна у разных пород и различается на два порядка. Интенсивное окисление характерно для быстрорастущих форм. Показано, что окисление происходит в мышечной ткани. Установлена корреляция между интенсивностью окисления NO в эмбрионе и экспрессией генов миогенной дифференциации 1 (myoD1), фактора миогенеза 5 (myf 5), и миогенина (myog) [2]. Механизм взаимосвязи пока неясен. Установлено только, что особенности тканей эмбриона определяют интенсивность трансформации до нитрата доноров NO, как эндогенных, так и экзогенно добавленных, а не спонтанная диссоциация этих соединений с выделением NO. В эмбрионах некоторых пород до 90% всего синтезированного NO окисляется до нитрата, в других окисление незначительно [2]. Так как показатель степени окисления эмбрионального NO наследуется, его можно использовать как высокочувствительный селекционный показатель. Играет ли NO аналогичную роль в эмбрионах млекопитающих и человека, пока не известно, так как их эмбрионы – открытые системы.

Кровь эмбрионов птиц, крупного рогатого скота содержит доноры NO в концентрации до нескольких миллимоль/л, в то время как кровь взрослых особей – 8-15 микромоль/л. Кровь из пуповины также содержит в 1,5-2 раза больше доноров NO, чем кровь матери [2]. Возможно, высокая концентрация доноров NO является защитным механизмом против гипоксии. Известно также, что NO и его доноры – эффективная ловушка активных форм кислорода и, в частности, супероксида [3]. В результате такого взаимодействия образуются нитрит и нетиолатные нитрозосоединения (NO₂⁻ + RNO), которые в норме присутствуют в крови в следовых количествах [3]. Активация фагоцитов сопровождается продукцией супероксида, вследствие чего в крови появляются (NO₂⁻ + RNO). При высокой концентрации депонированного NO, имеющей место в эмбриональной крови, большая часть супероксида перехватывается NO. По нашим данным практически все случаи преждевременного разрыва плодных оболочек (ПППО) сопровождаются повышением концентрации (NO₂⁻ + RNO) до нескольких микромоль/л при отсутствии каких-либо клинических симптомов и показаний биохимических тестов. Возможно, регистрация (NO₂⁻ + RNO) в крови матери — единственный способ оперативного контроля воспалительных процессов, происходящих в эмбрионе, поскольку другие показатели неинформативны [3].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 20-016-00204-а.

1. Tiwari M., Prasad S., Pandey A., Premkumar K., Tripathi A., Gupta A., Chetan D., Yadav P., Shrivastav T., Chaube S. Nitric oxide signaling during meiotic cell cycle regulation in mammalian oocytes // *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 2017, vol. 9, no. 3, pp. 307-318, doi: 10.2741/s489.

2. Titov V., Dolgorukova A., Fisinin V., Borkhunova Ye., Kondratov G., Slesarenko N., Kochish I. The role of nitric oxide (NO) in the body growth rate of birds // *World Poultry Science Journal*, 2018, vol.74, no. 4, pp. 675-686, doi: 10.1017/S0043933918000661.

3. Титов В.Ю., Осипов А.Н., Крейнина М.В., Ванин А.Ф. Особенности метаболизма оксида азота в норме и при воспалении // *Биофизика*, 2013, т. 58, № 5, с. 857-870.

ВЛИЯНИЕ НАГРЕВА НА КОЖНУЮ МИКРОГЕМОДИНИМИКУ И КИНЕТИКУ ГЕНЕРАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

The Effect of Heating on Skin Microhemodynamics and the Kinetics of Generation of Reactive Oxygen Species in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

Тихонова И.В., Гриневич А.А., Танканг А.В., Сафронова В.Г.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ПНЦБИ РАН, г. Пушкино, РФ,
irinka_ti27@mail.ru

Сахарный диабет 2 типа (СД2Т) характеризуется хроническим воспалением и сопровождается нарушениями микроциркуляции. Основной причиной возникновения микрососудистых патологий, приводящих к развитию диабетических осложнений, считается гипергликемия. Одним из механизмов гипергликемического поражения микрососудов является окислительный стресс, возникающий вследствие избыточной неконтролируемой продукции активных форм кислорода (АФК) в тканях. NADPH-оксидаза нейтрофилов является наиболее мощным источником АФК, играющих ключевую роль в воспалительных поражениях сосудов. У больных СД2Т часто наблюдается повышенная температура тела, что является сигналом развития осложнений. Однако, мало данных о влиянии повышенной температуры на параметры микроциркуляции и активность NADPH-оксидазы в нейтрофилах, хотя такие знания могут быть полезными для формирования представлений о терапевтических мишенях для предотвращения осложнений при СД2Т. Цель работы – исследовать влияние повышенной температуры на амплитудно-частотные характеристики колебаний кожного кровотока верхних и нижних конечностей и кинетику NADPH-оксидаза-зависимой генерации АФК нейтрофилами у больных СД2Т.

Были исследованы микроциркуляция кожи методом лазерной доплеровской флоуметрии и ЭКГ во II стандартном отведении у здоровых испытуемых (контроль) и больных СД2Т. Локальный нагрев проводили при помощи контролируемого нагревателя. Анализировали показатель микроциркуляции (ПМ), резерв капиллярного кровотока, параметры колебаний периферического кровотока и вариабельность сердечного ритма (ВСР). Генерацию АФК оценивали по интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ), вызванной опсонизированным зимозаном (ОЗ) в образцах крови, и кальциевым ионофором иономицином (0,01–0,5 мкМ) и/или 1 мкМ форболовым эфиром, прямым активатором протеинкиназы C, в изолированных нейтрофилах. Рассчитывали кинетические параметры ответов: лаг-период, скорость развития, амплитуду, продукцию АФК, время до максимума. Образцы крови и изолированных клеток инкубировали 30 мин при 37 или 40°C с последующей регистрацией базового уровня ХЛ и ответа на стимулы при соответствующей температуре. Состояние NADPH-оксидазы определяли по экспрессии фосфорилированных субъединиц фермента (p-p47phox и p-p67phox) в изолированных нейтрофилах методом иммуноблоттинга.

Показано отсутствие изменений ПМ на верхних конечностях и снижение резервных возможностей микроциркуляторного русла на локальный нагрев в нижних конечностях у больных относительно контроля. Выявлено снижение спектральных компонент ВСР в низкочастотной области в покое, а также в высоко- и низкочастотных областях при нагреве у больных, что свидетельствует о снижении симпатической и парасимпатической активности при СД2Т. Амплитуды колебаний кровотока на ноге в частотных диапазонах миогенной активности и кардиоритма при нагреве у больных были ниже, чем в контроле, что свидетельствует об изменении соответствующих систем регуляции кожного кровотока при СД2Т.

При 37°C интенсивность фагоцитоз-зависимой генерации АФК была выше в крови пациентов, чем в контроле, при регистрации в среде, содержащей 5,5 мМ D-глюкозы. Гипергликемия (22 мМ D-глюкоза) усиливала генерацию АФК в контроле таким образом, что параметры в контроле не отличались от показателей у пациентов (за исключением скорости и амплитуды ответа). При 40°C все кинетические параметры ответа на ОЗ снижались (в контроле и при СД2Т), что делало различия между группами менее выраженными. У пациентов кинетические параметры ответов изолированных клеток на 0,5 мкМ иономицин, были ниже при 40°C, чем при 37°C, а также относительно контроля при 40°C. Параметры ответа при совместном действии иономицина (0,01 и 0,1 мкМ) и форболового эфира были достоверно выше у больных по сравнению с контролем при 40°C, тогда как при 37°C наблюдалось обратное соотношение. Данные иммуноблоттинга показали, что в интактных клетках здоровых добровольцев и пациентов уровень p-p67phox не различался при 37°C и 40°C. У пациентов уровень p-p67phox в клетках, обработанных форболовым эфиром, был выше при 40°C, чем при 37°C. Уровень p-p47phox при 37°C был выше в интактных нейтрофилах пациентов, чем здоровых, что свидетельствует о праймированном состоянии нейтрофилов при СД2Т. Стимулы увеличивали уровень p-p47phox в клетках здоровых и не изменяли его в клетках пациентов относительно интактных клеток при 37°C. Уровень p-p47phox был выше при 40°C, чем при 37°C в интактных клетках здоровых, и не изменялся в интактных клетках пациентов. При 40°C уровень p-p47phox не изменялся относительно уровня в интактных клетках при стимуляции клеток здоровых персон и пациентов. Таким образом, температурный тест выявил нарушения регуляции кожной микрогемодинамики в нижних конечностях и избыточную генерацию АФК у больных СД2Т, что может быть обусловлено повышенным уровнем фосфорилирования p-p47phox, активационной субъединицы NADPH-оксидазы, ключевого элемента ее сборки и регуляции активности.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант №22-15-00215).

АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИНФОРМАЦИОННЫХ ПРИЛОЖЕНИЙ В БИОФИЗИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

Aspects of the Application of Information Applications in Biophysical Medicine

Ткаченко А.Л.

Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского, г. Калуга, РФ, tkachenkoal@tksu.ru

Медицинская биофизика совершенно особенный раздел медицины, изучающий физические процессы, происходящие в организме человека, его строение и функцию в норме и патологии, методы диагностики патологических состояний. На протяжении всего развития этой науки она была теснейшим образом связана с новейшими IT разработками. Различные программные средства ежедневно используются как для обучения новых специалистов, так и для работы уже состоявшихся ученых. В процессе обучения происходит всестороннее изучение человеческого организма на различных уровнях. За столетия изучения человеческого тела накопилось огромное количество информации, ни один ученый не смог бы освоить такой объем данных даже за всю жизнь, если бы все знания не были бы систематизированы и не представлены в удобной форме. Большую роль в выполнении задачи такой обработки информации играют различные информационные технологии, специальные приложения для наглядного изучения человека.

В научной статье содержатся результаты анализа применения информационных технологий в биофизической медицине, приводятся примеры информационных приложений, используемых при работе медицинскими и научными работниками. Представлены результаты анализа информационных приложений для изучения анатомии, генетических алгоритмов, секвенирования ДНК, визуализации работы ассемблеров для алгоритмической биологии, изучения проблемы биопротезирования. Научная новизна и теоретическая значимость научного исследования обусловлены проведенным анализом прикладного использования информационных приложений в биофизической медицине. В работе обозначены проблемы изучения человеческого организма на различных уровнях, алгоритмы для исходного положения геномов, хранения генетических данных, визуализации работы ассемблеров для алгоритмической биологии. Практическая значимость результатов исследования заключается в возможности их использования в прикладных задачах биофизической медицины.

На протяжении всего развития биофизической медицины она была теснейшим образом связана с новейшими IT разработками. Различные программные средства ежедневно используются как для обучения новых специалистов, так и для работы уже состоявшихся ученых [1]. В процессе обучения происходит всестороннее изучение человеческого организма на различных уровнях. За столетия изучения человеческого тела накопилось огромное количество информации, ни один ученый не смог бы освоить такой объем данных даже за всю жизнь, если бы все знания не были бы систематизированы и не представлены в удобной форме.

Но не стоит забывать о второй, но не по значению, важной части - генетике. Эта наука занимается всесторонним изучением геномов различных организмов от вирусов до человека. ДНК существ нашей планеты в пересчете на компьютерное исчисление объемов информации составляет миллионы терабайт данных. Еще в 2015 году в одном из академических изданий было предсказано, что к 2025 году суммарный объем геномной информации в несколько раз превысит объем данных, который будет накоплен в астрономии и в социальных сетях. В настоящее время становится понятным, что темпы накопления генетической информации превысили все ожидания. К примеру, объем хранилища генетических данных одного только Broad Institute (США) превышает объем хранилища Facebook.

Однако проводить анализ этой библиотеки вручную даже с материалами, полученными от одного человека, проблематично. С этим помогают информационные технологии, а именно новые алгоритмы для определения исходного положения генов. Немаловажно и то, что современным катализатором в развитии технологий обработки больших данных являются методы и технологии искусственного интеллекта [2]. В современных условиях извлечь из данных полезную информацию традиционными методами достаточно сложно. Потому методы и технологии искусственного интеллекта приобретают теперь стратегическое значение для обработки генетических данных и их приложений. И наконец составление генетических алгоритмов, которые симулируют процесс эволюции, позволяет формировать следующие поколения на основе скрещивания и мутаций. Все то совершенно невозможно реализовать без использования инновационных технологий.

Подводя итог всему вышесказанному, хочется отметить, что развитие биотехнологий во многом взаимосвязано с развитием информационных технологий. Без различных программ, разработанных специально для генетиков, биологов, работа в целом невозможна. Это связано с тем, что возможности человеческого ума сильно ограничены, тогда как, если смотреть на темпы развития искусственного интеллекта, различных способов программирования, возникает ощущение, что возможности «механического ума» безграничны.

1. Нефедов Е.И., Протопопов А.А., Хадарцев А.А., Яшин А.А. Биофизика полей и излучений и биоинформатика. Тула: Тульский государственный университет, 1998, 333 с.

2. Ткаченко А.Л., Лыкова О.М., Шаронов Е.И., Кузнецова В.И. Имитационное моделирование демографических показателей роста и убыли населения // Modern Economy Success, 2021, № 3, с. 110-116.

АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ МИКРОСОМАЛЬНЫХ РЕДУКТАЗ ТКАНИ ЯИЧНИКОВ ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ МЕТОДОМ АКТИВИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ
Analysis of the Activity of Microsomal Reductases in Ovarian Tissue after Cryopreservation with Enhanced Chemiluminescence

Проскурнина Е.В.¹, Созарукова М.М.², Федорова М.В.³, Киселева М.В.⁴

¹Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, г. Москва, РФ, *proskurnina@gmail.com*

²Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова РАН, г. Москва, РФ, *s_madinam@bk.ru*

³Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, РФ, *theklazontag@yandex.ru*

⁴МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал НМИЦ радиологии МЗ РФ, Москва, *oxiscience@mail.ru*

За последние десятилетия методы диагностики и лечения рака значительно улучшились, но химиотерапия и лучевая терапия оказывают цитотоксическое воздействие на репродуктивную систему. Криоконсервация и аутотрансплантация ткани яичников представляют собой наиболее эффективный вариант сохранения фертильности у детей, подростков и пациенток, которые не могут отложить противораковое лечение. В результате процессов криоконсервации–оттаивания тканей яичников происходит изменение клеточного метаболизма, повреждение митохондрий дыхательных цепей эндоплазматического ретикулума – цепей цитохрома b5 и цитохрома P450.

Цель исследования – изучить активность NADH-зависимой цитохром b5-редуктазы (CYB5R) и NADPH-зависимой цитохром P450-редуктазы (CYPOR) в тканях яичника после криоконсервации методом люцигенин-активированной хемилюминесценции со стимулами NADH и NADPH, соответственно.

Образцы ткани яичников пациенток, получавших противоопухолевую терапию, были предоставлены биобанком МРНЦ им. А.Ф. Цыба филиалом ФГБУ «НМИЦ» МЗ России, г. Обнинск. В исследование включали 17 женщин в возрасте от 28 до 45 лет со злокачественными новообразованиями, за исключением рака яичника, и доброкачественными новообразованиями, сопоставимых по возрасту ($n = 20$, группа контроля). В исследуемой группе образцы анализировали после криоконсервации, в группе контроля образцы ткани анализировали без криоконсервации.

Размер образца ткани составлял 15 ± 1 мг. Для оценки активности микросомальных редуктаз измеряли амплитуду люцигенин-активированной хемилюминесценции со стимулом NADH, пропорциональную активности CYB5R, и со стимулом NADPH, пропорциональную активности CYPOR [1, 2]. Во время измерения базальной хемилюминесценции также включали азрацию пробы кислородной газовой смесью (75% N₂, 20% O₂, 5% CO₂). Амплитуда люцигенин-активированной хемилюминесценции без стимула при условии продувания пробы кислородной газовой смесью отражает продукцию супероксидного анион-радикала митохондриями.

Результаты свидетельствуют о том, что в криоконсервированных тканях яичников сохраняется как активность митохондрий, так и микросомальных редуктаз. После криоконсервации уровень выработки митохондриями супероксидного анион-радикала снижается в 3–10 раз, при этом наличие или отсутствие химиотерапии влияния не оказывает, также, как и тяжесть заболевания. По сравнению с группой контроля, активность CYB5R и CYPOR ткани яичников при злокачественном онкологическом процессе уменьшается в 1,5–10 раз в зависимости от тяжести заболевания, и наличие химиотерапии резко влияет на эти показатели – при химиотерапии активность микросомальных редуктаз снижается в 50–100 раз по сравнению с группой контроля.

Таким образом, активность микросомальных редуктаз является более информативным параметром для оценки функциональности криоконсервированной ткани яичников, чем супероксид-продуцирующая способность митохондрий, поскольку, во-первых, зависит от стадии заболевания и предшествующей химиотерапии, и во-вторых, аналитический сигнал NADH/NADPH стимулированной хемилюминесценции характеризуется примерно в 30 раз более высокой интенсивностью, чем митохондриальная хемилюминесценция, что обуславливает более высокую аналитическую чувствительность методики.

1. Baker M.A., Krutskikh A., Curry B.J., McLaughlin E.A., Aitken R.J. Identification of cytochrome P450-reductase as the enzyme responsible for NADPH-dependent lucigenin and tetrazolium salt reduction in rat epididymal sperm preparations // *Biology of Reproduction*, 2004. vol. 71, no. 1, pp. 307-318.

2. Baker M.A., Krutskikh A., Curry B.J., Hetherington L., Aitken R.J. Identification of cytochrome-b5 reductase as the enzyme responsible for NADH-dependent lucigenin chemiluminescence in human spermatozoa // *Biology of Reproduction*, 2005, vol. 73, no. 2, pp. 334-342.

ВЛИЯНИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА УДЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СВОБОДНЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПУТЕМ АДСОРБЦИИ И ВКЛЮЧЕНИЯ В ГЕЛИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Influence of UV Radiation on the Specific Activity of Proteolytic Enzymes Free and Immobilized by Adsorption and Inclusion into Gels

Холявка М.Г.^{1,2}, Панкова С.М.^{1,3}, Ольшанникова С.С.¹, Королева В.А.^{1,3}, Артюхов В.Г.¹

¹ Воронежский государственный университет, г. Воронеж, РФ

² Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ, holyavka@rambler.ru

³ Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, г. Воронеж, РФ

В медицине и фармакологии в настоящее время популярны препараты, включающие в свой состав ферменты, которые являются безопасными для пациентов. На сегодняшний день широкое распространение получили лекарственные средства из цистеиновых протеаз: папаина, бромелина, фицина, которые применяются в клинической практике в виде лекарств местного и системного использования. Протеазы интересны для фармакологии своими свойствами – оказывают выраженное противовоспалительное и противоотечное, а также регенерирующее действие, избирательно деградируют некротизированные ткани, разжижают сгустки крови, снижают резистентность гнойной микрофлоры к антибиотикам, тем самым ускоряя процесс заживления гнойных ран. Ферменты в растворе могут терять свою стабильность, поэтому для её повышения широко применяются методы их иммобилизации на различных полимерных носителях, что позволяет исследовать физико-химические характеристики биокатализаторов в различных условиях проведения реакции, например, после УФ-облучения, без значительной потери активности энзимов.

В современной медицине и фармакологии находят применение комплексные подходы к лечению гнойно-некротических процессов в коже, например, энзимная терапия в сочетании с УФ-облучением. Действие УФ-излучения на кожные покровы складывается из гуморального и нервно-рефлекторного влияния на обменные процессы. В связи с этим целью работы было исследовать динамику изменения удельной активности молекул свободных и иммобилизованных на матрицах хитозана протеолитических ферментов (фицина, папаина, бромелина) после УФ-облучения в диапазоне доз 151-6040 Дж/м².

В качестве объектов исследования были выбраны фицин, папаин, бромелин фирмы «Sigma-Aldrich», субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Sigma-Aldrich», носителями для иммобилизации – четыре вида хитозана, синтезированных ЗАО «Биопрогресс»: хитозан кислоторастворимый среднемолекулярный (M_r = 200 кДа), хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный (M_r = 350 кДа), пищевой хитозан (M_r <100 кДа) и сукцинат хитозана. Иммобилизацию протеаз осуществляли адсорбционным методом [1]. Определение количества белка в препаратах и их активности проводили модифицированным методом Лоури [1]. УФ-облучение растворов свободных и иммобилизованных протеаз осуществляли с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240–390 нм. Дозы облучения составляли: 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м². [2]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением *t*-критерия Стьюдента при *p* < 0.05.

В результате проведенного исследования было выявлено, что каталитическая активность молекул свободных ферментов под воздействием УФ-света подвержена изменению в большей степени, чем в иммобилизованном состоянии. Частичная инактивация свободных протеаз происходит при использовании доз 1510 и 3020 Дж/м². При действии УФ-излучения на иммобилизованные препараты ферментов снижение активности зарегистрировано при использовании доз облучения 4530 и 6040 Дж/м². Следовательно, иммобилизация на матрице хитозана и сукцината хитозана приводит к повышению стабильности гетерогенных биокатализаторов по отношению к действию УФ-света по сравнению со свободными энзимами. Фотопротекторный эффект названных полисахаридов может быть обусловлен следующими причинами: молекулы ферментов при взаимодействии с матрицей полимера образуют фоторезистентные комплексы; молекулы хитозана и сукцината хитозана экранируют активные фотопродукты свободнорадикальной природы, предотвращая фотоокисление определенного числа аминокислот изученных ферментов при воздействии УФ-облучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 21-74-20053.

1. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С. Разработка методики получения гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана // *Фундамент. исслед.*, 2013, т. 11, часть 3, с. 484-487.

2. Holyavka M., Pankova S., Koroleva V., Vyshkvorkina Y., Lukin A., Kondratyev M., Artyukhov V. Influence of UV radiation on molecular structure and catalytic activity of free and immobilized bromelain, ficin and papain // *J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2019, vol. 201, p. 111681.

**УСИЛИНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ИЗМЕНЕНИЕ В УРОВНЕ ЭКСПРЕССИИ
ГЕННОВ BCL И BAX У ДЕТЕЙ С ТЯЖЕЛОЙ ФОРМОЙ РАС**
**Increased Oxidative Stress and Changes in the Level of Expression of the BCL and BAX Genes in Children with
Severe ASD**

Чудакова Ю.М.¹, Шмарина Г.В.^{1,2,4}, Ершова Е.С.^{1,2}, Никитина С.Г.³, Костюк С.В.^{1,2}

¹ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, г. Москва, РФ

² Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), г. Москва, РФ

³ Научный центр психического здоровья, г. Москва, РФ

⁴ Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, г. Москва, РФ, julia.chudakova@yandex.ru

Расстройства аутистического спектра (РАС) – гетерогенная группа психиатрических заболеваний, самых часто встречающихся у детей. Пациенты с РАС характеризуются дефицитом когнитивных, поведенческих, коммуникативных сфер и навязчивым стереотипным поведением. На данный момент этиология и патогенез РАС одна из важнейших проблем детской психиатрии [1]. Для пациентов с РАС характерно усиление окислительного стресса [2].

Целью данного исследования было охарактеризовать роль окислительного стресса у пациентов с РАС в усилении уровня апоптоза.

Клиническую группу составили 133 ребенка с РАС (DSM-5) 4-12 лет, наблюдавшиеся ФГБНУ НЦПЗ. Дети с РАС были разделены на две подгруппы по тяжести течения заболевания, согласно баллам CARS. В контрольную группу вошли 27 здоровых детей. Из цельной крови выделяли лимфоциты центрифугированием в градиенте фиколла-урографина. Уровень экспрессии генов в лимфоцитах периферической крови пациентов с РАС и здоровых контролей оценивали по количественному определению уровня мРНК методом ПЦР в реальном времени и по уровню содержания белка в клетках, проточной цитофлуориметрией. Уровень АФК внутри лимфоцитов оценивали по уровню окисленного до DCF реагента H2DCFH с помощью проточной цитофлуориметрии.

В лимфоцитах детей из подгруппы с легкой и средней формой РАС уровень АФК был повышен, но уровень значимости не был достигнут, при этом в лимфоцитах детей с тяжелым течением РАС уровень АФК был в 2,2-2,5 раз выше, чем у детей контрольной группы ($p < 0,01$). Уровень экспрессии антиапоптотического гена *BCL2* в лимфоцитах детей с тяжелой формой РАС был понижен в 2-2,5 раза ($p < 0,01$), а уровень экспрессии проапоптотического гена *BAX* был в 1,8-2,3 ($p < 0,01$) раза выше по сравнению с контролем. Это может свидетельствовать об усилении у пациентов с тяжелым течением РАС окислительного стресса и апоптоза.

1. Симашкова Н., Ключник Т., Якупова Л. Клинико-биологические подходы к диагностике и обоснованию персонализированной терапии у пациентов с расстройствами аутистического спектра // Психиатрия, 2018, т. 2, с. 17-24.

2. Hallmayer J., Cleveland S., Torres A. et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism // Arch Gen Psychiatry, 2011, vol. 68, no. 11, pp. 1095-1102, doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.76.

**ОСОБЕННОСТИ СВОЙСТВ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛЫМ
ТЕЧЕНИЕМ COVID-19**

Features of Erythrocyte Membrane Properties in Patients with Severe COVID-19

Шафорост А.С., Воропаев Е.В.

Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, РБ, asofocl@mail.ru

Известно, что при COVID-19 наблюдаются изменения в метаболических процессах, которые протекают в эритроцитах [1]. Научный интерес представляет изучение изменения физико-механических свойств мембраны эритроцитов у пациентов с тяжелым течением заболевания, как вероятный маркер для общей оценки состояния пациента.

В качестве объекта исследования использовали мазки крови пациентов из отделений реанимации учреждений здравоохранения Гомельской области, контроль – здоровые люди, без перенесенной COVID-инфекции, без хронических заболеваний и невакцинированные. Химическая фиксация осуществлялась с помощью 1% раствора глутарового альдегида в (20 мин, $1 \times$ PBS, pH=7,4). Исследование морфологии и механических свойств клеток выполняли на атомно-силовом микроскопе NT-206 (ОДО «Микротестмашины», г. Гомель) в контактном режиме на воздухе с использованием зонда CSC-38 (зонд В, MicroMash, Эстония).

Анализ АСМ-изображений выполняли с помощью программы SurfaceXplorer 1.3.1.1. Обработку результатов проводили с помощью MS Excel 2010. Результаты представлены в виде $X_{cp} \pm \Delta X$.

Величина шероховатости (R_q) мембраны эритроцитов пациентов с тяжелым течением COVID-19 полученная при анализе АСМ-изображений в режиме «топография» в среднем составляет $264,3 \pm 30,7$ нм. При сравнении величины R_q для различных областей мембраны показано, что центральные области имеют менее шероховатую поверхность. У здоровых пациентов значение шероховатости мембраны выше, чем у пациентов с тяжелым течением COVID-19 и составляет $355,9 \pm 24,5$ нм.

Анализ АСМ-изображений в режиме «карта латеральных сил» позволяет получить данные о механических свойствах мембраны, в частности о структуре подмембранного кортикального слоя цитоскелета клетки. В изучаемых образцах величина силы трения (F_l) колеблется в пределах $3122,24 \pm 461,77$ усл. ед., что существенно выше, чем у здоровых людей ($1694,8 \pm 291,2$), и сравнима с таковой у пациентов с инфекциями дыхательных путей [2]. Показатель шероховатости поверхности (R_q) для исследованных эритроцитов равен $2409,24 \pm 393,87$ усл. ед., что также выше, чем у здоровых пациентов ($1718,19 \pm 345,8$ усл. ед.). Следует отметить, что для эритроцитов одного из здоровых пациентов характерны еще более низкие значения величины силы трения ($923,9 \pm 129,1$ усл. ед.) и шероховатости поверхности ($982,8 \pm 175,9$ усл. ед.). Наличие подобных результатов требует дополнительного исследования причин подобного снижения исследуемых параметров и распространённости данного явления в популяции.

Помимо этого, были определены концентрации С-реактивного белка, интерлейкина-6 и прокальцитонина в сыворотке крови пациентов с тяжелым течением COVID-19. Среди обследованных пациентов наблюдалось разнообразие значений вышеперечисленных показателей, которое соответствовало тяжести течения заболевания. При сравнении полученных значений с данным обработки АСМ-изображений были выявлена сильная положительная связь между показателем силы трения (F_l) и концентрацией интерлейкина-6 ($R=0,76$), прокальцитонина ($R=0,77$) и связь средней силы с содержанием С-реактивного белка ($R=0,54$).

Полученные результаты свидетельствуют, что при повышении тяжести течения COVID-19 наблюдаются значимые изменения в архитектонике клеточной мембраны, которые проявляются в изменении структуры кортикального слоя и формировании более развитой поверхности клеток, что позволяет рассматривать подобные трансформации, как перспективный маркер тяжести течения COVID-19.

1. Mendonça M.M., da Cruz K.R., Pinheiro D. da S., Moraes G.C.A., Ferreira P.M., Ferreira-Neto M.L., da Silva E.S., Gonçalves R.V., Pedrino G.R., Fajemiroye J.O., Xavier C.H. Dysregulation in Erythrocyte Dynamics Caused by SARS-CoV-2 Infection: Possible Role in Shuffling the Homeostatic Puzzle during COVID-19 // *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2022, vol. 44, no. 2, pp. 235-245, doi: 10.1016/j.htct.2022.01.005.

2. Стародубцева М.Н., Воропаев Е.В., Петренёв Д.Р., Мицура В.М., Егоренков Н.И. АСМ-диагностика патологии эритроцитов на основе физико-механического образа клеточной поверхности // *Проблемы здоровья и экологии*, 2015, № 2 (44), с. 99-104.

ОСОБЕННОСТИ БЕЛОК-ИНДУЦИРОВАННЫХ АССОЦИАТОВ ПРИ СВЕРХВЫСОКОМ РАЗВЕДЕНИИ АНТИТЕЛ К ИНТЕРФЕРОНУ- γ

Peculiarities of Protein-Induced Associates at Ultra-High Dilution of Antibodies to Interferon- γ

Масленникова О.М.¹, Шипко М.Н.², Сибирев А.Л.², Степович М.А.³

¹ Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента РФ, г. Москва, РФ, *o.m.maslennikova@gmail.com*

² Ивановский государственный энергетический университет им. В.И. Ленина, г. Иваново, РФ, *michael-1946@mail.ru, alsibirev@mail.ru*,

³ Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского, г. Калуга, РФ, *m.stepovich@rambler.ru*

Изучены возможности использования каналирования низкоэнергетических (9-13 кэВ) электронов для определения характера изменений позиционного порядка в расположении молекулярных комплексов воды и белок-индуцированных ассоциатов при сверхвысоком разведении антител к интерферону- γ без и в присутствии вспомогательных веществ. Использовали метод газоразрядной визуализации [1-4], позволяющий регистрировать параметры лавиностримерного разряда, вызванного полевой эмиссией электронов, проходящих через объёмную часть и поверхность капли исследованных растворов. Исследования структурной организации растворов лекарственных средств [5] осуществляли на растворах поликлональных афинно-очищенных человеческих антител к интерферону- γ . Растворы получали путем многократного разведения антител в очищенной воде, до концентрации $2,5 \cdot 10^{-24}$ мг/мл. Использовали растворы, соответствующие четырем концентрационным точкам антител. Анализ картин газоразрядного изображения растворов позволил определять стереографические проекции каналов движения электронов, сформированных молекулярными комплексами растворов, а также энергию и среднюю концентрацию электронов, их распределение по энергиям, связанным с особенностями ближнего порядка, спецификой процессов самоорганизации. Полученные результаты указывают на значительные изменения водно-дисперсной среды в процессе её разбавления человеческими антителами к

интерферону- γ . Для указанных растворов, в сравнении с очищенной водой, наблюдается упорядочение белок-индуцированных ассоциатов практически во всем объеме раствора. Это свидетельствует о высокой склонности раствора антител к самоорганизации. Следовательно, активация растворов антител к интерферону- γ связана с интенсификацией ассоциативных процессов, сопровождающихся упорядочением белок-индуцированных молекулярных комплексов. Существенную роль в таких процессах играют гидратированные молекулы белков, активирующие коллективные эффекты, связанные с формированием позиционного порядка в расположении молекулярных комплексов среды. Можно предположить заметную модификацию биологических свойств лекарственных средств как в процессе разведения, так и при внесении в раствор вспомогательных веществ, используемых в таблетированных формах препарата.

1. Шипко М.Н., Усольцева Н.В., Сибирев А.Л., Масленникова О.М., Степович М.А., Смирнова А.И. Ориентационные эффекты, наблюдающиеся при прохождении электронов, индуцированных электрическим полем в водных растворах жидких кристаллов низкой концентрации // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, 2019, № 8, с. 102-105, doi: 10.1134/S020735281908016X.

2. Shipko M.N., Usoltzeva N.B., Sibirev A.L., Maslennikova O.M., Stepovich M.A., Smirnova A.I. Orientational Effects Observed During the Passage of Electrons Induced by an Electric Field in Low-Concentration Aqueous Solutions of Liquid Crystals // J. of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques, 2019, vol. 13, iss. 4, pp. 777-778, doi: 10.1134/S1027451019040347.

3. Шипко М.Н., Степович М. А., Сибирев А.Л, Мельникова О.С., Смирнова А.И., Усольцева Н.В. Ориентационные эффекты при каналировании киловольтных электронов в жидких средах // Известия РАН. Серия физическая, 2020, т. 84, № 7, с. 994-997, doi: 10.31857/S0367676520070273.

4. Shipko M.N., Stepovich M.A., Sibirev A.L., Melnikova O.S., Smirnova A.I., Usoltzeva N.B. Orientational Effects of Kilovolt Electron Channeling in Liquid Media // Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics, 2020, vol. 84, no. 7, pp. 820-823, doi: 10.3103/S1062873820070266.

5. Stepovich M.A., Maslennikova O.M., Shipko M.N., Sibirev A.L., Chrishtop V.V. The Use of Gas Discharge Visualization for Identifying Structured Peculiarities of Blood Components: Plasma, Platelets, and Erythrocytes // J. of Cardiology and Cardiovascular Therapy, 2018, vol. 9, iss. 4, art. no. 555770, doi: 10.19080/JOCCT.2018.09.555770.

КОНТРАСТНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И МИКРОДВИЖЕНИЯ ГЛАЗ КАК МАРКЕРЫ АДАПТАЦИИ И РЕАДАПТАЦИИ В МОДЕЛЬНОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ ПО ИЗУЧЕНИЮ ВЛИЯНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ ГРАВИТАЦИИ

Contrast Sensitivity and Eye Microtremor as Markers of Adaptation and Readaptation in a Model Experiment to Study the Influence of Gravity Changes

Шошина И.И.¹, Зеленская И.С.², Бекренева М.П.², Ляпунов С.И.³, Ляпунов И.С.³, Котова Д.А.¹,
Томиловская Е.С.²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, РФ, *i.shoshina@spbu.ru*

² Институт медико-биологических проблем РАН, г. Москва, РФ

³ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, г. Москва, РФ

В течение последних десятилетий довольно глубоко исследованы физиологические последствия влияния на организм человека условий космического полета, в частности невесомости, однако предстоит еще большая работа по изучению адаптации мозга к условиям микрогравитации [1, 2].

Визуальное восприятие играет решающую роль в обеспечении мозга информацией, необходимой для принятия решений, построения картины мира и адаптации к изменяющимся условиям среды. Контрастная чувствительность – фундаментальная характеристика зрительного восприятия, величина обратная пороговому контрасту, отличающаяся для разных пространственных частот. Согласно теории пространственно-частотной фильтрации информации, зрительная система представлена совокупностью каналов, специфичных к восприятию определенного спектра пространственных частот [3]. Основные из них – крупноклеточные магноцеллюлярные и мелкоклеточные парвоцеллюлярные каналы или системы [4], которые на корковом уровне дают начало, соответственно, дорзальному и вентральному потокам передачи информации из каудальных во фронтальные отделы коры [5]. Тремор глаз – мелкие частые колебания глаз. Средняя амплитуда которых составляет 20"-40", частота 87 Гц. Тремор глазных движений наряду с дрейфом характеризует межсаккадические периоды фиксации, когда поступает большая часть информации и происходит детальный анализ изображения. Теория треморно-модуляционного сигнала (ТМС) описывает взаимосвязь между показателями контрастной чувствительности и микродвижений глаз [6].

В наземных условиях для моделирования физиологических эффектов невесомости успешно используется метод «сухой» иммерсии (СИ) [7]. Физиологические эффекты невесомости в этом случае моделируются созданием условий безопорности и гиподинамии.

К участию в исследовании врачебно-экспертной комиссией были допущены десять добровольцев-испытателей (возраст 29,8±1,2 года). Контрастную чувствительность регистрировали с помощью метода

визоконтрастометрии при предъявлении элементов Габора с пространственной частотой: 0,4; 0,8; 1,0; 3,0; 6,0 и 10,0 цикл/град [8]. Параметры микродвижений глаз регистрировали с помощью оптической системы, позволяющей осуществлять высокочастотную видеосъемку [9]. Анализ показателей микротремора осуществляли по частоте попадания амплитуды и частоты микродвижений глаз в условно выделенные диапазоны. За 1 принимали общее количество видеок кадров. Измерения контрастной чувствительности и показателей микротремора глаз проводили за день до погружения в иммерсионную ванну (фон), на 1, 3, 5 и 7 дни «сухой» иммерсии (СИ), а также на следующий день после ее окончания (R1). Статистический анализ выполняли в программе STATISTICA 10 с использованием критерия Манна-Уитни.

Установлено значимое изменение контрастной чувствительности в диапазоне низких и высоких пространственных частот на 3-й день «сухого» погружения по сравнению с фоновыми показателями (рис. 1). Полученные данные рассматриваются как свидетельства рассогласования во взаимодействии между магно- и парвоцеллюлярной системами, что, вероятно, является одним из факторов повышения уровня внутреннего шума зрительной системы.

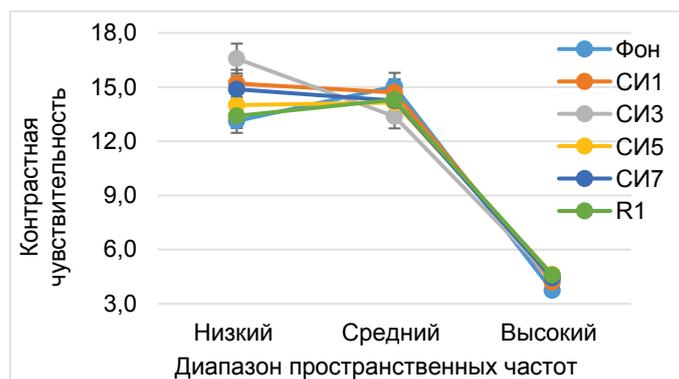


Рисунок 1. Контрастная чувствительность зрительной системы в различных диапазонах пространственных частот в модельном эксперименте с «сухим» погружением

Относительно микротремора глаз установлено, что на 3-и сутки погружения происходит значимое изменение амплитуды тремора в широком диапазоне, также, как и при изменении условий после окончания погружения (рис. 2).

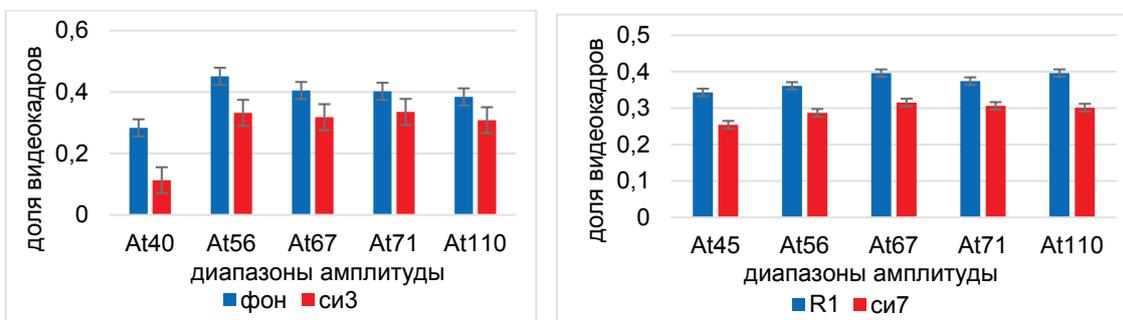


Рисунок 2. Особенности амплитуды тремора глаз (At) в модельном эксперименте с «сухим» погружением

Как низко-, так и высокоамплитудная составляющая часть спектра микродвижений глаз снижалась при опорной разгрузке и гиподинамии в условиях «сухой» иммерсии. Это может быть результатом недостатка входной афферентации и возбуждающих воздействий со стороны управляющих корковых влияний на подкорковые ядра, регулирующие глазные движения. По показателю частоты микротремора различия наблюдались только для диапазона со средней частотой 40 Гц между фоновыми значениями и на 3-й день «сухого» погружения. Таким образом, наиболее информативными с точки зрения оценки функционального состояния при изменении условий среды являются параметры амплитуды тремора, по сравнению с частотой тремора.

Метод регистрации микротремора глаз позволил впервые получить данные о роли амплитуды тремора как показателя процессов адаптации и реадaptации, является новым шагом в поиске методов объективной оценки функционального состояния при изменении условий среды.

Выполнено при поддержке РФФ (проект № 22-18-00074).

1. White O., Clément G., Fortrat J.O. et al. Towards human exploration of space: the THESEUS review series on neurophysiology research priorities // NPJ Microgravity, 2016, vol. 2, p. 16023, doi: 10.1038/npjmgrav.2016.23.
2. Pechenkova E., Nosikova I., Rumshiskaya A. et al. Alterations of Functional Brain Connectivity After Long-Duration Spaceflight as Revealed by fMRI // Front. Physiol., 2019, vol. 10, p. 761, doi: 10.3389/fphys.2019.00761.

3. Campbell F.W., Robson J.G. Application of Fourier Analyses to the Visibility of Gratings // *J. Physiol*, 1968, vol. 197, p. 551.
4. Nassi J.J., Callaway E.M. Parallel Processing Strategies of the Primate Visual System // *Nat. Rev. Neurosci*, 2009, vol. 10, no. 5, p. 360
5. Milner A.D. How do the two visual streams interact with each other? // *Exp. Brain Res*, 2017, vol. 235, p. 1297.
6. Lyapunov S.I. Threshold contrast of the visual system as a function of the external conditions for various test stimuli // *J. Opt. Technol.*, 2014, vol. 81, no. 6, p. 349.
7. Tomilovskaya E., Shigueva T., Sayenko D. et al. Dry Immersion as a Ground-Based Model of Microgravity Physiological Effects // *Front. Physiol.*, 2019, vol. 10, p. 284.
8. Shoshina I., Sosnina I., Zelenskii K. et al. The Contrast Sensitivity of the Visual System in “Dry” Immersion Conditions // *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 4, pp. 681-685.
9. Lyapunov S.I., Shoshina I.I., Lyapunov I.S. Tremor Eye Movements as an Objective Marker of Driver’s Fatigue // *Human Physiology*, 2022, vol. 48, no. 1, pp. 71-77, doi: 10.1134/S0362119722010091.

**НОВЫЕ ВАРИАНТЫ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА.
АНТИОКСИДАНТНОЕ И АНТИРАДИКАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ
New Variants of Dinitrosyl Iron Complexes. Antioxidant and Antiradical Effect**

**Шумаев К.Б.^{1,2}, Космачевская О.В.¹, Топунов А.Ф.¹, Грачев Д.И.^{2,3}, Насыбуллина Э.И.¹, Пугаченко И.С.¹,
Рууге Э.К.^{2,3}**

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Фундаментальные основы биотехнологии РАН, г. Москва, РФ

² НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова Минздрава России, г. Москва, РФ

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ, tomorov@mail.ru

Считается, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются важными физиологическими производными оксида (NO) [1]. В настоящее время наиболее хорошо изучены ДНКЖ лигандами которых наряду с NO являются низкомолекулярные или связанные с белками тиолы. Известно, что эти ДНКЖ обладают широким спектром биологической активности, в том числе они способны функционировать в качестве эффективных антиоксидантов [2-4]. Вместе с тем, железо в динитрозильных комплексах может быть координировано с фосфатными анионами, азотом имидазольного кольца гистидина и другими молекулами [1,2,4].

В нашей работе с использованием спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) было показано, что лигандами ДНКЖ может быть карнозин (бета-аланил-L-гистидин), L-эрготионеин и АДФ. Нужно отметить, что в отличие от известных тиол-содержащих динитрозильных комплексов железа в формировании новых вариантов парамагнитных ДНКЖ может участвовать нитроксильный анион, который является продуктом одноэлектронного восстановления NO. Роль карнозина и L-эрготионеина в биологических системах до конца не ясна. Тем не менее, эти соединения накапливаются в некоторых тканях в миллимолярных концентрациях и перехватывают активные формы кислорода (АФК). Предполагают, что они защищают клетки от окислительного стресса, развивающегося в ходе многих патофизиологических процессов [5,6]. Кроме того, L-эрготионеин концентрируется в митохондриях. В наших экспериментах новые варианты ДНКЖ также перехватывают АФК, при этом наблюдается их деструкция. Интересно, что в модельной системе, содержащей донор нитроксильного аниона (соль Анджели), ионы двухвалентного железа и гидропероксид *трет*-бутила образуются органические свободные радикалы. Вместе с тем, при добавлении в эту систему карнозина приводит к формированию ДНКЖ и ингибированию продукции свободных радикалов. Нельзя исключить, что ДНКЖ, связанные с L-эрготионеином и АДФ, могут участвовать в защите митохондрий от супероксидного анион-радикала, который генерируется дыхательной цепью этих органелл. Следует отметить, что ранее нами было обнаружено формирование ДНКЖ в изолированных митохондриях из сердца крыс [7].

Таким образом, обнаруженные нами новые варианты ДНКЖ, как и тиолсодержащие комплексы, могут быть компонентами антиоксидантных систем, локализованных в различных тканях организма. Мы также полагаем, что ДНКЖ играют роль низкомолекулярных редокс-триггеров, регулирующих ответ клетки на окислительный стресс, причём различные лиганды комплексов позволяют осуществлять тонкую настройку этой регуляции. Кроме того, на основе новых вариантов ДНКЖ могут быть разработаны перспективные фармакологические средства, обладающие комплексным действием.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-29-12052) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

1. Lehnert N., Kim E., Dong H.T., Harland J.B., Hunt A.P., Manickas E.C., Oakley K.M., Pham J., Reed G.C., Alfaro V.S. The Biologically Relevant Coordination Chemistry of Iron and Nitric Oxide: Electronic Structure and Reactivity // *Chem. Rev.*, 2021, vol. 121, pp. 14682-14905.

2. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes // *Nitric Oxide*, 2008, vol. 18, no 1, pp. 37-46.

3. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V. et al. Protective Effect of Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione in Red Blood Cell Lysis Induced by Hypochlorous Acid // *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019, vol. 2019, art. id 2798154, 12 p.
4. Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Грачев Д.И., Тимошин А.А., Топунов А.Ф., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Возможный механизм антиоксидантного действия динитрозильных комплексов железа // *Биомедицинская химия*, 2021, т. 67, № 2, с. 162-168.
5. Paul B.D., Snyder S.H. The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant // *Cell Death Differ.*, 2010, vol. 17, no 7, pp. 1134-1140.
6. Prokopieva V.D., Yarygina E.G., Bokhan N.A., Ivanova S.A. Use of Carnosine for Oxidative Stress Reduction in Different Pathologies // *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, vol. 2016, art. id 2939087, 8 p.
7. Shumaev K.B. Dudylyna A.L., Ivanova M.V. Pugachenko I.S., Ruuge E.K. Dinitrosyl iron complexes: Formation and antiradical action in heart mitochondria // *Biofactors*, 2018, vol. 44, no 3, pp. 237-244.

ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ФОРМА С ЛИПОВОЙ КИСЛОТОЙ И КАРНОЗИНОМ: ПОЛУЧЕНИЕ, АНТИАГРЕГАНТНОЕ И АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ

Liposomal Form with Lipoic Acid and Carnosine: Production, Antiplatelet and Antioxidant Effect

Шелконогов В.А.^{1,2,3}, Чеканов А.В.^{2,3}, Баранова О.А.^{2,3}, Казаринов К.Д.³, Шастина Н.С.¹, Стволинский С.Л.⁴, Федорова Т.Н.⁴, Соловьева Э.Ю.², Федин А.И.², **Сорокоумова Г.М.¹**

¹ МИРЭА – Российский технологический университет (ИТХТ имени М.В. Ломоносова), г. Москва, РФ, vasiliy9999@yandex.ru

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, РФ

³ ФИРЭ им. В.А.Котельникова РАН, Московская область, РФ

⁴ Научный центр неврологии, г. Москва, РФ

Получены гомогенные липосомы (Лс) сферической формы наночастиц, содержащие липоевую кислоту с карнозином, с размером частиц 150-250 нм. Степень включения липоевой кислоты в нанодисперсии (НД) составила 75±5%, карнозина 60±5%. Полученные наночастицы (НЧ) стабильны при хранении при T = + 4 °C в течение 15 месяцев. Оценено влияние полученных липосомальных препаратов на концентрацию продуктов перекисидации липидов и на агрегацию тромбоцитов, обусловленную арахидоновой кислотой.

Сосудистые заболевания головного мозга являются наиболее распространёнными формами патологий ЦНС с высоким показателем смертности. Не менее, важен фактор ишемии в развитии хронических нарушений мозгового кровообращения, вследствие чего образуется сосудистая деменция [1]. В результате ишемического повреждения происходит уменьшение мозгового кровотока, микроциркуляторные нарушения, возникновение и прогрессирование окислительного стресса; воспалительные реакции, деструкция ГЭБ и др. [2]. Поэтому получение новых лекарственных форм, позволяющих увеличивать биодоступность активных субстанций и их направленную доставку к месту патологии – это важнейшие задачи при создании новых лекарственных форм известных препаратов.

Данная работа посвящена разработке липосомальной формы, содержащей одновременно липоевую кислоту (ЛК) и карнозин (К). Данные вещества являются мощными антиоксидантами и применяются при различных патологиях, в том числе и при нейродегенеративных заболеваниях. К сожалению, они характеризуются низкой биодоступностью, быстрой биodeградацией. ЛК плохо растворима в воде, в организме быстро связывается с белками и биodeградирует под действием разных ферментов, а карнозин - быстро расщепляется ферментом карнозиной. Поэтому для устранения выявленных недостатков этих антиоксидантов целью исследования является разработка липосомальной формы.

В результате работы были и получены гомогенные липосомы (Лс) сферической формы, содержащие карнозин с ЛК, с размером частиц от 150 до 250 нм, характеризующиеся высоким содержанием активных субстанций и стабильностью в течение длительного хранения (15 мес) при комнатной температуре и при T = + 4 °C.

Исследование антиоксидантной активности этих двух субстанций в модельной системе (реакция Фентона) показало, что при одновременном их использовании в концентрации ЛК (24 мМ) и К (15 мМ) значительно (в 10 раз) приводило к уменьшению концентрации продуктов перекисного окисления липидов.

Изучение влияния Лс с ЛК и карнозином на агрегацию тромбоцитов (Тц) в плазме крови, выделенной из крови условно здоровых доноров, показало, что препарат, содержащий ЛК – 2 мМ и К – 2,5 мМ, приводил к снижению степени агрегации тромбоцитов (Тц), обусловленной арахидоновой кислотой (АК) на 45-55% относительно контролей. Необходимо отметить, что водорастворимые формы липоевой кислоты (2 мМ) и карнозина (2.5 мМ) практически не повлияли на агрегацию Тц, обусловленную АК. По-видимому, это связано с

плохой способностью проникать в клетку этих препаратов, тогда как Лс более легко проникают через клеточную мембрану путём их слияния с мембраной Тц.

Таким образом, получены липосомы с карнозином и липоевой кислотой, обладающие антиоксидантным действием и проявляющие антиагрегантные свойства в отношении тромбоцитов человека.

Данная работа выполнена в рамках гос. задания (№ гос. регистрации НИОКТР АААА-А19-119100390063-9) и при поддержке Фонда развития теоретической физики и математики "Базис", (№ гранта: 22-1-1-28-1).

1. Бурчинский С.Г. Ишемия головного мозга: возможности комплексной фармакологической коррекции // Статьи института геронтологии АМН Украины, 2006, т. 14, с. 15-18.

2. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М.: "Медицина", 2001, 328 с.

ВОЗМОЖНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ ПРИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Possible Molecular Mechanisms of Polysaccharides Effects in Viral Diseases

Генералов Е.А., Симоненко Е.Ю., Яковенко Л.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ, *generals1179@gmail.com*

Полисахариды (ПС) из различных источников давно используются в медицинских целях в странах Азии. Из грибов шиитаке выделен β -(1–3)-D-глюкан лентинан, который используется в клиниках Японии и Китая в сочетании с химиотерапией при онкологических заболеваниях. ПС ASPP из пурпурного сладкого картофеля проявляет противовоспалительную активность, снижая уровни оксида азота, интерлейкинов IL-6 и IL-1 β и фактора некроза опухолей TNF- α и увеличивая продукцию интерлейкина IL-10 в макрофагах линии RAW 264.7 мыши, активированных липополисахаридом, при этом величина эффекта зависит от дозы. Многие ПС, выделяемые из водорослей, способны облегчать течение вирусных заболеваний, причем ПС одной природы, но из разных источников, различаются по активности. Так, например, фукоидан из бурой водоросли *Sargassum trichophyllum* был эффективен против вируса герпеса простого (HSV-1 и HSV-2), фукоидан из водоросли модзоку – против вируса азиатской чумы птиц (NDV), а низкомолекулярные фракции фукоидана из ламинарии японской – против вируса гриппа А, аденовируса и вируса парагриппа типа 1. Сульфатированный ПС спирулан кальция, продуцируемый цианобактерией спирулиной, обладает широким спектром биологических активностей: антиоксидантной, иммуномодулирующей, противовоспалительной, а также противовирусной активностью в отношении вирусов HSV-1, цитомегаловируса человека, вирусов гриппа А, ВИЧ-1, кори и эпидемического паротита. Существенно, что упомянутые выше противовирусные эффекты проявляют, в основном, ПС с молекулярной массой от нескольких сотен тысяч до миллионов дальтон.

Жизненный цикл вируса включает в себя стадии: прикрепление к поверхности клетки, проникновение в клетку компонентов вируса, репликация, сборка вириона и выход из клетки. ПС, видимо, могут влиять на все эти стадии. Молекулярные механизмы действия полисахаридов зависят от их природы и от типа клетки-мишени. Противовирусный эффект ПС из водорослей обычно связан с блокированием прикрепления вирусов к поверхности клетки-хозяина. Биологическая активность ПС может быть обусловлена влиянием на плюрипотентные и иммунокомпетентные клетки. Иммуномодулирующая, противовоспалительная, регенеративная и некоторые другие виды биологической активности ПС, необходимые для обеспечения защиты от вирусной инфекции и ликвидации ее последствий, реализуются при их взаимодействии с клеточными рецепторами, которое вызывает каскады внутриклеточных сигналов, приводящих к изменениям экспрессии соответствующих генов. Точных количественных моделей этих процессов нет, однако существует качественная модель для ПС НТЛР из топинамбура, включающая только основные их аспекты [1]. Есть основания полагать, что ПС сходной природы, например, экстрагированные из проростков картофеля, будут действовать сходным же образом. Предполагается, что переход клетки к апоптозу под действием таких ПС происходит по следующему сценарию.

Для проявления действия ПС на клеточной мембране должны присутствовать рецепторы Dectin-1, димер TLR-6/TLR-2 и TNFR-1. Связывание ПС с Dectin-1 приводит к димеризации рецепторов генерации сигнала по пути через NF- κ B. Связывание с рецепторами Dectin-1 и TLR-6 приводит к наработке цитокина TNF (также по пути через NF- κ B) и активации комплекса белков TRADD/FADD рецептора TNFR-1 через адаптор MyD88, причем эта стадия ингибируется при связывании белка SODD с «доменом смерти» DD, что препятствует переходу клетки к апоптозу по этому пути. По пути через NF- κ B передается и противоапоптотический сигнал, приводящий к увеличению продукции TNF и TNFR-1, а также белка cFLIP, ингибирующего образование апоптотического каспазного комплекса. Накопившиеся TNF и TNFR-1 образуют тримеры (TNF–TNFR-1)₃, которые запускают генерацию сигнала к увеличению продукции TNF и TNFR-1. Так замыкается петля положительной обратной связи, приводящей к быстрому росту числа активированных белков TRADD/FADD и усилению проапоптотического сигнала. При достижении этим сигналом некоторого порога клетка может быстро перейти в предапоптотическое состояние и к апоптозу, то есть произойдет своего рода бифуркация в поведении клетки.

Особенности возбудителя COVID-19, вируса SARS-CoV-2, состоят в том, что и вирус, и отдельные вирусные белки могут взаимодействовать с огромным числом рецепторов на поверхностях различных клеток (уже сообщалось об участии – KREMEN1, ASGR1, AXL, NRP-1, ACE2, CD147) приводя к каскадам патологических ответов, которые зависят также и от текущего состояния организма. Универсальность биологических активностей природных полисахаридов пока не получила полного объяснения, но позволяет предположить, что полисахариды имеют большой потенциал для использования их как в терапии острых состояний при вирусных инфекциях, в частности, COVID-19, так и для реабилитации при отдаленных последствиях заболеваний.

1. Генералов Е.А., Левашова Н.Т., Сидорова А.Э., Чумаков П.М., Яковенко Л.В. Автоволновая модель бифуркационного поведения трансформированных клеток под действием полисахарида // Биофизика, 2017, т. 62, вып. 5, с. 876-881, doi: 10.1134/S0006350917050086.

СЕКЦИЯ 4. БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ КРОНЫ И СТРОЕНИЯ ПОБЕГОВ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ РАЗНОЙ СЕКСУАЛИЗАЦИИ

Crown Structure and Morphology Peculiarities of *Abies Sibirica* Shoots with Different Sexualization

Бажина Е.В., Стасова В.В.

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ Красноярский научный центр СО РАН, Красноярск, РФ, genetics@ksc.krasn.ru

Живые организмы – как сложные динамические системы характеризуются определенной структурой – иерархичностью и пространственно-временным соотношением слагающих их элементов и связей. Множество процессов и явлений у организмов объясняется действием гравитационного поля Земли, оказывающего давление на все материальные тела и действующего в течение всей жизни особи. Гравитация – самая явно ощутимая из фундаментальных сил природы – прекрасно описана математически, несмотря на то, что природа ее сложно поддается физическому описанию [1,2]. У растений гравитацией определяется полярность, т.е. прежде всего, асимметрия по оси «верх-низ»: распределение химических веществ, в т.ч. и гормонов роста, различия морфологических показателей, сексуализации побегов, что определяет процессы воспроизводства и возобновления, сохраняющие устойчивость живых систем [3-5].

Пихта сибирская – крайне чувствительна к действию силы тяжести, которая определяет функционирование, морфологию и локализацию генеративных органов в кроне и на побеге, распределение в них веществ и, прежде всего, фитогормонов [5-7]. Женские генеративные побеги локализируются на вершине дерева (0,4-2,3 м), ниже по стволу располагаются мужской (0,1-13,0 м), а затем и вегетативный (4,3-22,8 м) ярусы. Асимметрия половых побегов по оси «верх-низ» (ярусность кроны) характерна во всех условиях произрастания вида, смещения полов не наблюдалось даже в экстремальных условиях высокогорья, где высота деревьев не превышает 1,5-2,0 м. Настоящие исследования показали, что побеги разной сексуализации (ярусов) дифференцированы и различаются по особенностям структурно-функциональной организации (табл. 1). Достоверно ($p \leq 0,01-0,05$) отличаются морфолого-анатомические характеристики хвои и площади поперечного сечения побегов, в целом, и древесины, а также отношения площади флоэмы к площади древесины, площади сердцевинки к площади поперечного сечения побегов. У генеративных побегов почти в два раза больше площадь сердцевинки, содержащей запасующую паренхиму с резервами крахмала, питательных веществ, и древесины.

Таблица 1. Анатомические показатели одно- (числитель) и двухлетних (знаменатель) побегов пихты сибирской разной сексуализации

| Площадь поперечного сечения, мм ² | Женские | Мужские | Вегетативные | p |
|--|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------|
| Побегов у их основания | $8,8 \pm 1,23$ $14,0 \pm 3,00$ | $5,9 \pm 1,19$ $9,2 \pm 1,15$ | $2,7 \pm 0,50$ $4,7 \pm 1,12$ | 0,01 |
| Сердцевинки | $0,26 \pm 0,07$ $0,35 \pm 0,10$ | $0,25 \pm 0,07$ $0,29 \pm 0,05$ | $0,14 \pm 0,05$ $0,18 \pm 0,07$ | $0,37$ $0,56$ |
| Древесины | $0,35 \pm 0,14$ $0,46 \pm 0,17$ | $0,21 \pm 0,05$ $0,26 \pm 0,51$ | $0,17 \pm 0,05$ $0,18 \pm 0,06$ | $0,4$ $0,01$ |

Полярность в расположении репродуктивных органов в кроне (продольный градиент) свидетельствует о резком градиенте фитогормонов в пределах кроны дерева. Очевидно, локализация и анатомическое строение побегов, а также хвои пихты сибирской – крайне устойчивый видовой генетический признак, который определяется физическим импринтом. Действие гравитации – через экологию, физиологию и потоки веществ, определяет не только строение кроны пихты сибирской, но и особенности структурно-функционального строения побегов разной сексуализации на клеточном и тканевом уровнях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проекты № 11-04-00281, 20-05-00540.

1. Вавилов С.И. Исаак Ньютон. М.-Л.: Ан СССР, 1945, 230 с.
2. Гаджиев С.Ш. Гравитация и ее физическая сущность // Вестник социально-педагогического института, 2014, № 3(11).
3. Геодакян В.А. Эволюционная специализация полов по тенденциям стабилизирующего и ведущего отбора. 3-й съезд Всес. общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова. Л., 1977, т. II(1), с. 46-47.
4. Уоринг Ф., Филлипс И. Рост и дифференцировка растений. М.: Мир, 1982, 512 с.
5. Минина Е.Г., Беляев В.В. Изучение ростовых веществ в связи с дорсовентральностью и сексуализацией побегов пихты сибирской (*Abies sibirica* Ldb.) // Физиология растений, 1972, т. 19, вып. 3, с. 658-661.

6. Бажина Е.В. Состояние древостоев пихты сибирской (*Abies sibirica*) и распределение химических элементов по ярусам ее кроны в лесных экосистемах ООПТ Красноярского края, Россия // Nature Conservation Research. Заповедная наука, 2018, т. 3, прилож. 2, с. 40-53, doi: 10.24189/ncr.2018.064.

7. Бажина Е.В. Изменения архитектуры кроны деревьев пихты сибирской при нарушении гомеостаза // Биофизика, 2020, т. 65, № 4, с. 753-759.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ В ДОННЫХ ОСАДКАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЙ И ГЛУБИНЫ (НА ПРИМЕРЕ ПРИБРЕЖНОЙ АКВАТОРИИ СЕВАСТОПОЛЯ, КРЫМ, ЧЁРНОЕ МОРЕ)

Distribution of Anaerobic Bacteria in Bottom Sediments Depending on Redox Conditions and Depth (by the Example of the Coastal Water Area of Sevastopol, Crimea, Black Sea)

Бурдиян Н.В.

Институт биологии южных морей имени А.О.Ковалевского РАН, г. Севастополь, РФ, *burdiyan@mail.ru*

Донные осадки представляют собой динамическую систему со сложными физико-химическими условиями, от которых зависит бактериальное население. Негативное антропогенное воздействие на морскую экосистему приводит к тому, что в донных отложениях начинают преобладать восстановительные условия среды, крайне неблагоприятные для жизнедеятельности аэробной микробиоты. Как следствие, процесс самоочищения акватории начинает протекать за счёт деятельности анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, в том числе сульфатредуцирующих, тионовых и денитрифицирующих групп бактерий, которые также принимают участие и в процессах преобразования углеводородов нефти в морской среде. Большое влияние на развитие микробиологических процессов оказывают окислительно-восстановительные условия, характеристикой которых служат окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) и активная реакция среды (рН). Целью работы было исследовать распределение анаэробных бактерий в донных осадках в зависимости от окислительно-восстановительных условий и глубины, используя количественные показатели тионовых, сульфатредуцирующих и денитрифицирующих групп бактерий, полученных в пробах донных осадков бухт Севастополя и прилегающей акватории.

Донные осадки отбирали в бухтах и районе внешнего рейда акватории Севастополя, в каждой пробе определяли количественный состав тионовых (ТБ), сульфатредуцирующих (СРБ) и денитрифицирующих (ДНБ) групп бактерий. Окислительно-восстановительный потенциал измеряли ионометром И-102. Количество микроорганизмов в пробе определяли методом предельных разведений [1] с последующим посевом 1 мл из каждого разведения в элективные среды [1, 2, 3]. Наиболее вероятное число микроорганизмов в единице объёма рассчитывали по таблице Мак-Креди, основанной на методе вариационной статистики [1].

Исследуемые микроорганизмы выделены из донных осадков с различными показателями окислительно-восстановительного потенциала, Eh: от + 356 до -189 (мВ). Численность СРБ в донных осадках колебалась от $1,0 \times 10^4$ кл./г, ТБ - от 25 до $9,5 \times 10^5$ кл./г, ДНБ - от 1,0 до $2,5 \times 10^7$ кл./г. Между величиной ОВП и численностью анализируемых бактерий выявлена отрицательная корреляционная зависимость. Коэффициент корреляции для СРБ составил $r = -0,5$, для ТБ и ДНБ, соответственно, $r = -0,47$ и $-0,51$ ($P < 0,05$). Достоверная зависимость между значениями рН среды и численностью наблюдаемых микроорганизмов отсутствует. Для определения взаимосвязи между анализируемыми бактериями и вышеуказанными параметрами среды (ОВП и рН) использовали показатель gH_2 , рассчитанный в [4] для донных осадков акватории Севастополя. Объединённые формулой Кларка показатели рН и Eh трансформируются в один показатель $gH_2 = Eh/30 + 2$ рН (отрицательный логарифм количества газообразного водорода), колеблющийся от 11-16 в донных осадках с восстановительными условиями среды и до 19-28 с окислительными. Проведенный анализ показал, что рассматриваемые микробные группы развиваются при широком диапазоне (от 11 до 28) показателя gH_2 . Корреляционный анализ выявил слабую взаимосвязь исходного параметра с численностью СРБ, отсутствие достоверной зависимости – с ТБ и ДНБ (соответственно, $r = -0,34$; $-0,1$; $-0,11$; $n = 21$, $P < 0,05$). В то же время в большинстве проб численность анаэробов выше при низких значениях gH_2 . Высокая численность ТБ и СРБ выявлена при обозначенном диапазоне глубин: от 1 до 20 м. Наибольшее количество ДНБ чаще наблюдалось на глубинах от 1 до 10 м. На примере Севастопольской бухты проанализировано распределение микроорганизмов в зависимости от глубины на станциях отбора. Между исследуемыми параметрами выявлена обратная взаимосвязь. Коэффициент корреляции для СРБ составил: $r = -0,57$; ТБ: $r = -0,48$; ДНБ: $r = -0,51$ ($n = 14$, $P < 0,05$). Иными словами, численность анализируемых групп бактерий возрастает с уменьшением глубины.

Таким образом, результаты исследований свидетельствовали о том, что восстановительные условия среды, характеризующие большинство донных осадков рассматриваемой акватории, способствуют развитию анализируемых групп бактерий, а их численность возрастала с уменьшением глубины.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ: №121031500515-8 «Молисмологические и биогеохимические основы гомеостаза морских экосистем».

2. Романенко В.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. Л.: Наука, 1974, 194 с.
3. Сорокин Ю.И. Микрофлора грунтов Черного моря // Микробиология, 1962, т. 31, вып. 5, с. 899-903.
4. Миронов О.Г. Санитарно-биологические аспекты экологии севавтопольских бухт в XX веке. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003, 185 с.

МИКРОПЛАСТИКОВОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПРИБРЕЖНЫХ ЗОН РЕКРЕАЦИИ СЕВАСТОПОЛЯ

Microplastics Pollution of Sevastopol Coastal Recreation Zones

Возная Т.В.¹, Мосунов А.А.¹, Сибирцова Е.Н.², Кузьмина Н.С.², Темных А.В.², Силаков М.²

¹ Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ, aamosunov@sevsu.ru

² Институт биологии южных морей, г. Севастополь, РФ

Микропластик (МП), повсеместно распространяющийся в наземных и морских экосистемах, признан одной из глобальных проблем биосферы [1]. Этот относительно новый для окружающей среды поллютант дифференцируется в зависимости от размера на две категории: «крупный» МП (частицы размером от 1 до 5 мм) и «мелкий» МП (20 мкм – 1 мм) [2]. Наиболее уязвимыми по отношению к аккумуляции микропластикового загрязнения (МЗ) являются прибрежные зоны рекреации, что обусловлено воздействием на них одновременно двух источников поступления МЗ – наземного и морского.

Качественный анализ частиц МП, извлечённых из пляжевых, донных отложений, воды либо желудочно-кишечного тракта гидробионтов, помимо описания формы, цвета, степени деградированности предусматривает также определение типа полимерного материала, из которого было изготовлено изделие, измельчённое со временем до МП. Поэтому выбор адекватного способа анализа частиц МП требует особого внимания.

До настоящего времени не выработано унифицированного метода ни отбора проб МЗ, ни экстракции из проб МП, ни его последующего качественно-количественного анализа. Однако ряд преимуществ указывается при сочетании микроскопирования с различными спектроскопическими методами, такими как ИК- и рамановская спектроскопия [3,4].

В нашей работе для проведения классификации экстрагированных частиц МП по типу полимерного материала было использовано оборудование Центра коллективного пользования «Молекулярная структура вещества» Севастопольского государственного университета – сканирующий зондовый микроскоп NtegraSpectra. Его уникальность состоит в том, что помимо атомно-силового микроскопа в него входит рамановский спектрометр, оснащенный пятью лазерами, что позволяет проводить спектроскопический анализ микрочастиц с высокой точностью под контролем оптического микроскопа. Ранее, нами были получены характеристические спектры основных видов пластика [5], которые составляют в настоящее время базу для анализа выделяемых микрочастиц. В качестве примера на рисунке 1 приведен один из спектров комбинационного рассеяния, взятый из вышеописанной базы.

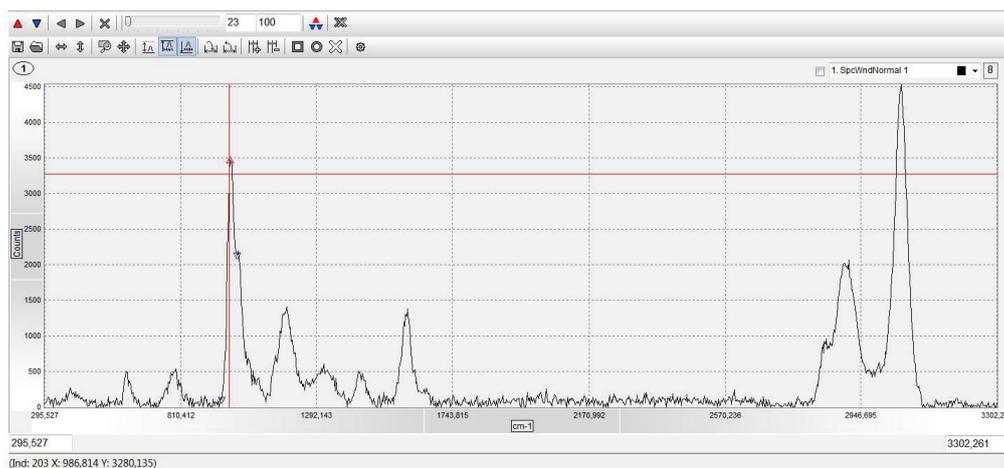


Рисунок 1. Рамановский спектр полистирола. Возбуждающий лазер с длиной волны 633 нм

В работе проведен анализ частиц МП, выделенных из желудочно-кишечного тракта представителей черноморской промысловой ихтиофауны, отловленных в акваториях зон рекреации Севастопольского региона в период 2020-2021 гг. Определение типа полимерного материала МП производилось путем анализа рамановских спектров.

1. Hurley R., Rothwell J., Woodward J.J. Microplastic contamination of river beds significantly reduced by catchment-wide flooding // Nature Geoscience, 2018, vol. 11, no. 4, pp. 251-257.

2. Imhof H.K., Schmid J., Niessner R., Ivleva N.P., Laforsch C. A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments // *Limnology and Oceanology*, 2012, methods 10, pp. 524-537.
3. Song Y.K., Hong S.H., Jang M., Han Gi M., Rani M., Lee J., Shim W.J. A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastic in environmental samples // *Marine Pollution Bulletin*. 2015, vol. 93, no. 1-2, pp. 202-209.
4. Joana Correia Prata, Joao P. da Costa, Armando C. Duarte, Teresa Rocha-Santos. Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: A critical review // *Trends in Analytical Chemistry*, 2019, vol. 110, pp. 150-159.
5. Якимова К.В., Сахонь Е.Г., Мосунов А.А. Создание базы рамановских спектров различных видов пластиков // Понт эвксинский-2019, XI Всероссийская научно-практическая конференция для молодых ученых по проблемам водных экосистем, посвященная памяти д.б.н., проф. С. Б. Гулина, Материалы конференции, Севастополь, 23-27 сентября 2019 г.

**БИОЭЛЕКТРОГЕНЕЗ МИКРОБНЫХ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ПРИСУТСТВИИ
SHEWANELLA ONEIDENSIS MR-1 И НЕКОТОРЫХ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ**
Bioelectrogenesis of Microbial Fuel Cells in The Presence of *Shewanella Oneidensis* Mr-1 And Some Heavy Metals

Гасюк О.А., Волченко Н.Н., Лазукин А.А., Самков А.А., Худокормов А.А.
Кубанский государственный университет, г. Краснодар, РФ, olgagasyuk2000@yandex.ru

Микробные топливные элементы (МТЭ) являются перспективными биоинженерными системами. Данные устройства могут быть использованы как источник энергии, в процессах мониторинга и очитки окружающей среды, в медицине, в «интернете вещей» и т.д. В настоящее время актуальной проблемой является загрязнение окружающей среды в результате сильной антропогенной нагрузки. МТЭ могут быть использованы в процессах биоремедиации окружающей среды за счёт происходящих в них биоэлектрохимических процессов. Однако в свою очередь вещества-токсиканты могут подавлять активность электрогенной микрофлоры, поэтому важно изучить влияние различных поллютантов (СПАВ, углеводороды, тяжёлые металлы, пестициды и т.д.) на биоэлектрогенез.

В данном исследовании использовались МТЭ бентосного типа с электродами горизонтальной и вертикальной конструкции. В качестве соединений-поллютантов использовались Pb^{2+} , Cu^{2+} и Ni^{2+} в концентрации 7 ПДК для иона каждого металла. В качестве донного грунта использовался песок поймы р. Кубань. Electrodes изготавливались из углеродного войлока «Карбопон» и графитовых стержней. Анодный электрод пропитывался суспензией микробной культуры *Shewanella oneidensis* MR-1 (ВКПРМ № В-9861), известной своими электрогенными свойствами. Так же известно, что данный штамм способен использовать тяжёлые металлы в анаэробных условиях в качестве акцепторов электронов, восстанавливая их до менее токсичных соединений. Электрический потенциал, создаваемый в микробных топливных элементах (под нагрузкой в 1 кОм), фиксировался автоматическим вольтметром авторской конструкции А.А.Лазукина.

Средние значения потенциала, полученное за 10 суток с МТЭ с горизонтальными электродами в присутствии свинца составило 250,1 мВ, никеля – 380,8 мВ, меди – 413,2 мВ. Максимальный вольтаж, полученный с данных устройств был для: Pb^{2+} – 416,9 мВ, Ni^{2+} – 488,3 мВ, Cu^{2+} – 590,6 мВ. При этом наиболее негативный эффект на биоэлектрогенез оказывал свинец.

За 10 суток среднее значение напряжение МТЭ с вертикальными электродами составило: для свинца – 124,7 мВ, никеля – 65,1 мВ, меди – 43,7 мВ. Наибольшее значение биоэлектрогенеза, полученное с данных устройств составило: Pb^{2+} – 191,4 мВ, Ni^{2+} – 158,6 мВ, Cu^{2+} – 70,5 мВ. В данных устройствах наиболее выраженный негативный эффект на электрогенез МТЭ был оказан катионами меди.

По прошествии месяца в МТЭ с горизонтальными электродами среднее значение биоэлектрогенеза за 10 суток составил: в присутствии свинца – 102,8 мВ, никеля – 202,5 мВ, меди – 68,9 мВ. Максимальное напряжение в присутствии поллютантов составило: для Pb^{2+} – 122,1 мВ, Ni^{2+} – 335,4 мВ, Cu^{2+} – 75,9 мВ. Наибольшее падение электрогенеза (в 7,8 раз) наблюдается в присутствии ионов меди, что говорит о сильном негативном воздействии данного металла на микробиоту МТЭ.

Среднее значение биоэлектрогенеза (10 суток) МТЭ с вертикальными электродами спустя месяц составило: для свинца – 14,2 мВ, никеля – 5,3 мВ, меди – 2,7 мВ. Максимальный электрогенез для данных устройств составил: для Pb^{2+} – 18,1 мВ, Ni^{2+} – 6,4 мВ, Cu^{2+} – 3,1 мВ. В данных МТЭ самый низкий электрогенез сохраняется в присутствии ионов меди, а наибольший сохранился в присутствии солей свинца.

Таким образом, наибольший электрогенез был получен с МТЭ с горизонтальными электродами. При этом с горизонтальными электродами наибольшие показатели электрического потенциала дали микробные топливные элементы, где в качестве поллютанта использовались ионы никеля, тогда как МТЭ с вертикальными электродами наилучшие значения показали в присутствии ионов свинца. При этом самые низкие значения биоэлектрогенеза было выявлено с ионами меди, как в МТЭ с горизонтальными, так и вертикальными электродами. Медь

оказывала наиболее негативный эффект на электрогенез микробных топливных элементов и можно предположить на микробиоту данных устройств. Так величина электрогенеза в присутствии того или иного иона металла зависит от типа электродов и так же от микробиоты микробного топливного элемента.

Таким образом, биотопливные элементы бентосного типа способны функционировать в присутствии загрязнения донных осадках тяжелыми металлами как минимум в концентрации до 7 ПДК. Факт частичного подавления биоэлектрогенеза может быть использован в дальнейшем для применения МТЭ в режиме неселективного биосенсора непрерывного действия, расположенного постоянно в окружающей среде. В рамках дальнейших исследований будет определено влияние биоэлектрических процессов на пространственное распределение тяжелых металлов в донном грунте.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ ГИДРОТЕХНИЧЕСКИХ СООРУЖЕНИЙ КАК ФАКТОР САМООЧИЩЕНИЯ ПРИБРЕЖНЫХ АКВАТОРИЙ

Microbiological Component of Hydraulic Structures as a Factor of Self-Purification of Coastal Waters

Дорошенко Ю.В.

Институт биологии южных морей имени А.О.Ковалевского РАН, г. Севастополь, РФ, julia_doroshenko@mail.ru

Гидротехнические сооружения являются одним из факторов, влияющих на экологическое состояние прибрежных акваторий. Южный защитный мол в Севастопольской бухте был построен в период 1977–1980 гг., а восточный мол в б. Камышовой в 1971–1977 гг. XX столетия. Это внесло изменения в водообмен бухт с открытым морем и значительно увеличило площадь твёрдого субстрата для развития сообщества обрастателей, в первую очередь, фильтраторов, играющих важную роль в трансформации органических веществ [1].

Однако при обследовании водолазами было обнаружено заиливание молов, как с внешней, так и с внутренней сторон, которое неблагоприятно влияет на развитие сообщества макрообрастателей, но позволяет активно развиваться микроорганизмам [2]. Целью работы является определение общей численности гетеротрофных и нефтеокисляющих микроорганизмов в осевшей взвеси на подводной части мола, как показателей самоочищения морской среды.

Пробы отбирались с помощью водолазов на 6 станциях с площади 2×2 см² стерильными шприцами объёмом 20 мл. Станции располагались на внешней и внутренней сторонах молов с глубинами 1 м, 7 м, и 15 м соответственно у основания, середины и оконечности молов. Отбор проб проводился 1 раз в 2-3 месяца. На Южном молу отобрано 23 пробы (1 шприц был утерян). На Восточном молу отобрано 24 пробы.

Количество микроорганизмов в пробе определяли методом предельных разведений с последующим посевом 1 мл из каждого разведения в селективные среды. Наиболее вероятное число микроорганизмов в единице объёма рассчитывали по таблице Мак-Креди, основанной на методе вариационной статистики [3].

Южный мол. Численность общего количества гетеротрофов, в целом, незначительно колебалась в пределах 10^3 – 10^4 кл./мл по всем станциям на всех горизонтах. Это означает, что в районе южного мола Севастопольской бухты постоянно присутствуют легкодоступные органические вещества.

Ведущая роль в самоочищении морской среды от нефти и нефтепродуктов принадлежит нефтеокисляющим микроорганизмам. Максимальные значения численности нефтеокисляющих микроорганизмов в отобранных пробах (9500 кл./мл) соответствуют станции, расположенной на глубине 1 м с внешней стороны мола, что свидетельствует о наличии нефтяного загрязнения. Этой станции соответствует так называемая «кутовая» часть, где при определённых метеорологических условиях может происходить скопление загрязняющих веществ. Количество нефтеокисляющих бактерий на этой станции в ноябре достигало 38 % от общего количества гетеротрофных бактерий. Минимальные значения нефтеокисляющих микроорганизмов наблюдали на станциях, расположенных на глубине 1 м с внешней и внутренней сторон мола – 0,7 и 0,9 кл./мл соответственно.

Восточный мол (б. Камышовой). Численность общего количества гетеротрофов преимущественно варьировала в пределах 10^3 – 10^5 кл./мл во всех пробах. Однако в октябре это значение резко возросло и составляло на всех станциях 10^7 кл./мл. В то же время численность нефтеокисляющих бактерий была необыкновенно низкой и не превышала 10 кл./мл. К тому же, на среднем горизонте внутренней стороны мола определить нефтеокисляющие бактерии не удалось. Это может свидетельствовать о значительном поступлении органических веществ в портовую акваторию. В целом, наблюдали колебания численности нефтеокисляющих бактерий от 25 до 950 кл./мл, т.е. в пределах одного порядка величин.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что илистые отложения молов в рассматриваемых акваториях, способствуют развитию анализируемых групп бактерий, участвующих в процессах самоочищения акваторий, а их численность не зависит от глубины.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ: №121031500515-8 «Молисматологические и биогеохимические основы гомеостаза морских экосистем».

1. Миронов О.Г. Санитарно-биологические аспекты экологии севастопольских бухт в XX веке. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003, 185 с.

2. Миронов О.Г., Муравьёва И.П., Миронова Т.О. и др. Илестые образования на гидротехнических сооружениях акватории Севастополя (Чёрное море) // Экология моря, 2007, вып. 73, с. 55-59.
3. Практикум по микробиологии. Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Изд. центр «Академия», 2005, 608 с.

РЕАКЦИЯ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ ЧЁРНОГО МОРЯ НА СВЕТ: СТРУКТУРНАЯ МОДЕЛЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО К ГОЛУБОМУ СВЕТУ ОПСИНА MYTILUS GALLOPROVINCIALIS
Response of Some Black Sea Bivalve Molluscs to Light: 3D-Model of Blue Light-Sensitive Opsin from *Mytilus Galloprovincialis*

Зейналов А.И.¹, Савицкий М.А.¹, Бебиашвили А.В.¹, Кузнецов А.В.^{2,3}

¹ Малая академия наук «Искатель», г. Севастополь, РФ, *uchenikmanz@gmail.com*

² Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь, РФ

³ Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ

Двустворчатые моллюски *Venus gallina* (Linnaeus, 1758) и *Scapharca inaequivalis* (Bruguiere, 1789) являются типичными представителями песчаных пляжей черноморского побережья. *Flexopecten ponticus* (Bucchoy et al., 1889) встречается реже. *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) и *Mytilaster lineatus* (Gmelin, 1791) обитают на скалах, причём мидии встречаются также в иле на дне. В отличие от других моллюсков *F. ponticus* способен передвигаться за счёт реактивной силы, возникающей при резком схлопывании створок. Известно, что у морского гребешка по краю мантии располагаются глазки, чувствительные к быстрому изменению освещённости, что позволяет моллюску реагировать на тень от приближающегося предмета, и захлопывать раковину. Медленное смыкание створок раковины наблюдается и у митилид, хотя они ведут оседлый образ жизни. Для венерки и скафарки подобная реакция на свет не описана. Интересно связать наблюдаемые световые реакции у двустворок с молекулярными механизмами световосприятия.

V. gallina и *S. inaequivalis* собирали на отмели в бухте Солёная (Казачья), особи *F. ponticus* получены с устричной фермы (ИнБЮМ), *M. galloprovincialis* и *M. lineatus* отбирали на мелководной банке м. Фиолент (г. Севастополь). Изъятых особей доставляли в лабораторию, промывали свежей морской водой и помещали в аквариум объёмом 30 л. Давали животным адаптироваться в течение нескольких часов и направляли подвижный лазерный пучок между открытыми створками поочередно на каждое животное. Фиксировали реакцию животных на воздействие. Биоинформационный анализ проводили, как описано ранее [1].

Венерка и скафарка не реагировали на освещение подвижным красным, зелёным и синим лазером, в то время как гребешок быстро захлопывал створки, а мидия и митилястер медленно втягивали ногу и края мантии внутрь, а затем закрывали створки в ответ на интенсивный сине-фиолетовый свет (табл. 1).

Таблица 1. Эксперименты по воздействию света на пять видов черноморских двустворчатых моллюсков

| Объект исследования | Цвет светового источника | | |
|---|--------------------------|---------|-------|
| | красный | зелёный | синий |
| Венерка <i>Venus gallina</i> | - | - | - |
| Скафарка неравная <i>Scapharca inaequivalis</i> | - | - | - |
| Гребешок черноморский <i>Flexopecten ponticus</i> | - | - | + |
| Мидия средиземноморская <i>Mytilus galloprovincialis</i> | - | - | + |
| Митилястер полосатый <i>Mytilaster lineatus</i> | - | - | + |
| Примечание: «-» - отсутствие двигательной реакции, «+» - заметная реакция на освещение | | | |

Поиск в базе NCBI (National Center for Biotechnology Information) выявил геномную последовательность *M. galloprovincialis* длиной 1,2 Gb, включающую около 79 тыс. аннотированных белков, а также протеины, кодируемые митохондриальной ДНК [2, 3], однако показал отсутствие видов *V. gallina* и *S. inaequivalis* в базе данных и отсутствие соответствующих записей для *F. ponticus* и *M. lineatus* (табл. 2).

Таблица 2. Полнота секвенирования геномов некоторых двустворчатых моллюсков

| Представитель | Геномная последовательность | Число отдельных нуклеотидных последовательностей | Число отдельных белковых последовательностей |
|----------------------------------|--|--|--|
| <i>Flexopecten ponticus</i> | - | - | - |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | размер 1282,21 Mb, аннотировано 78735 белков | 193150 | 88666 |
| <i>Mytilaster lineatus</i> | - | - | - |

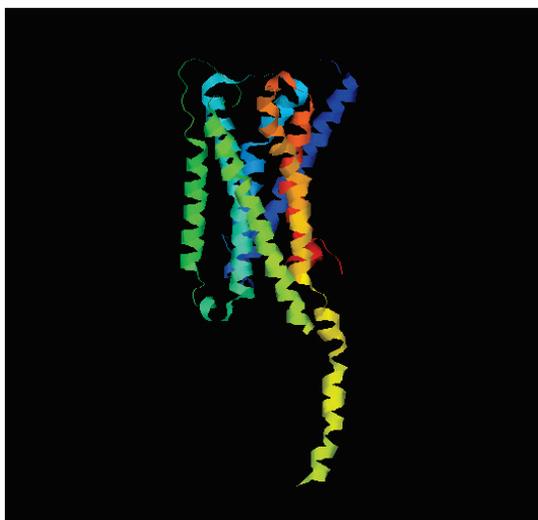
Анализ генома *M. galloprovincialis* позволил обнаружить семейство опсино-подобных генов и кодируемых ими белков, таких как опсин VDI10904.1 чувствительный к синему свету, с-опсин DI28031.1 и два г-опсина VDI13979.1 и VDI13980.1 с длинами 617 и 1004 аминокислотных остатка, соответственно, а также связанные с G-протеинами рецепторы VDI53257.1, VDI36357.1 и VDI24247.1, включающие по семь типичных для опсинов трансмембранных α -спиралей (табл. 3).

Таблица 3. Семейство опсино-подобных белков из средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis*

| № | Идентификатор | Название белка | Длина полипептида, aa |
|---|---------------|-------------------------------------|-----------------------|
| 1 | VDI10904.1 | чувствительный к синему свету опсин | 385 |
| 2 | VDI28031.1 | с-опсин | 441 |
| 3 | VDI13979.1 | г-опсин | 617 |
| 4 | VDI13980.1 | г-опсин | 1004 |

Для углублённой аннотации чувствительного к синему свету опсина VDI10904.1 было проведено сворачивание первичной аминокислотной последовательности белка в его функциональную третичную структуру. 3D-модель была построена по единственному шаблону 4iag с покрытием 77% (рис. 1а). Докинг ретиналя продемонстрировал типичное положение этого полиенового хромофора внутри канала опсина (рис. 1б) с высоким абсолютным значением свободной энергии Гиббса $\Delta G = -8,06$ ккал/моль.

а



б



Рисунок 1. Результаты фолдинга (а) и докинга ретиналя (б) с чувствительным к голубому свету опсином VDI10904.1 из *M. galloprovincialis*, а – радужная окраска опсина, б – белая молекула ретиналя внутри канала

Используя эксперименты по освещению 5 видов двустворчатых моллюсков, обитающих в Чёрном море, лазерами красного, зелёного и синего цветов совместно с биоинформационным анализом, удалось теоретически связать наблюдаемое смыкание створок мидии *M. galloprovincialis* при воздействии сине-фиолетовым лазером на края мантии животного с присутствием в геноме этого моллюска гена, который кодирует чувствительный к синему свету опсин VDI10904.1. Следует отметить секвенциальные гомологии и функциональное сходство этого белка с соответствующими протеинами, например, опсином RDD42761.1 из трихоплекса *Trichoplax* sp. H2 [1] и опсином AFK83789.1 из гребневика *Mnemiopsis leidyi* (A. Agassiz, 1865) [1,4,5], предположительно обуславливающих реакцию этих животных на синий свет. Формулируется гипотеза о наличии чувствительных к

синему свету опсинов у *M. lineatus* и *F. ponticus*, а также об их отсутствии у *V. gallina* и *S. inaequalis*.

Сходство механизмов световосприятия на уровне фоторецепции у столь отдалённых таксонов морских животных как тип *Placozoa*, тип *Ctenophora* и тип Mollusca (класс Bivalvia) указывает на адаптивный характер эволюции зрительных систем у морских организмов, обусловленный наибольшей проникающей способностью сине-фиолетового света в толщу воды.

1. Хавронюк и др. Присваивание функций опсином трихоплаксов *Trichoplax adhaerens* и *Trichoplax* sp. H2 // Актуальные вопросы биологической физики и химии, 2021, т. 6, № 4, с. 686-694.

2. Venetis et al. A mitochondrial genome with a reversed transmission route in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* // Gene, 2007, vol. 406, no. 1-2, pp. 79-90.

3. Gerdol et al. Massive gene presence-absence variation shapes an open pan-genome in the Mediterranean mussel // Genome Biol., 2020, vol. 21, no. 1, p. 275.

4. Schnitzler et al. Genomic organization, evolution, and expression of photoprotein and opsin genes in *Mnemiopsis leidyi*: a new view of ctenophore photocytes // BMC Biol., 2012, vol. 10, p. 107.

5. Сергеева и др. Опсины гребневика *Mnemiopsis leidyi* и сеть белок-белковых взаимодействий // Актуальные вопросы биологической физики и химии, 2022, том 7, № 2, с. 222-229.

ЭКО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРЕСС-УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ, КАК СТРАТЕГИЯ И ТАКТИКА: СУПЕРМОЛЕКУЛЯРНО-ПРОТЕОМНОГО, МОРФО-ДИНАМИЧЕСКОГО ДИЗАЙНА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

Eco-Genetic Stress-Resistance of Plants as Strategy and Tactics: Supermolecular-Proteomic, Morpho-Dynamic Design of Physico-Chemical Nature of Developmental Biology

Иванова Э.А.

Уфимский институт биологии РАН, УФИЦ УИБ РАН, г. Уфа, fiona_belobor@mail.ru

В монографии [1] с восхищением описано, как решаются в мире растений многие проблемы из области экологии, энергетики, передачи информации и так далее. Эти проблемы, выполняемые растениями, рассматриваются в качестве модельных систем, по выражению автора [1]: «лучшими, в мире инженерами». Они эффективны, экологически безупречны и одновременно просты. Человек учится у растений, постигает их способы и методы в решении уже своих проблем.

Молекулярная физико-химия, занимающаяся строением и свойствами биологически функциональных молекул и атомно-молекулярным истолкованием явлений жизнедеятельности, за короткое время стала широко развитой наукой, активно делающей шаги навстречу возрастающей сложности изучения запрограммированных супрамолекулярных систем, вплоть до экосистем [2,3].

Идеальным модельным объектом, в этом случае, являются коллекционные семена ВИРа, преобразованные селекционерами из яровой пшеницы в озимую и из последней, вновь в яровую. Экспериментальный биохимический подход заключался: в выделении из клеточных ядер тотальной хроматиновой матрицы (ТХМ) супра-структур: Нп-лабильного нуклеоплазменного хроматина, Хр-I, Хр-II хроматинов соответственно непрочно- и прочносвязанных с ядерным матриксом (ЯМ) и самого ЯМ, из которых были выделены супермолекулярные ансамбли: «линкерных», «коровых» гистонов и негистонов.

Показан алгоритм особенностей биологической специфичности морфогенеза и структурной устойчивости генетико-протеомной основы ТХМ модельной системы, коллекционных зародышей семян пшеницы, в процессе их органоспецифического, координированно-закономерного роста при переключении подпрограмм развития, где происходит изменение протеомного позиционирования в супермолекулярных ансамблях: линкерных, «коровых» и «негистоновых» белков в разных генетических подсистемах (мезокотиль, корень, высококодифференцированный зародыш), соответственно: донор (яровой)→ переведен в озимый (донор озимый-фенотип)→переведен вновь в яровой-фенотип.

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.

1. Патури Ф. Растения – гениальные инженеры природы (перевод с немецкого Ю.И. Куколёва). Москва. Издательство «Прогресс», 1982, 271 с.

2. Том Р. Структурная устойчивость и морфогенез. М.: Логос, 2002, с. 117.

3. Лен Ж.М. Супрамолекулярная химия. Новосибирск, «Наука», 1998, 334 с.

ВЛИЯНИЕ $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ *CHLORELLA VULGARIS* ПРИ РАЗЛИЧНОМ СОДЕРЖАНИИ В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ ИСТОЧНИКА АЗОТА – KNO_3
Effect of $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ on a Status of *Chlorella vulgaris* Culture Cells under the different Content of Nitrogen Source – KNO_3 in the Nutrient Medium

Ильючик И.А., Захаревич Л.О., Никандров В.Н.

Полесский государственный университет, г. Пинск, Республика Беларусь, *irina.iliuchik@mail.ru*

В настоящее время в мировом масштабе достаточно остро стоит проблема поиска альтернативных источников белка [1, 2]. К ним относят и одноклеточные водоросли, в том числе хлореллу (*Chlorella*). Это диктует необходимость изыскания путей обогащения биомассы хлореллы белком, в том числе изменяя состав питательной среды. Кроме того, одноклеточные водоросли участвуют в биологической очистке вод естественных водоемов. Все это вызывает необходимость исследования влияния на культуру хлореллы ряда микроэлементов, которые при превышении определенной концентрации оказывают и токсическое действие. Таковым, в частности, является хром (III). Cr (III) менее токсичен чем Cr (VI) и является необходимым для жизни микроэлементом. Однако точно значение его установлено лишь в отношении метаболизма человека. Суточная потребность в хrome организма взрослого человека составляет 50–200 мкг [3, 4].

Введение в питательную среду $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ в концентрации 10^{-2} М вызвало гибель культуры хлореллы через 3 дня. При концентрациях эффектора 10^{-3} и 10^{-4} М в динамике культивирования (21 день) выявлено угнетение накопления биомассы. Добавление в среду $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М не подавляло развитие культуры, однако урожай биомассы уступал контрольному варианту. Уровень внутриклеточного белка во всех случаях уступал таковому контрольного варианта питательной среды. Динамика фотосинтетических пигментов – хлорофиллов *a* и *b*, а также каротиноидов носила колебательный характер.

При исключении из питательной среды источника азота (в контрольном варианте концентрация KNO_3 – 5,0 г/л) культура хлореллы оставалась жизнеспособной в течение 21 дня. Однако концентрация биомассы и уровень внутриклеточного белка заметно снижались.

Внесение в питательную среду соли хрома в концентрации 10^{-7} и 10^{-8} М и источника азота – KNO_3 в концентрации 5,5 г/л сопровождалось повышением урожая биомассы в сравнении с полным контролем. Увеличение концентрации $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ угнетало рост культуры, несмотря на обогащение источником азота. Подобная картина отмечена также в отношении уровня внутриклеточного белка и фотосинтетических пигментов. Складывается впечатление, что в условиях повышенного содержания в среде азота культура быстрее старела.

Добавление $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-8} М и увеличение концентрации KNO_3 до 5,5 и 6,0 г/л, в целом, сопровождалось большим накоплением внутриклеточного белка по сравнению с контролем, за исключением варианта с концентрацией хрома 10^{-4} М и источника азота 5,5 г/л.

В первые сутки роста культуры при концентрации источника азота 6,0 г/л отмечена более интенсивная динамика накопления белка по сравнению с контролем, чем в образцах с той же концентрацией соли хрома, но содержанием азота 5,5 г/л.

Динамика уровня фотосинтетических пигментов – хлорофилла *a* и *b*, а также каротиноидов имела сложный колебательный характер. В вариантах питательной среды с концентрацией сульфата хрома 10^{-7} и 10^{-8} М и уровнем источника азота 5,5 г/л, в целом, отмечена положительная динамика накопления хлорофиллов по сравнению с контролем. При содержании в среде источника азота 6,0 г/л в первые сутки роста культуры наблюдался интенсивный прирост концентрации хлорофиллов по отношению к контролю. Однако, начиная с 11 суток, уровень пигментов снижался.

При исключении из состава питательной среды источника азота стабильно наблюдали более высокий уровень накопления каротиноидов по сравнению с остальными вариантами. Возможно, это могло являться отражением реакции клеток хлореллы на стресс, связанный с отсутствием в среде источника азота. В вариантах питательной среды с содержанием сульфата хрома 10^{-4} и 10^{-5} М и повышенным на 10 или 20% уровнем азотистого питания выявлена отрицательная динамика накопления каротиноидов по сравнению с полным контролем. При концентрации в питательной среде сульфата хрома 10^{-6} – 10^{-8} М внутриклеточный уровень каротиноидов превышал таковой контрольного варианта.

1. Suman G. Single cell protein production: A review // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 2015, vol. 4, no. 9, pp. 251-262.

2. Загоровская В. Новый белок. Готов ли российский рынок к альтернативным кормовым белкам // Агротехника и технологии, 2020, № 1, с. 50-54.

3. Гудман М. Органические молекулы в действии. М.: Мир, 1977, 336 с.

4. Реутин С.В. Роль хрома в организме человека // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности, 2009, № 4, с. 50-55.

ОПИСАНИЕ СЕМЕЙСТВА КАТИОННЫХ TRPA1-КАНАЛОВ *TRICHOPLAX ADHAERENS*
Description of *Trichoplax adhaerens* cationic TRPA1-channel family

Фадеева М.В.¹, Курченко В.М.¹, Кузнецов А.В.^{1,2}

¹ Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ

² Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь, РФ, *kuznet61@gmail.com*

В трихоплаксе *Trichoplax* sp. H2 обнаружено обширное семейство катионных TRP-каналов, отличающихся длиной анкириновых спиралей. Выделено 3 обособленных кластера белков по этому признаку: с короткими, средними и длинными анкириновыми стролирующими спиральями, что может указывать на их разные функции [1]. Интересно, существуют ли подобные белки у *Trichoplax adhaerens*?

Применяли методы, подробно описанные в оригинальной статье [1]. Поиск гомологов TRP-каналов в геноме *Trichoplax adhaerens* [2] осуществляли по аминокислотной последовательности NompC-механорецептора *D. melanogaster* [3]. Для дальнейшего анализа выбрали протеины с не менее 30% покрытия.

Было идентифицировано 17 катионных TRP-каналов с низкой вероятностью ошибочного предсказания E от $2e^{-39}$ до $9e^{-13}$ (табл. 1). В отобранных белках определяли количество анкириновых повторов. Размах длин полипептидных цепей TRP-протеинов внутри выборки варьировал от 139 до 868 аа, а число анкириновых повторов – от 3 до 11.

Таблица 1. Семейство катионных каналов переходного рецепторного потенциала подсемейства A1 (TRPA1) из *Trichoplax adhaerens*

| № | Идентификатор | Макс. счёт | Тот. счёт | Покрывтие запроса, % | Ожидание, значение E | Идентичность, % | Длина, аа | Анкириновые повторы |
|----|--------------------------------|------------|-----------|----------------------|----------------------|-----------------|-----------|---------------------|
| 1 | XP_002112601.1 | 150 | 448 | 56 | 2e-39 | 30,95 | 382 | 11 |
| 2 | XP_002112603.1 | 111 | 598 | 59 | 1e-25 | 25,53 | 476 | 11 |
| 3 | XP_002109670.1 | 97,1 | 317 | 56 | 7e-21 | 25,15 | 487 | 10 |
| 4 | XP_002109738.1 | 84,7 | 330 | 46 | 9e-19 | 27,93 | 186 | 5 |
| 5 | XP_002111544.1 | 86,7 | 396 | 53 | 4e-18 | 31,43 | 356 | 5 |
| 6 | XP_002107957.1 | 77,8 | 408 | 38 | 8e-17 | 39,02 | 139 | 3 |
| 7 | XP_002115566.1 | 77,8 | 226 | 29 | 3e-15 | 34,76 | 322 | 5 |
| 8 | XP_002108424.1 | 79,3 | 309 | 37 | 3e-15 | 28,83 | 489 | 7 |
| 9 | XP_002107840.1 | 80,5 | 203 | 56 | 3e-15 | 24,23 | 988 | 10 |
| 10 | XP_002111405.1 | 77,4 | 421 | 53 | 6e-15 | 24,67 | 357 | 9 |
| 11 | XP_002109164.1 | 79,0 | 449 | 49 | 7e-15 | 28,91 | 868 | 6 |
| 12 | XP_002118536.1 | 73,6 | 420 | 43 | 8e-15 | 26,67 | 188 | 5 |
| 13 | XP_002113319.1 | 72,0 | 367 | 56 | 6e-14 | 26,99 | 235 | 6 |
| 14 | XP_002112609.1 | 68,6 | 298 | 43 | 2e-13 | 32,47 | 163 | 5 |
| 15 | XP_002116175.1 | 67,4 | 489 | 44 | 5e-13 | 33,93 | 159 | 4 |
| 16 | XP_002113774.1 | 70,5 | 202 | 24 | 8e-13 | 35,34 | 325 | 3 |
| 17 | XP_002112607.1 | 66,2 | 212 | 29 | 9e-13 | 32,59 | 141 | 4 |

Примечание: серым цветом выделены протеины с наилучшим счётом, а также наименьшей и наибольшей длиной полипептидной цепи

Статистический анализ выборки выявил, что средняя длина аминокислотной последовательности TRPA1-канала *T. adhaerens* составляет $368,3 \pm 174,2$ аа и включает $6,4 \pm 2,3$ анкириновых повтора. Результат расчёта корреляции Пирсона показал, что существует значительная положительная связь между длиной аминокислотной цепи (X) и числом анкириновых повторов в цепи (Y): $r(15) = 0,558$, $p = 0,020$. Далее, были проведены регрессионный и кластерный анализы выборки (рис. 1). Обнаружено 3 кластера, обозначенных как «малые» (зелёный), «средние» (красный) и «большие» (голубой) катионные TRPA1-каналы с координатами центров (173, 5), (399,8) и (928,8), соответственно (рис. 1б), где первая цифра обозначает число аминокислотных остатков, а вторая – число анкириновых повторов.

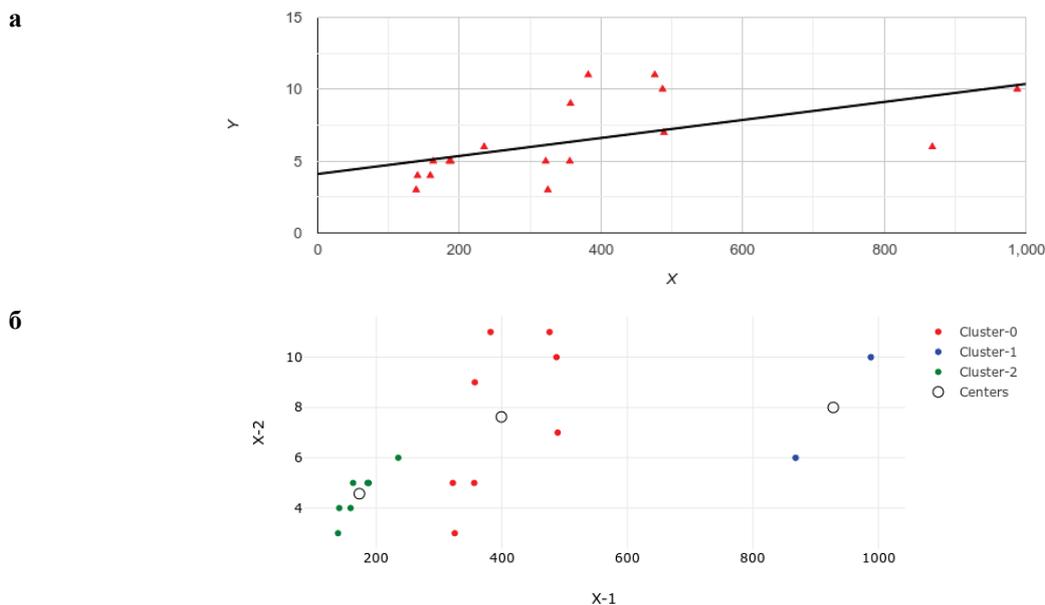


Рисунок 1. Анализ семейства катионных TRPA1-каналов из *T. adhaerens*, линейная регрессия (а) и кластерный анализ (б) зависимости: число анкириновых повторов (Y) от числа аминокислотных остатков (X), объяснения в тексте

В целом, данные по TRPA1-каналам *T. adhaerens* хорошо согласуются с результатами, полученными [1] на *Trichoplax* sp. H2, касательно выявления 3 кластеров по длине полипептидной цепи механочувствительных рецепторов TRP-типа, а именно: «малые», «средние» и «большие» катионные TRPA1-каналы. Следует отметить, что TRPA1-каналы *T. adhaerens* короче, чем у *Trichoplax* sp. H2 – $368,3 \pm 174,2$ aa против $1215,5 \pm 219,1$ aa, а также, имеют значительно меньше анкириновых повторов – $6,4 \pm 2,3$ против $15,2 \pm 3,1$. Кроме того, белки *T. adhaerens* больше отличаются от NompC-механорецептора *D. melanogaster*, чем соответствующие белки *Trichoplax* sp. H2, что позволяет говорить о существенных различиях в восприятии механического окружения у этих крипточеских видов животных.

1. Фадеева М.В., Сергеева Е.В., Рыбакова К.А., Кузнецов А.В. Характеристика семейства катионных TRPA1-каналов *Trichoplax* sp. H2 (Placozoa) // Актуальные вопросы биологической физики и химии, 2022, т. 7, № 3, с. 493-500.

2. Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam N.H. et al. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans // Nature, 2008, vol. 454, no. 7207, pp. 955-960.

3. Jin P., Bulkley D., Guo Y., Zhang W., Guo Z., Huynh W., Wu S., Meltzer S., Cheng T., Jan L.Y., Jan Y.N., Cheng Y. Electron cryo-microscopy structure of the mechanotransduction channel NOMPC // Nature, 2017, vol. 547, no. 7661, pp. 118-122.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА ВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ Use of Algae Delayed Chlorophyll Fluorescence for Pollution Biotesting

Маторин Д.Н.¹, Яковлева О.В.¹, Тодоренко Д.А.¹, Горячев С.Н.², Алексеев А.А.¹

¹Московский государственный университет, г. Москва, РФ

²Северо-Восточный федеральный университет им. М.К.Аммосова, г. Якутск, РФ, atorin@biophys.msu.ru

Отработаны научно-методологические подходы по использованию регистрации замедленной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла в биотестировании различных загрязнений. Проведенные многочисленные токсикологические эксперименты с тяжелыми металлами, гербицидами, полиароматическими углеводородами (ПАУ), ПАВ, органическими пестицидами и др. показали, что снижение относительного выхода ЗФ и соотношения индукционного максимума к стационарному значению являются одной из первичных неспецифических реакций водорослей на воздействие токсикантов. При использовании интенсивной культуры хлореллы присутствие в среде веществ в токсических концентрациях достоверно обнаруживается по ЗФ уже в первые 3-4 часа эксперимента. Это может быть использовано для экспрессной оценки степени токсичности и пределов токсических концентраций различных загрязнителей.

Наиболее чувствительны водоросли были к действию солей тяжелых металлов, гербицидов,

оловоорганических соединений. Как показали результаты пробит-анализа, токсичность веществ указанных групп для водорослей возрастала в следующей последовательности: цинк < свинец < кадмий < ТПОХ < DCMU < хром < медь < ртуть. Экспериментально установленные максимальные концентрации веществ, не оказывавшие достоверного действия как на интенсивную культуру хлореллы (по ЗФ) в суточных опытах, так и на стандартную культуру хлореллы в хронических опытах продолжительностью 10-25 суток показали близкое соответствие результатов.

1. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Венедиктов П.С., Рубин А.Б. Замедленная флуоресценция растений и водорослей. Теоретические и практические аспекты. М. Изд-во Альтрекс, 2011, 202 с.
2. Маторин Д.Н., Яковлева О.В. Фотолюминесценция растений. М.: Изд-во Альтекс, 2019, 256 с.
3. Григорьев Ю.С., Власова Е.С. Методика определения токсичности питьевых, природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению относительного показателя замедленной флуоресценции культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer). Москва, 2009.

ВЛИЯЮТ ЛИ ЗАРОСЛИ ТРОСТНИКА *PHRAGMITES AUSTRALIS* (CAV.) TRIN. EX STEUD. НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЗООПЛАНКТОНА В ГИПЕРСОЛЕНОМ ОЗЕРЕ МОЙНАКИ (КРЫМ)?

Do Reed Thickets *Phragmites Australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. Affect the Distribution of Zooplankton in The Hypersaline Lake Moynaki (Crimea)?

Мягченко Р.О.¹, Ануфриева Е.В.², Яковенко В.А.², Шадрин Н.В.²

¹ Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ

² Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь, РФ, lana_anufrieva@mail.ru

Пространственная неоднородность распределения зоопланктона – важный параметр его структуры, определяющий, как показано во многих исследованиях, эффективность функционирования и устойчивость водных экосистем. Причины неоднородности видовых популяций могут быть как внешние, так и внутрипопуляционные. При моделировании небольших озер часто делают допущение о пространственной гомогенности распределения в них планктона. Однако накапливаются данные, что такое допущение не является адекватным и делает модели далекими от реальности. На примере небольшого гиперсоленого озера Мойнаки рассмотрим влияние зарослей тростника на распределение зоопланктона. Озеро расположено на окраине г. Евпатория, его длина составляет 1,85 км, площадь – 1,76 км², глубина варьирует от 0,5 до 1,0 м. Ранее было показано, что заросли морской травы *Ruppia maritima* L. существенно влияют на распределение зоопланктона в озере [1-4]. Вдоль берега озера на большом протяжении в воду заходят заросли тростника *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., поэтому целью исследования было определить, влияют ли они на зоопланктон. Для этого стандартными методами были отобраны количественные пробы зоопланктона в зарослях тростника (две повторности, соленость 45 г/л) и в чистой воде без зарослей растительности (две повторности, соленость 52 г/л). Обработка проб дала следующий результат (табл. 1).

Таблица 1. Показатели зоопланктона в двух точках гиперсоленого озера Мойнаки (Крым)

| Группа организмов | Заросли тростника | | Вне зарослей (чистая вода) | |
|---------------------|---|----------------------|---|----------------------|
| | Среднее значение численности, экз./м ³ | Коэффициент вариации | Среднее значение численности, экз./м ³ | Коэффициент вариации |
| Cladocera (самец) | - | - | 250 | 0,849 |
| Cladocera (самка) | 1000 | 1,273 | 63925 | 0,337 |
| Amphipoda | 20050 | 0,138 | 250 | 0,849 |
| Haracticoida | 350 | - | 25 | - |
| Ostracoda | 31200 | 0,227 | 450 | 0,786 |
| Bivalvia | - | - | 50 | - |
| Foraminifera | 1550 | 0,319 | - | - |
| Gastropoda | 1150 | 1,291 | - | - |
| Ephippium Cladocera | 500 | 0,566 | - | - |
| Arachnids | 50 | - | - | - |
| Весь зоопланктон | 55850 | 0,156 | 64950 | 0,337 |

Как видно из таблицы 1, в зарослях тростника меняется как общая численность зоопланктона, так и вклад в нее отдельных таксонов животных. В популяции самого массового вида кладоцеры *Moina salina* Daday, 1888 существенно меняется также половозрастная структура. В зарослях тростника выше численность крупнотельных гаммарусов *Gammarus aequicauda* (Martynov, 1931), а вне зарослей кладоцеры *M. salina*. Обратная зависимость между численностью этих двух видов объясняется тем, что *G. aequicauda*, интенсивно поедая *M. salina*, подавляет развитие ее популяции [2]. В дальнейших исследованиях предстоит выяснить, какие факторы обуславливают более высокую численность гаммарусов в зарослях тростника. Полученные результаты являются еще одним подтверждением того, что нельзя моделировать экосистемы таких озер, как системы с однородным распределением зоопланктона.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания ФИЦ ИнБЮМ «Изучение особенностей структуры и динамики экосистем соленых озер и лагун в условиях климатической изменчивости и антропогенной нагрузки для создания научных основ их рационального использования» (№ 121041500203-3).

1. Shadrin N., Yakovenko V., Anufrieva E. Suppression of *Artemia* spp. (Crustacea, Anostraca) populations by predators in the Crimean hypersaline lakes: A review of the evidence // *International Review of Hydrobiology*, 2019, vol. 104, iss. 1-2, pp. 5-13, doi: 10.1002/iroh.201801966.

2. Shadrin N., Yakovenko V., Anufrieva E. *Gammarus aequicauda* and *Moina salina* in the Crimean saline waters: New experimental and field data on their trophic relation // *Aquaculture Research*, 2020, vol. 51, iss. 8, pp. 3091-3099, doi: 10.1111/are.14643.

3. Shadrin N., Yakovenko V., Anufrieva E. Behavior of *Gammarus aequicauda* (Crustacea, Amphipoda) during predation on *Artemia* (Crustacea, Anostraca): New experimental results // *International Review of Hydrobiology*, 2020, vol. 105, iss. 5-6, pp. 143-150, doi: 10.1002/iroh.202002059.

4. Shadrin N., Yakovenko V., Anufrieva E. Can *Gammarus aequicauda* (Amphipoda) suppress a population of *Baeotendipes noctivagus* (Chironomidae) in a hypersaline lake? A case of Lake Moynaki (Crimea) // *Aquaculture Research*, 2021, vol. 52, iss. 4, pp. 1705-1714, doi: 10.1111/are.15024.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМ ОРГАНИЗМА СЕВЕРНЫХ ОЛЕНЕЙ РАЗЛИЧНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОН

Physiological Features of Reindeer Body Systems in Various Climatic Zones

Олешкевич А.А., Комарова С.А., Федоров В.И.

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии, МВА им. К.И. Скрябина,
г. Москва, РФ, kaffizmgavmib@mail.ru

Начата реализация программы государственной поддержки традиционной хозяйственной деятельности народов Севера, которая базируется на традиционных отраслях животноводства, а именно — северном домашнем оленеводстве. Продукция северного оленеводства считается экологически безопасной. Однако особенности физиологических систем северных домашних оленей в Республике Саха (Якутия) до сих пор изучены недостаточно. Нами проведены исследования физиологии репродукции северных домашних оленей (морфофизиологии системы, физиологии полового цикла, полового сезона, беременности, родов и послеродового периода) и биофизических особенностей производных кожи в зависимости от природно-климатической зоны обитания: горно-таежной, тундровой и лесотундровой зон Якутии. Группы были сформированы по принципу физиологических аналогов: из горно-таежной зоны – 350, из тундровой и лесотундровой зон – 380 животных.

Установлено, что домашние олени горно-таежной и тундровой зон относятся к лептосомному типу. Физиологические показатели роста и развития оленей разных зонах разнятся. Так, животные горно-таежной зоны крупнее оленей тундры. Наблюдения показали, что в тундровой, лесотундровой и горно-таежной зонах сроки отела и полового сезона существенно разнятся. Достоверных различий в структуре половых органов при половом цикле у самок горно-таежной и тундровой природно-климатических зон разведения не выявлено. У самок всех зон обитания за сутки до отела хорошо выражены предвестники родов (отёк вымени, появление молозива и т.п.).

Для определения наличия тяжёлых металлов и для измерения редокс-потенциалов щелочных гидролизатов волос/шерсти северного оленя различных северных зон были взяты образцы с разных участков тела животных (от самцов, самок и детёнышей). В результате исследований 100 образцов от физиологических аналогов не было выявлено достоверных различий в толщине, прочности, окраске волос, в значениях редокс-потенциалов волос оленей горно-таежной и тундровой. Потенциал раствора при инкубации в темноте находился в диапазоне 55-57 мВ, при облучении видимым светом диапазоне составлял 50-53 мВ, а затем при инкубации в темноте возвращался к исходным темновым значениям. У детёнышей значения редокс-потенциалов не имели отличий от взрослых особей.

1. Новиков В.Э., Комарова С.А. Патент на полезную модель № 171788 «Устройство для определения параметров фоторедокс-эффекта в щелочных растворах кератинов», 2016.

2. Oleshkevich A.A., Komarova S.A., Guseynikova A.A., Yarygina E.I. Laboratory examination technique for animal skin derivatives (hair, wool, fluff) // RADConferenceProceedings, vol. 4, pp. 95-100, doi: 10.21175/RadProc.2020.20.

ВЛИЯНИЕ НЕФТЯНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЧЕРНОМОРСКОЙ МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

Effect of Petroleum Hydrocarbons on Biochemical Parameters of Mussel *Mytilus galloprovincialis*

Скуратовская Е.Н.^{1,3}, Алемова А.С.², Сербин А.Д.³

¹ Институт биологии южных морей имени А.О.Ковалевского РАН, г. Севастополь, РФ, skuratovskaya@ibss-ras.ru

² Воронежский государственный университет, г. Воронеж, РФ

³ Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ

В современных условиях продукты переработки нефти являются типичными органическими токсикантами, загрязняющими воды Мирового океана. Механизмы воздействия нефтепродуктов на морские организмы в последнее время привлекают все больше внимания в связи с участвовавшими случаями нефтяных разливов в результате аварий. При оценке токсического действия нефтяных углеводородов на состояние бентосных организмов наиболее часто используют двустворчатых моллюсков семейства митилид - мидий (северные и дальневосточные моря, Черное море). По показателю выживаемости мидия обладает высокой токсикорезистентностью ко многим типам загрязнения. Наряду с этим, пороговая чувствительность по некоторым биохимическим параметрам и физиологической активности моллюска находится на уровне ПДК вещества для водных объектов рыбохозяйственного значения. Широкая распространенность и низкая смертность при изменении абиотических факторов позволяют легко добывать экспериментальный материал и содержать мидий в лабораторных условиях. В то же время повышенная чувствительность физиологических функций к действию токсикантов дает возможность с большой точностью определять пригодность водной среды для жизнедеятельности моллюсков [1,2].

В настоящей работе было исследовано влияние нефтяных углеводородов (НУ) на некоторые биохимические параметры гепатопанкреаса черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* в эксперименте.

Моллюсков собирали в летний период 2020 г. с коллекторов мидийно - устричной фермы в акватории бухты Карантинная (г. Севастополь). В районе фермы концентрация НУ соответствовала среднему значению для открытых районов Черного моря. Размер животных варьировал от 50 до 60 мм. Мидий очищали от обрастаний и акклимировали к лабораторным условиям в течение 7 дней в аквариумах с очищенной водой, постоянной аэрацией при температуре 20°C. Животных содержали в аквариумах из расчета 5 л на одну особь. Ежедневно до эксперимента осуществлялась частичная смена воды. Кормление мидий не производилось, чтобы избежать специфического действия пищи. В аквариумы объемом 40 л добавили дизельное топливо (ДТ) «Летнее», используемое для морского транспорта в прибрежных акваториях г. Севастополя. Воздействующая на мидий концентрация ДТ в воде аквариумов составила 0,5 мг/л (10 ПДК) и 1 мг/л (20 ПДК). Выбор концентраций ДТ был обусловлен тем, что в летний период в некоторых районах севавтопольской акватории содержание НУ в воде достигает 0,5 мг/л (10 ПДК) и выше [2]. Продолжительность эксперимента составила 5 суток. Отбор экспериментальных животных осуществлялся на 3-е и 5-е сутки. Эксперименты проводили в двух повторностях. В гепатопанкреасе моллюсков анализировали комплекс биохимических параметров: уровень окислительной модификации белков (ОМБ) и перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ)), аминотрансфераз (аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаргатаминотрансферазы (АСТ)), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ).

Во время эксперимента мидии проявляли высокую резистентность к краткосрочному воздействию НУ. В течение всего эксперимента выживаемость животных составляла 100%. Содержание продуктов ПОЛ в гепатопанкреасе мидий во всех экспериментальных группах было достоверно выше по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Активность СОД при концентрации 1 мг/л на 5-е сутки была достоверно выше, чем в контроле и у экземпляров 1-й экспериментальной группы (0,5 мг/л) ($p < 0,05$). Для КАТ отмечено достоверное снижение активности на 5-е сутки во 2-й экспериментальной группе (1 мг/л) по сравнению с контролем и 1-й экспериментальной группой (0,5 мг/л) ($p < 0,05$). По содержанию окисленных белков, активности АЛТ, АСТ, ГГТ достоверных различий между экспериментом и контролем не обнаружено.

Таким образом, результаты исследований позволили установить, что НУ при концентрациях 0,5 мг/л и 1 мг/л оказывают влияние на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы гепатопанкреаса мидий: стимулируют интенсификацию процессов перекисного окисления липидов, при концентрации 1 мг/л (20 ПДК) вызывают активацию СОД и ингибирование активности КАТ.

Работа выполнена в рамках темы Государственного задания ФИЦ ИнБЮМ № 121030100028-0, при поддержке РФФИ и г. Севастополя в рамках научного проекта № 18-34-50005 («Наставник»).

1. Sukharenko E.V., Nedzvetsky V.S., Kyrychenko S.V. Biomarkers of metabolism disturbance in bivalve molluscs induced by environmental pollution with processed by-products of oil // *Biosystems Diversity*, vol. 25, no. 2, pp. 113-118.

2. Санитарно-биологические исследования прибрежных акваторий юго-западного Крыма в начале XXI века. Под ред.: О.Г. Миронова, С.В. Алёмова. Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН. Симферополь: ИТ «Ариал», 2018, 276 с.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ТОЛЕРАНТНОСТИ ГИДРОБИОНТОВ К СЕРОВОДОРОДНОМУ ЗАРАЖЕНИЮ

Functional Aspects of Tolerance of Hydrobionts to Hydrobiont Pollution

Солдатов А.А.^{1,2}, Брюханов А.³

¹ ФИЦ Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН», Севастополь, РФ, alekssoldatov@yandex.ru

² Севастопольский государственный университет, Севастополь, РФ

³ Московский государственный университет, Севастополь, РФ

Наличие в толще Черного моря обширной редокс-зоны (зона хемоклина) принципиально отличает его от других акваторий Мирового океана. Для нее характерно сочетание условий острой гипоксии с сероводородным заражением (Подымов, 2005). Зона хемоклина обычно располагается на глубинах 100-150 м. Сходный комплекс условий может возникать и на шельфе (Зайка и др., 2011). Чаще всего это является следствием отсутствия сквозной вертикальной конвекции и образования локальных зон гниения мертвого органического вещества (Орехова, Коновалов, 2018).

Сероводород токсичен для большинства организмов, использующих аэробный тип дыхания. Это определяется его способностью ингибировать цитохром-с-оксидазу дыхательной цепи митохондрий клеток (Cooper, Brown, 2008), переводить гемсодержащие белки (гемоглобин, миоглобин) в сульф-форму, которая исключает связывание и транспорт кислорода (Bagarinao, 1992; Grieshaber, Völkel, 1998). Показана также способность сульфидов ингибировать экспрессию транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией (hypoxic inducible factor, HIF) (Wu et al., 2012). При этом многие организмы проявляют выраженную устойчивость к присутствию сероводорода в воде. Природа устойчивости конца не определена. Обсуждается участие сульфидоокисляющей микрофлоры, поселяющейся на респираторных поверхностях, и ее участие в нейтрализации сероводородной нагрузки (Stewart, Cavanaugh, 2006), способность ряда организмов переводить сульфиды в тиосульфаты (Bagarinao, Vetter, 1993). В ряде работ отмечается присутствие в гемолимфе моллюсков особого транспортного белка, наличие нечувствительных к сероводороду гемоглобинов (Arp, Childress, 1981; Arp, 1983), а также присутствие в эритроцитах ряда видов особых зернистых включений, содержащих гематин, способных окислять сульфиды (Vismann, 1993; Holden et al., 1994).

Особый интерес представляют организмы способные устойчиво существовать в условиях сероводородного заражения и экстремально низких концентраций кислорода. В этом отношении интересен двустворчатый моллюск-вселенец *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) (далее анадара). В условиях эксперимента данный вид показал высокую устойчивость не только к острым формам гипоксии (Isani et al., 1989; Cortesi et al., 1992), но и сероводородной нагрузке (Miyamoto, Iwanaga, 2017; Nakano et al., 2017). Этим объясняется его широкое распространение в проблемных акваториях Черного и Азовского морей (Ревков, 2016).

Исследования, выполненные на данном виде в отделе физиологии животных и биохимии ФИЦ ИнБЮМ, позволили описать участие зернистых включений эритроидных элементов гемолимфы в нейтрализации сероводородной нагрузки (Soldatov et al., 2018). Показано, что сочетанное действие гипоксии и сероводородной нагрузки приводило к увеличению размеров и числа гранулярных включений в эритроцитах анадары и к росту среднечелочного объёма. На фоне выраженного пойкилоцитоза клетки образовывали разные по форме и размеру агрегаты. Существенно возрастало количество эритроцитарных теней на препаратах. На этом фоне наблюдалось поступление в гемолимфу моллюска гранулярных включений, содержащих гематин, которые вступали в реакцию с H₂S с образованием Fe₂S₃, тем самым нейтрализуя токсический эффект сероводорода.

Изучение микрофлоры респираторных поверхностей анадары показало, что в условиях сероводородного заражения она претерпевает ряд качественных изменений. Для анализа филогенетического состава микробных сообществ использовали высокопроизводительное секвенирование фрагментов гена 16S рРНК, содержащих переменный регион V3-V4, с использованием в качестве ПЦР-матрицы тотальной ДНК, выделенной из образцов жабр моллюска. Секвенирование осуществляли на геномном анализаторе MiSeq ("Illumina", США) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3 (600 циклов, чтение с двух концов). Парные пересекающиеся чтения объединяли с помощью программы Flash. Для определения размера кластеров (оперативных таксономических единиц, ОТЕ) в каждом образце, все исходные объединенные чтения накладывались на репрезентативные последовательности ОТЕ с минимальной идентичностью 97% по всей длине с помощью программы Usearch v.11.

Таксономическую классификацию полученных ОТЕ проводили по базе последовательностей 16S рРНК RDP database.

Показано, что ткани жабр моллюсков, подвергнутых гипоксии с внесением H_2S в концентрации 6 мг/л (содержание O_2 в воде 0,1-0,5 мг/л, температура 18-21 °С, рН 8,2, экспозиция 48 ч), содержали гораздо больше бактерий семейства *Arcobacteraceae* (рода *Pseudarcobacter*, *Halarcobacter* и *Arcobacter*) – 79,32% от всех чтений (в 4,5 раза больше по сравнению с гипоксическим вариантом и в 16,2 раза больше по сравнению с нормоксией). Представители семейства *Arcobacteraceae* обитают в различных экотопах, включая морские осадки и водную толщу. Преимущественно микроаэрофилы, ряд видов способен к окислению сульфида.

Работа выполнена при поддержке проекта РФФИ 20-04-00037.

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МИЛЛИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН *GLYCINE MAX L. B* УЛОВИЯХ НЕДОСТАТОЧНОГО ВОДОБЕСПЕЧЕНИЯ

Influence of Low-Intensity Electromagnetic Radiation of a Millimeter Range on the Germination of *Glycine Max* I. Seeds under Conditions of Insufficient Water

Чмелёва С.И., Джелдубаева Э.Р., Чуян Е.Н., Сидякин А.И., Туманянц К.Н.

Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, г. Симферополь, РФ, chmeleva-s@mail.ru

В настоящее время в Республике Крым одним из приоритетных направлений в растениеводстве является изучение механизмов повреждающего действия осмотического стресса, вызванного засухой, а также способов повышения засухоустойчивости сельскохозяйственных культур. Проводится поиск эффективных технологий, действие которых направлено на сохранение водного баланса, увеличение урожая и повышение устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды, в частности к недостаточному водообеспечению. К таким методам можно отнести технологии, действие которых основывается на влиянии физических факторов, например, низкоинтенсивного электромагнитного излучения (ЭМИ) крайне высокой частоты (КВЧ). Применение низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ является простым, дешевым (малое энергопотребление) и экологически безопасным методом воздействия на прорастающие семена и может применяться для регуляции их всхожести.

Цель работы – исследование влияние низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ (длина волны – 7,1 мм; частота излучения – 42,3 ГГц; плотность потока мощности облучения – 0,1 мВт/см²) на энергию прорастания семян *Glycine max L.* в условиях недостаточного водообеспечения.

Семена сои культурной (*Glycine max L.*), сорт Аполлон подвергались воздействию данного физического фактора однократно непосредственно перед посевом, экспозиция 30 минут.

Для моделирования осмотического стресса в кюветы приливали по 300 мл растворов с концентрацией сахарозы – 4,4 %, 7,4 % и 10,5 %, которые создавали осмотическое давление 6, 9 и 12 атмосфер соответственно. В контрольном варианте семена проращивали с добавлением дистиллированной воды. Кюветы помещали в термостат типа ТС–80–М–2 для проращивания, согласно требованиям государственного стандарта для сельскохозяйственных культур 12038–84. Подсчитанное количество проросших семян выражали в процентах к общему числу семян в варианте опыта в каждой повторности, а затем находили энергию прорастания и лабораторную всхожесть, выраженную в процентах к общему количеству семян, взятых для опыта. При определении засухоустойчивости показателем устойчивости является всхожесть семян, чем выше процент прорастания семян в растворе сахарозы, тем более засухоустойчив образец.

Влияние осмотического стресса на *Glycine max L.* начинается на начальном этапе прорастания семян сои, вследствие недостаточного поступления влаги в семена. С повышением осмотического стресса и влиянием его на прорастание семян, показатели энергии прорастания в опытных вариантах значительно снижались, что приводило к уменьшению показателей всхожести при недостаточном водообеспечении, вызванном 7,4 % и 10,5 % сахарозы. Под действием абиотического стрессового фактора интенсивность обмена веществ в семенах значительно снижалась, что оказывало негативное влияние как на прорастание семян, так и на начальные процессы роста и развития проростков сои.

Установлено, что в условиях недостаточного водообеспечения, вызванного сахарозой в концентрации 4,4 % энергия прорастания уменьшается в среднем на 8,0 % по сравнению с контролем. При предпосевном облучении ЭМИ и моделируемом осмотическом стрессе, энергия прорастания составляет 76,0 %, что на 4,0 % выше контроля. Следовательно, можно сделать вывод, что предпосевная обработка *Glycine max L.* повышает засухоустойчивость данной культуры и оказывает адаптогенное действие при осмотическом стрессе.

В результате выполненных исследований показано, что ЭМИ выполняет адаптогенную функцию к воздействию в условиях моделируемого недостаточного водообеспечения на *Glycine max L.* Так, в варианте с 4,4 % сахарозы лабораторная всхожесть семян увеличилась в среднем на 8,0 % по сравнению с контрольным вариантом, в котором семена не облучались ЭМИ КВЧ. При моделируемом осмотическом стрессе с 7,4 % сахарозы показатель лабораторной всхожести семян вырос на 8,5 % относительно семян без воздействия на них излучения.

В основе адаптогенного действия растений к осмотическому стрессу лежат определенные физиологические механизмы, которые запускают реакции обмена веществ и стимулируют прорастание семян. Положительный эффект воздействия низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ на сухие семена исследуемой культуры имеет практическое значение для технологии предпосевной обработки, поскольку не требует предварительного замачивания семян, давая при этом заметное ростовое преимущество.

Таким образом, наши исследования показали, что предварительное облучение семян сои культурной сорта Аполлон низкоинтенсивным электромагнитным излучением ЭМИ КВЧ в заданном диапазоне частот способствовало повышению их посевных качеств. Растения, выращенные из семян, прошедших предпосевное облучение, обладают более высоким потенциалом развития по сравнению с контрольными растениями, что способствует повышению их засухоустойчивости.

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РОДА *DUNALIELLA* ИЗ ГИПЕРСОЛЕННЫХ ОЗЕР КРЫМА

Morphometric Analysis of Microalgae of the Genus *Dunaliella* from Hypersalt Lakes in the Crimea

Шаповалова В.Е., Евстигнеев В.П., Гаджи А.В., Лантушенко А.О.

Севастопольский государственный университет, г. Севастополь, РФ, lantushenko@mail.ru

Dunaliella – род зеленых одноклеточных микроводорослей с огромным экономическим потенциалом за счет продукции большого количества β -каротина, глицерола и других натуральных биологически активных веществ. Физиология клеток этого организма тесно связана с абиотическими факторами. Клетки микроводоросли могут иметь окрас от зеленого до буро-красного. *Dunaliella salina* – галофильный вид микроводоросли, который отличается повышенной толерантностью к экстремальным условиям солености, температуры и освещенности [1]. В условиях сильного стресса представители этого вида могут накапливать >5% β -каротина в сухом состоянии [2].

Dunaliella не имеет клеточной стенки, ее заменяет тонкая эластичная мембрана, поэтому клетки могут менять свой внешний вид в ответ на изменяющиеся факторы окружающей среды. Например, после осмотического шока клетки часто на некоторое время приобретают сферическую форму. Поэтому внутривидовая изменчивость клеток сильно варьируется и может превосходить межвидовую, что представляет трудность в морфометрическом определении принадлежности водоросли к тому или иному виду [3].

В данной работе исследованы микроводоросли рода *Dunaliella*, отобранные из озёр Сасык-Сиваш, Аджиголь, Сакского озера, а также из водоемов близ Мойнакского озера и Сасык-Сиваша. Полевые изоляты были отобраны в августе 2021 года. Предварительный микроскопический анализ проводился на световом микроскопе Leica DM4B, использовалось увеличение $\times 1000$. В пробах из озер Сасык-Сиваш, Саки и водоема у озера Мойнаки преобладали клетки насыщенного бордового цвета, что позволяет, используя классификацию из работы [4], предположить их принадлежность к виду *D. Salina*.

Для выращивания микроводорослей в лаборатории использовалась среда Ben-Amotz с соленостью 120 г/л.

Анализ размерных характеристик проводился с помощью проточного цитофлуориметра с возможностью визуализации FlowCam. С помощью программного обеспечения VisualSpreadsheet5 можно получить до 40 морфометрических параметров для отдельных клеток, анализ которых в совокупности теоретически позволит дать количественную оценку сходства и различия между таксонами разного порядка, а также строить классификаторы для их автоматического разделения в будущем. Количество выявленных объектов в каждой пробе составило порядка 5 тысяч клеток. Было показано, что наиболее мелкоклеточные формы микроводоросли характерны для Сакского озера ($37,5 \pm 12,4$ мкм²), тогда как крупноклеточные формы в основном содержались в пробах из озера Мойнаки ($124,1 \pm 24,6$ мкм²). Для озера Аджиголь характерны клетки, сильно отличающиеся по своей форме и размерам ($87,8 \pm 46,1$ мкм²) (на основе цифровой библиотеки изображений). Далее проводился объективный статистический анализ совокупности наиболее показательных морфометрических параметров в среде R (<https://www.r-project.org>). К наиболее показательным были отнесены параметры с высоким уровнем изменчивости (коэффициент вариации C_v) их значений в пробах - длина, ширина, площадь, объем, округлость, биообъем. Для оценки степени делимости клеток *D. salina* и для построения соответствующей дискриминирующей функции использовался метод линейного дискриминантного анализа (пакет lda). Применяя пошаговый алгоритм построения дискриминантной функции, был установлен наиболее оптимальный набор параметров высокой значимости («importance») - признак округлости и площади (Circularity+Area), – достаточных для разделения (улучшение точности модели менее чем на 1%) совокупности клеток на группы по принадлежности их к тому или иному водоему.

1. Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. К.: Наукова думка, 1973, 244 с.

2. Ben-Amotz A., Avron M. On those factors which determine the massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* // Plant Physiology, 1983, vol. 72, pp. 593-605.

3. Highfield A., Ward A., Pipe R., Schroeder D. Molecular and phylogenetic analysis reveals new diversity of *Dunaliella salina* from hypersaline environments // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom,

2021, vol. 101, no. 1, pp. 27-37.

4. Borowitzka M.A., Siva C.J. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species // *J. Appl. Phycol.*, 2007, vol. 19, pp. 567-590.

МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ ВОДНОЙ СРЕДЫ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ

Model Systems for the Action Estimation of the Water Medium Components on the Biological Objects

Шишкина Л.Н., Дубовик А.С., Козлов М.В., Повх А.Ю., Швыдкий В.О.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН. г. Москва, РФ, shishkina@sky.chph.ras.ru

На состав природной водной среды, представляющей собой сложную многокомпонентную систему, существенно влияет способность различных загрязняющих веществ перемещаться на значительные расстояния от источника загрязнения. К началу XXI столетия был накоплен обширный экспериментальный материал, результаты которого позволили сформулировать представление о том, что неорганические соли и низкомолекулярные органические соединения даже в незначительных концентрациях оказывают влияние на структурное состояние воды и физико-химические свойства мембран биологических объектов [1-4]. Нормальное функционирование сложных систем обусловлено протеканием в них окислительных процессов, которые играют важную роль как в оценке качества природной воды, так и в регуляции метаболизма в биологических системах разной сложности [5,6]. Это вызывает необходимость разработки модельных систем для быстрой оценки воздействия компонентов водной среды на биологические объекты.

В связи с изложенным для оценки воздействия компонентов водной среды на биологические объекты были предложены следующие модельные системы: низкотемпературное спонтанное окисление лецитина в полярной среде, УФ-спектрометрия с математической обработкой спектров по методу Гаусса, спонтанная агрегация лецитина в водной среде и измерение электрофоретических свойств образованных частиц.

Лецитин, представляющий собой смесь природных липидов, среди которых не менее 50% составляют фосфолипиды (ФЛ), использован как модель биологических мембран. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов оценивали по содержанию продуктов окисления, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП). УФ-спектры водных образцов регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 PharmaSpec (Япония) в диапазоне длин волн от 200 до 500 нм. Размер агрегатов лецитина в полярной среде и величину их ξ -потенциала определяли методом рассеяния света, используя Malvern Zetasizer Nano-ZS анализатор (Malvern Instruments Ltd., Великобритания), снабженный He – Ne лазером (4 мВ, 633 нм). Ионы меди и тиофосфат натрия служили модельными соединениями загрязнителей.

Показано, что скорость окисления лецитина зависит от исходной степени его окисленности, а масштаб влияния загрязнителей на процессы окисления лецитина и его способность к агрегации обусловлен исходным уровнем содержания ТБК-АП и составом ФЛ партии лецитина. Аналогичная зависимость нарушения процессов перекисного окисления липидов от исходного состояния параметров физико-химической системы регуляции в органах животных была ранее получена и при поступлении химических токсикантов в организм [7]. Кроме того, установлено, что уменьшение размера агрегатов лецитина сопровождается увеличением содержания гидрофобных соединений в природной воде, а увеличение содержания таких гидрофобных соединений, как более легкоокисляемые фракции ФЛ, кетодиены и жирные кислоты обуславливает появление токсических свойств водной среды.

Совокупность представленных данных и анализ литературы позволяют заключить, что предложенные модельные системы могут быть использованы для экспрессной первичной оценки качества природной воды и прогнозирования последствий ее воздействия на биологические объекты.

1. Ло Ш., Ли В. Наноструктуры в очень разбавленных водных растворах // *Росс. Химический журнал*, 1999, т. 43, № 5, с. 40-48.

2. Бурлакова Е.Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности // *Росс. Химический журнал*, 1999, т. 43, № 5, с. 3-11.

3. Zhernovkov V.R., Roshchina I.A., Zubareva G.M. et al. The Study of Thyrotropin-Releasing Hormone Effect in a Wide Concentration Range on the Aquifer System by IR-Spectroscopy Method // *Water*, 2010, vol. 27, pp. 58-68.

4. Konovalov A.I., Mal'tseva E.L., Ryzhkina I.S. et al. Formation of Nanoassociates is a Factor Determining Physicochemical and Biological Properties of Highly Diluted Solutions // *Doklady Physical Chemistry*, 2014, vol. 456, no. 2, pp. 86-89, doi: 10.1134/S0012501614060050.

5. Shvydkii V.O., Shtamm E.V., Skurlatov Yu.I. et al. Intoxication of the Natural Aqueous Medium Resulting from Disbalance in Redox and Free-Radical Intrabasin Processes // *Russ. J. Phys. Chem. B*, 2017, vol. 11, no. 4, pp. 643-651, doi: 10.1134/S1990793117040248. Membrane Lipid Oxidation. Ed. C. Vigo-Pelfrey. Boston: CRC Press, 1991, vol. III, 300 p.

6. Shishkina L.N., Kozlov M.V., Povch A.Yu., Shvydkii V.O. Role of the Lipid Peroxidation in the Assessment of the Consequences of Exposure to chemical Toxicants on Bio-Objects // *Russ. J. Phys. Chem. B*, 2021, vol. 15, no. 3, pp. 861-867.

Научное издание

**Актуальные вопросы биологической физики и химии
БФФХ – 2022**

Материалы XVII международной научной конференции
(г. Севастополь, 19-23 сентября 2022 г.)

Ответственный за выпуск
Евстигнеев М.П., проф., д-р физ.-мат. наук

Компьютерная верстка: Д.П. Воронин, В.А. Кальпа

Подписано в печать 10.09.2022
Формат 60x84/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman
Усл. печ. л. 26,8. Тираж 60 экз.

Изготовлено с готового оригинал-макета на полиграфической базе
ИП Крыховецкий-Кощеев Александр Андреевич
ОГРНИП 318920400019241
COLOR CITY Цифровая типография
г. Севастополь, ул. Борисова, 4