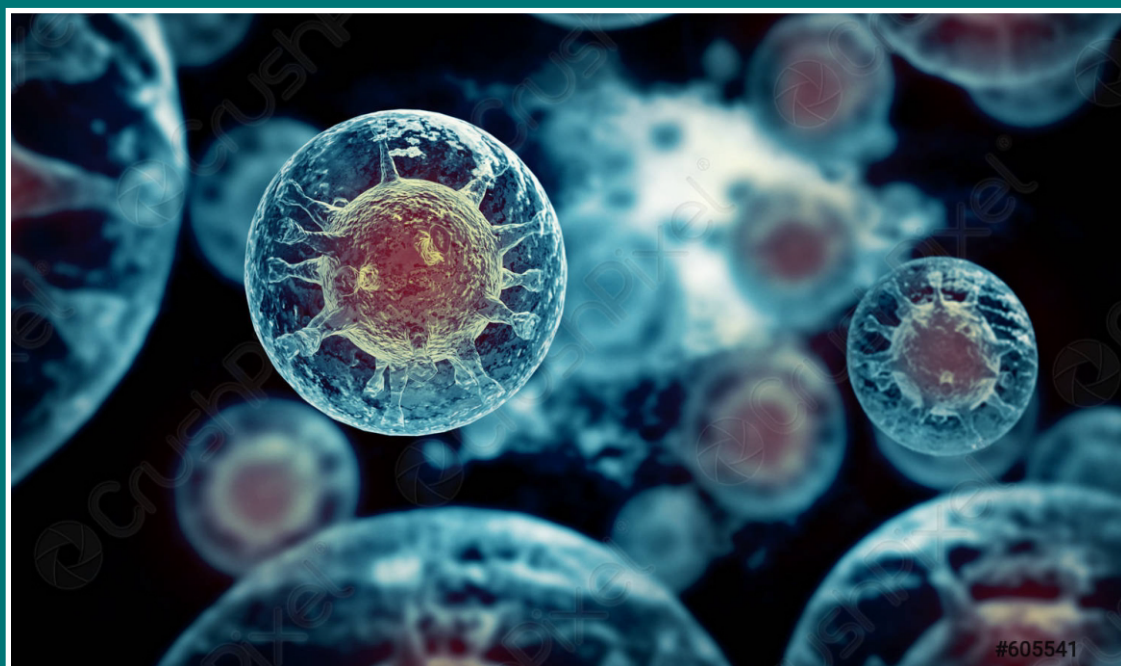


VII Съезд биофизиков России



Сборник научных трудов

Том. 2



17 - 23.04.2023 (г. Краснодар)

Российская академия наук
Отделение биологических наук РАН
Министерство Науки и Высшего Образования
Национальный комитет Российских биофизиков
Кубанский государственный технологический университет
Кубанский государственный университет
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН
Институт аналитического приборостроения РАН
Институт прикладной физики РАН
Институт биофизики клетки РАН
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Организационный комитет

Рубин А.Б., академик РАН –
председатель
Иваницкий Г.Р., член-корр.
РАН – зам. председателя
Фесенко Е.Е., член-корр.
РАН – зам. председателя
Ризниченко Г.Ю., проф.,
д.ф.-м.н. - зам. председателя
Барышев М.Г., проф., д.б.н. -
зам. председателя
Анашкина А.А., к.ф.-м.н. -
ученый секретарь

Аллахвердиев С.И., чл.-корр РАН
Артюхов В.Г., проф., д.б.н.
Белецкий И.П., проф., д.б.н.
Владимиров Ю.А., академик РАН
Воденев В.А., д.б.н.
Волоотовский И.Д., академик НАН
Белоруссии
Гительзон И.И., академик РАН
Грбарник П.Я., проф., д.б.н
Гречкин А.Н., академик РАН
Гурский Г.В., чл.-корр. РАН
Гусев Н.Б., чл.-корр. РАН
Дегерменджи А.Г., академик РАН
Деев С.М., академик РАН

Джимак С.С., к.б.н.
Дорохова А.А., к.ф.-м.н.
Дроздов А.В., к.ф.-м.н.
Есипова Н.Г., к.ф.-м.н.
Кирпичников М.П., академик
РАН
Колчанов Н.А., академик РАН
Комаров В.М., проф., д.б.н.
Кочетков С.Н., академик РАН
Курочкин В.Е., проф., д.т.н.
Макаров А.А., академик РАН
Макеев В.Ю., член-корр. РАН
Моренков О.С., д.б.н.

Нечипуренко Д.Ю., к.ф.-м.н.
Осипов А.А., к.б.н.
Островский М.А., академик РАН
Петрушанко И.Ю., к.ф.-м.н.
Розанов А.Ю., академик РАН
Твердислов В.А., проф., д.ф.-
м.н.
Ткачук В.А., академик РАН
Туманян В.Г., проф., д.ф.-м.н.
Устинин М.Н., д.ф.-м.н.
Фрисман Е.Я., чл.-корр. РАН
Цыганков А.А., д.б.н.
Шайтан К.В., д.ф.-м.н., проф.

Программный комитет

Рубин А.Б., академик РАН –
председатель
Ризниченко Г.Ю., проф.,
д.ф.-м.н. - зам. председателя
Есипова Н.Г., к.ф.-м.н. - зам.
председателя
Анашкина А.А., к.ф.-м.н. -
ученый секретарь

Аллахвердиев С.И., чл.-корр РАН
Антоненко Ю.Н., проф., д.б.н.
Артюхов В.Г., проф., д.б.н.
Беспалова С.В., проф., д.ф.-м.н.
Браже А.Р., к.б.н.
Браже Н.А., к.б.н.
Булычев А.А., проф., д.б.н.
Василевский Ю.В., чл.-корр. РАН
Вихлянцева И.М., д.б.н.
Воденев В.А., д.б.н.
Гвоздев Д.А., к.б.н.
Гельфанд М.С., проф., д.б.н.,
член Academia Europaea
Гудимчук Н.Б., д.ф.-м.н.
Гурия Г.Т., проф., д.ф.-м.н.
Джимак С.С., доцент, к.б.н.
Зинченко В.П., д.ф.-м.н.
Иваницкий Г.Р., чл.-корр. РАН

Коваленко И.Б., д.ф.-м.н.
Кольтовер В.К., проф., д.б.н.
Комаров В.М., д.ф.-м.н.
Кратасюк В.А., д.б.н.
Крупянский Ю.Ф., д.ф.-м.н.
Кучумов А.Г., доцент, д.ф.-м.н.
Лобышев В.И., проф., д.ф.-м.н.
Макеев В.Ю., чл.-корр. РАН
Максимов Г.В., проф., д.б.н.
Максимов Е.Г., к.б.н.
Нечипуренко Ю.Д., д.ф.-м.н.
Никитин П.И., к.ф.-м.н.
Новиков В.В., д.б.н.
Огнева И.В., д.ф.-м.н., проф.
Осипов А.А., к.б.н.
Орлов Ю.Л., д.б.н. проф. РАН
Петрушанко И.Ю., к.ф.-м.н.
Плутахин Г.А., доцент, к.б.н.

Плоснина Т.Ю., к.ф.-м.н.
Погосян С.И., проф., д.б.н.
Постнов Д.Э., проф., д.ф.-м.н.
Розенкранц А.А., д.б.н.
Соболев А.С., чл.-корр. РАН
Соловченко А.Е., д.б.н., проф.
Твердислов В.А., проф., д.ф.-
м.н.
Финкельштейн А.В., чл.-корр.
РАН
Фрисман Е.Я., чл.-корр. РАН
Фурсова П.В., к.ф.-м.н.
Хрущев С.С., к.б.н.
Цатурян А.К., доцент, д.ф.-м.н.
Цыганков А.А., д.б.н.
Шайтан А.К., чл.-корр. РАН
Яковенко Л.В., д.ф.-м.н.

Локальный организационный комитет

Барышев М.Г., профессор РАН, д.б.н. -
председатель
Джимак С.С., к.б.н. – зам. председателя
Дорохова А.А., к.ф.-м.н. - ответственный
секретарь
Ильченко Г.П., к.ф.-м.н.

Лясота О.М.
Кравцов А.А., к.б.н.
Козин С.В., к.б.н.
Текущая Е.Е., к.х.н.
Шашков Д.И., преподаватель

Сдано в набор 30.03.2023. Подписано печать 30.03.2023
Формат 60×84/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный технологический университет»
350072, г. Краснодар, ул. Московская, 2, кор. А
Типография ФГБОУ ВО «КубГТУ»: 350058, г. Краснодар, ул. Старокубанская, 88/4
Тираж 30 экз.

DOI 10.26297/SbR6.2023.001
ISBN 978-5-8333-1220-9



**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ VII СЪЕЗДА БИОФИЗИКОВ
РОССИИ: в 2 томах, том 2 – Краснодар: Типография ФГБОУ
ВО «КубГТУ», 2023**

Представлены материалы VII Съезда биофизиков России. Основные направления работы Съезда: медицинская биофизика; нейробиофизика; молекулярная биофизика; биофизика сложных многокомпонентных систем и математическое моделирование; механизмы действия физико-химических факторов на биологические системы; биофизика клетки; мембранные процессы; фотобиология и биофотоника; экологическая биофизика; биомеханика и биологическая подвижность; молекулярные моторы; механизмы трансформации энергии; новые методы в биофизике; биофизическое образование.

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

Ответственные редакторы: акад. РАН А.Б. Рубин, А.А. Анашкина, А.А. Осипов

The materials of the VII Congress of Biophysicists of Russia are presented. The main working areas of the Congress: medical biophysics; neurobiophysics; molecular biophysics; biophysics of complex multicomponent systems and mathematical modeling; mechanisms of action of physical and chemical factors on biological systems; cell biophysics; membrane processes; photobiology and biophotonics; ecological biophysics; biomechanics and biological mobility; molecular motors; energy transformation mechanisms; new methods in biophysics; biophysical education.

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

Responsible editors: academician of RAS A.B. Rubin, A.A. Anashkina, A.A. Osypov

Партнеры VII Съезда биофизиков России:

Stormoff®



Кубанский государственный технологический университет
2023

Краткое оглавление

Краткое оглавление	3
Механизмы действия физико-химических факторов на биологические системы	4
Экологическая биофизика.....	97
Медицинская биофизика. Нейробиофизика.....	131
Биофизическое образование	310
Новые методы в биофизике	322
Дискуссионный клуб	342
Полное оглавление.....	356
Авторский указатель.....	373

Механизмы действия физико-химических факторов на биологические системы

Выживаемость клеток А549 при облучении протонным пучком во флэш- и стандартном режимах

Рзянина А.В.^{1,2*}, Агапов А.В.^{1,2}, Грицкова Е.А.^{1,2}, Мицын Г.В.^{1,2}, Углова С.С.^{1,2}, Шипулин К.Н.^{1,2}

¹ОИЯИ;

²ОИЯИ;

rzjanina@mail.ru

Основной проблемой лучевой терапии является то, что она может наносить вред окружающим опухоль здоровым тканям. Поэтому подводимая к опухоли доза ограничена ее токсичностью для близлежащих здоровых тканей. Это может привести к снижению эффективности лучевой терапии и неполному уничтожению опухоли. Поэтому в основе методов лучевой терапии лежат принципы, учитывающие различия в реакции на облучение между нормальными и опухолевыми тканями, а также подходы, обеспечивающие сохранение здоровых тканей на приемлемом уровне. Для достижения этой цели можно варьировать параметрами облучения: величина поглощённой дозы, мощность дозы, фракционирование дозы и способы доставки дозы в опухоль. Величина доставляемой в опухоль дозы определяется как максимально переносимая доза, которая может быть доставлена в опухоль безопасно для здоровых тканей. Для уменьшения частоты возникновения радиационно-индуцированных побочных эффектов используют фракционирование дозы. Наиболее перспективным методом доставки излучения является протонная терапия, обеспечивающая высокую конформность дозных распределений, что позволяет уменьшить лучевую нагрузку на нормальные ткани. Наряду с усовершенствованием методов способа доставки дозы в опухоль и режимов фракционирования до недавнего времени недостаточно внимания уделялось возможности регуляции мощности дозы. Все больше исследований проводится в новой области, получившей название флэш-терапия, предполагающей сверхбыстрое подведение дозы при высокой мощности (почти на 3 порядка выше, чем при стандартной терапии). Данные многочисленных исследований показывают, что это позволяет эффективно снижать токсичность в нормальных тканях и при этом эффективно воздействовать на опухолевые клетки [1].

Цель: Сравнение выживаемости клеток А549 при облучении протонным пучком во флэш- и стандартном режимах.

Материалы и методы: Клеточная культура: Клетки карциномы легкого человека А 549.

Облучение протонами: Облучение клеток проводилось на протонном пучке 660 МэВ фазотрона ОИЯИ методом «на пролет» в двух режимах: стандартном при мощности дозы 0,1 Гр/с и во флэш-режиме при мощности дозы 70 Гр/с. Остальные параметры пучка были одинаковы.

Определение выживаемости клеток. После облучения протонами в дозах 0, 1, 2, 4 и 6 Гр клетки высевали из расчета 50 клеток/мл среды. Клетки культивировали в течение времени, необходимого для формирования колоний. Для определения выживаемости клеток через 12-14 дней после посева подсчитывалось количество выросших колоний.

Результаты и выводы. В результате проведенных экспериментов наблюдается различие в выживаемости клеток А549, облученных во флэш- и стандартном режимах. Выживаемость клеток, облученных во флэш-режиме, оказалась выше. Для дозы 1 Гр отношение составило 1,1; для 2 Гр -1,2; для 4 Гр- 1,3 и для 6 Гр -1,6.

Адаптация микроциркуляции к действию низкоинтенсивного мм-излучения у животных, находящихся в условиях стресса разной продолжительности

Раваева М.Ю.^{1*}, Черетаев И.В.¹, Чуян Е.Н.¹, Миронюк И.С.¹, Джелдубаева Э.Р.¹, Нагорская М.В.¹

¹Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского;

ravaevam@yandex.ru

Исследование направлено на решение актуальной фундаментальной проблемы, связанной с установлением механизмов адаптации тканевой микрогемодинамики животных к действию низкоинтенсивного

электромагнитного излучения миллиметрового (мм) диапазона к условиям острого (ОС, тест вынужденного плавания, однократно в течение 60 мин) и хронического стресса (десятисуточное ограничение подвижности, гипокинезия, ГК), а также их различной комбинации. Это дает возможность углубить современные представления о развитии стрессорных реакций организма, выявить ранние «маркеры» патологических изменений, сопровождающих развитие стресс-реакции, являющейся неспецифическим компонентом любого заболевания, и определить возможности модифицировать и /или нивелировать развитие стресс-реакции.

Исследование микроциркуляции (Мц) проводилось методом лазерной доплеровской флоуметрии при помощи лазерного анализатора кровотока «Лазма-МЦ» (производство НПП «Лазма», Россия), рассчитывали осцилляторные и неосцилляторные показатели кожной микрогемодинамики. Длина волны излучения - 7,1 мм, плотность потока мощности – 0,1 мВт/см²; локализация – затылочно-воротниковая область, экспозиция 30 минут, продолжительность – 10 суток.

Результаты исследования показали, что микроциркуляторные реакции на действие стресс-факторов разной продолжительности имели выраженную специфичность. Так, особенностью реакции тканевой микрогемодинамики животных к условиям ОС является определенный паттерн: нутритивная гиперемия (через один час после действия стресс-фактора) сменяется нутритивной (через 24 часа после действия стресс-фактора) и вновь возвращается к нутритивной (через 48 часов после действия стресс-фактора). Противоположная реакция Мц формировалась на действие ГК, при которой развивалась вазоконстрикция, нарушение притока и оттока крови и доминирование шунтового кровотока, уменьшение количества функционирующих капилляров.

Исследование Мц при действии комбинации стресс-факторов позволило установить, что предварительное воздействие ГК стресса модифицирует реакцию Мц на действие острого стрессирующего фактора, нивелируя развитие гиперемии, сопровождающей изолированное действие ОС. В пользу этого свидетельствует динамика коэффициента модификации микроциркуляторных показателей, значения которого постепенно увеличивались в отрицательной части графика, что свидетельствует об усилении эффекта модификации. Предварительное воздействие ОС у животных позволяет снизить уровень проявлений стресс-индуцированной вазоконстрикции, сопровождающей ГК и, как следствие, ишемии тканей. Можно предположить, что применение ОС является своего рода тренировкой, подготавливающей Мц и организм в целом к действию неблагоприятных факторов, одним из которых является длительное ограничение подвижности.

При изолированном 10-тикратном мм-воздействии у животных наблюдалось достоверное изменение активности всех компонентов регуляции микрососудистого тонуса, что выражалось в увеличении эндотелий-зависимой вазодилатации, снижении периферического сопротивления, увеличении притока крови в нутритивное микрососудистое русло, улучшении веноулярного оттока.

Комбинированное действие низкоинтенсивного мм-излучения, ОС и ГК приводило к значительному снижению развивающихся при стрессе нарушений микрогемодинамики, о чем свидетельствует отсутствие достоверных различий большинства показателей Мц у животных исследованных групп по сравнению с показателями у животных контрольной группы.

Таким образом, одним из основных механизмов действия мм-излучения является его способность лимитировать развитие стресс-реакции на уровне микроциркуляции, что является одним из основных проявлений физиологических эффектов низкоинтенсивного мм-излучения, лежащих в основе его антистрессорного действия. В реакции микроциркуляции на мм-воздействие задействованы практически все регуляторные компоненты сосудистого и внесосудистого генеза. Вероятно, что такой системный характер отклика организма обусловлен большим количеством мишеней для мм-волн, включающих микрососуды кожи, клетки крови, диффузную нейроэндокринную систему, а также нервные окончания и периферические нервы кожи, активация которых изменяет функциональную активность нервной, иммунной, эндокринной систем организма с изменением содержания или синтеза биологически активных веществ (гормонов, цитокинов, нейромедиаторов), что играет существенную роль в механизмах регуляции процессов микроциркуляции крови.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» «Экспериментальная физиология и биофизика».

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-24-00332 Тканевая микрогемодинамика: механизмы антистрессорного действия низкоинтенсивного миллиметрового излучения

Аикар как потенциальное радиозащитное средство

Абдуллаев С.А.^{1,2*}, Салеева Д.В.¹

¹ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия;

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;
saabdullaev@gmail.com

Настоящая работа посвящена изучению влияния соединения АИКАР на выживаемость мышей, частоту микроядер в клетках костного мозга мышей и экскрецию внеклеточной ядерной и митохондриальной ДНК с мочой у крыс, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения.

Поиски путей модификации радиочувствительности являются важнейшей фундаментальной проблемой, как с позиции снижения последствий воздействия ионизирующих излучений (ИИ) на организм, так и с позиции повышения эффективности радиотерапии опухолей. Эффективность функционирования репарационных систем зависит не только от их полноценности, но и от количества индуцируемых повреждений ДНК, их сложности, а также энергообеспеченности развития ответа на повреждение ДНК (ОПД). При этом ключевую роль в поддержании энергетического гомеостаза в облученных малыми и сублетальными дозами ИИ клетках играет 5'-АМФ-активируемая протеинкиназа (АМРК). АМРК является полисубъединичным (гетеротримерным) комплексом – главным регулятором клеточного и системного энергетического гомеостаза. В ряде исследований показано, что дополнительной активации АМРК и митохондриального биогенеза в клетках удается достичь с помощью фармакологических соединений разного класса. Среди них значительный интерес представляет 5-аминоимдазол-4-карбоксамид-рибоза (АИКАР), аналог АМФ, который транспортируется в клетки и широко используется в экспериментах.

Целью нашей работы явилась изучение влияния соединения АИКАР на выживаемость мышей и на частоту образования микроядер (МЯ) в клетках костного мозга, а также на экскрецию внеклеточной ядерной ДНК (вк-ядДНК) и внеклеточной митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) с мочой крыс, облученных рентгеновскими лучами.

Материалы и методы:

В исследовании использовались самцы мышей линии Balb/c 2-х месячного возраста и самцы крыс линии Fisher-344 3-х месячного возраста, полученных из питомника филиала Института биоорганической химии РАН (Пущино, Московская область). Для определения выживаемости мышей облучение проводили в дозе 8 Гр, а для анализа возникновения МЯ в клетках костного мозга в дозе 2 Гр. Крыс подвергали облучению в дозе 5 Гр. АИКАР (Merck, Darmstadt, Germany) вводили животным внутривентриально по 400 мг/кг веса тела. Препарат вводили за 30 мин до и через 20 мин, 6 ч, 24 ч после облучения. Кривые выживаемости были получены для 30 животных на каждую кривую в каждом независимом эксперименте. Статистические различия в экспериментах на выживание между группами мышей сравнивались по методу Каплана-Майера. Различия между данными, полученными до и после обработки крыс, анализировали с помощью теста Манна-Уитни U или непарного t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде средней величины (для 8 животных) и стандартной ошибки среднего значения (\pm SEM). Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты:

Результаты показали, что АИКАР оказывает радиопротекторное действие, как по выживаемости мышей, так и по снижению частоты микроядер. Показано, что АИКАР оказывает значительный радиозащитный эффект только при его введении мышам сразу после облучения. Результаты анализов указывают, что радиомитигаторный эффект АИКАР на облученных животных, возможно, проявляется посредством митохондриально-направленного механизма. Данные по анализу экскреции вк-ядДНК и вк-мтДНК с мочой облученных животных позволяют предполагать, что АИКАР также способствует ускоренному удалению поврежденных клеток и дисфункциональных митохондрий из тканей облученных животных посредством активации аутофагии (митофагии).

Заключение:

Таким образом, результаты наших исследований показывают, что АИКАР действует как радиомитигаторный эффектор и имеет высокий потенциал в качестве радиозащитного средства для активного практического применения.

Активность молекулярно-генетических показателей у мышей при воздействии фракционированного облучения в малой дозе с применением экранирования

Салеева Д.В.^{1*}, Воробьева Е.С.¹, Раева Н.Ф.¹, Рождественский Л.М.¹, Абдуллаев С.А.^{1,2},
Засухина Г.Д.^{1,3}

¹ФГБУ ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России,
Москва, Россия;

²ФГБУН институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук;

³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия;

dasha_saleeva@inbox.ru

В клетках, подвергающихся воздействию ионизирующего излучения, активируется ряд сложных реакций, включающих повреждение и репарацию ДНК, гибель клеток, изменение уровня пролиферации. Эффекты действия высоких доз радиации на клетки млекопитающих изучались, в том числе, в аспекте активности генов и их регуляторов. Однако, остается менее исследованным, как малые дозы ионизирующего излучения (МДР) влияют на указанные процессы. Рядом авторов показано, что воздействие МДР приводит к различным положительным реакциям клетки и организма в целом: активация иммунной системы, генов и их регуляторов в феномене гормезиса, формирование адаптивного ответа. Эти наблюдения определили цель работы: исследовать активность генов и некодирующих РНК (длинных некодирующих РНК и микроРНК) в различных органах мышей с трансплантированной карциномой Льюиса при облучении в МДР при различных вариантах экранирования.

Материалы и методы:

Объектами исследования являлись мыши-самки C57Bl/6 с перевитой карциномой легких Льюиса, подверженные тотальному 4х кратному фракционированному рентгеновскому облучению в дозе 75 мГр на аппарате РУСТ М1 на 10-е сутки после трансплантации опухолевой ткани (мощность дозы 0,154 Гр/мин, сила тока 0,7 мА, напряжение 200 кВ). Облучение проводили с использованием защитных алюминиевых экранов различных областей тела мыши: тотальное (без экранирования), только опухоли (экранирование остального тела), всего организма без опухоли (экранирование опухоли). В соответствии с экранированными областями были сформированы группы мышей. Измерение опухоли у каждого животного производили каждый день, начиная с 11-х суток (когда объем опухоли был достаточно выражен) после введения клеток. На 21 сутки после инокуляции опухолевой ткани всех животных подвергали эвтаназии. Содержание мРНК белок кодирующих генов, а также некодирующих РНК (микроРНК, длинных некодирующих РНК) оценивали в костном мозге, гомогенате селезенки и тимуса, а также в карциноме легких Льюиса методом ПЦР в реальном времени. Последовательность праймеров и условия ПЦР в реальном времени опубликованы ранее. В качестве конститутивного гена для оценки экспрессии был использован ген GAPDH. Результаты представляли в виде медианы изменения экспрессии показателей в группах облученных мышей, выраженных по отношению к медиане группы контроля, принятой за единицу. Для оценки статистической значимости применялся непараметрический критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Результаты

Обнаружено, что рост опухоли происходит экспоненциально во всех экспериментальных группах, начиная с 11 суток. Однако в группе мышей с тотальным облучением животного объем опухоли имеет большие размеры по сравнению с другими группами, в то время как в группе мышей с экранированием опухоли объем новообразований наименьший на аналогичных сроках измерения.

Показано, что при действии 4-х кратного фракционированного тотального облучения в дозе 75 мГр на мышей с перевитой карциномой Льюиса в гомогенате опухоли происходит статистически значимое изменение экспрессии мРНК генов NFκB, G-CSF, TNFα, iNOS по сравнению как с необлученным контролем, так и с группой тотального облучения тела животного.

При анализе экспрессии генов и некодирующих РНК в образцах тимуса, селезенки и костного мозга мышей получено, что наибольшее количество активированных показателей (экспрессия статистически значимо изменилась в ответ на облучение), было выявлено для селезенки (40% – при тотальном облучении – 50% при локальном облучении только опухоли, 30% – при экранировании опухоли). Эти результаты согласуются с литературными данными, в которых показано, что тимус и костный мозг являются более пролиферирующими органами, клетки которых по большей части находятся в митозе, что отражается в сниженной транскрипции генов, по сравнению с селезенкой.

Из 20 исследованных нами показателей, наибольшая модуляция экспрессии (в 3 и более раз) была выявлена для мРНК генов G-CSF (3,12 раз), IAP (4,3 раз), P38 (в 3,12 раза) и длинных некодирующих РНК lncp21 (в 3,7 раза), NEAT (6 раз). Однако линейность влияния величины модуляции экспрессии на оказываемый биологический эффект еще предстоит исследовать.

При использовании экранирования карциномы Льюиса мышей выявленные изменения в экспрессии NFκB(p50), G-CSF, TNFα, iNOS, Incr21 в самой опухоли были практически одинаковыми как в случае локального воздействия ИИ в малой дозе (группа «обл.только опухоль»), так при тотальном облучении без опухоли по сравнению с контролем. Однако, только для мРНК гена P38 нами показано статистически значимое изменение в группе «облучение без опухоли» и его отсутствие при локальном облучении (группа «обл.только опухоль»).

Заключение

Полученные результаты экспрессии генов в опытах с применением экранирования свидетельствуют о разных уровнях активации иммунной системы в зависимости от вида экранирования. Данные выводы подтверждают снижение роста опухоли у животных, подвергшихся воздействию тотального рентгеновского облучения с экранированной опухолью по сравнению с другими экспериментальными группами. Полученные результаты не являются окончательными и требуют дальнейшей экспериментальной работы.

Анализ вклада генетической регуляции в эффекты ионизирующего излучения на стрессовые сигналы растений

Пирогова П.А.^{1*}, Здобнова Т.А.¹, Ладейнова М.М.¹, Гринберг М.А.¹, Воденев В.А.¹

¹ННГУ им. Н.И. Лобачевского;

poly.h@mail.ru

Значительное влияние ионизирующего излучения (ИИ) на живые организмы реализуется, во многом, за счёт модификации стрессовых сигналов и изменения статуса сигнальных систем. В естественных условиях особое значение может приобретать эффекты ИИ на стрессовые сигналы, которые в свою очередь формируют адаптации к природным факторам. Один из значимых типов стрессовых сигналов растений — электрические сигналы (ЭС). ЭС представляют собой распространяющиеся изменения мембранного потенциала, возникающие в ответ на различные раздражители (нагрев, охлаждение, механическое воздействие и др.). В преобразовании ЭС в функциональный ответ принимают участие другие сигнальные системы, в том числе гормональная. Стрессовые гормоны — абсцизовая (АБК), жасмоновая (ЖК) и салициловая кислота (СК) — участвуют в опосредованном ЭС изменении активности фотосинтеза, транспирации, экспрессии генов. К настоящему времени показано, что ИИ способно оказывать эффекты на параметры ЭС и вызываемых ими функциональных ответов. Эффекты, возникающие при действии ИИ, могут быть обусловлены изменением уровня экспрессии генов, что реализуется, преимущественно, за счет активных форм кислорода (АФК), способных не только к повреждающему действию, но и к регуляции различных систем.

Исследования проводили на 15-дневных проростках пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) сорта «Дарья». Экспериментальную группу облучали с помощью β-излучателя ⁹⁰Sr-⁹⁰Y с активностью 0,1 МБк и мощностью дозы примерно 31,3 мкГр/час. Продолжительность облучения растений составляла 15 дней. Максимальная накопленная доза составляла около 11,3 мГр. Уровень экспрессии генов оценивали методом ПЦР «в реальном времени». В работе анализировали гены белков, которые потенциально могут обуславливать эффекты ИИ на электрогенез, и гены белков биосинтеза стрессовых фитогормонов. Разработку праймеров интересующих генов для ПЦР «в реальном времени» проводили с соблюдением необходимых параметров. В качестве референсных генов использовали β-актин (ACTB) и гомолог белка слияния вакуолей (MON1). Полученные результаты анализировали по методике ΔΔCt.

У облучённых растений изменяются параметры ЭС: увеличивается амплитуда и скорость распространения. Теоретический анализ потенциальных мишеней ИИ позволил выделить ключевые компоненты сигнальных систем, воздействие на которые может объяснить наблюдаемую в экспериментах модификацию ЭС и процесса преобразования сигналов в ответ. К ним относятся, в первую очередь, H⁺-АТФаза, NADPH-оксидаза, ионные каналы различных типов и фитогормоны. В ходе работы подобраны праймеры для генов белков, участвующих в электрогенезе: H⁺-АТФазы (HA1), NADPH-оксидазы (RBOHs), анионных (CLC1 и ALMT1), калиевых (SKOR и AKT1) и кальциевых (TPC1) каналов. Также для генов белков биосинтеза фитогормонов: АБК — 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназа (NCED3), ксантоксин дегидрогеназа (ABA2), β-глюкозидаза (BG1); ЖК — липоксигеназа (LOX6), алленоксид-синтаза (AOS), 12-ОФДК-редуктаза (OPR2), жасмонил-L-амино-синтаза (JAR1); СК — изохоризмат-синтаза (ICS1). По результатам ПЦР «в реальном времени» определили относительный уровень экспрессии генов интереса у облучённых растений. Обнаружено снижение экспрессии гена калиевого канала SKOR и разнонаправленное изменение экспрессии генов биосинтеза различных фитогормонов. Проведенный анализ экспрессии генов интереса позволяет определить вклад генетической регуляции в эффекты ИИ на стрессовый сигналинг.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 23-24-00340.

Анализ спектральных характеристик гемоглобина крови доноров после воздействия на его растворы антибиотиком "Амфотерицин В"

Соколова Л.О.^{1*}, Литвинов Н.В.¹, Калаева Е.А.¹, Свекло Л.С.², Артюхов В.Г.¹
¹Воронежский государственный университет;
²БСМП БУЗ ВО «Воронежская областная станция переливания крови»;
lyudmila.sokolova.94@mail.ru

Полиеновый антибиотик «Амфотерицин В» применяется при системных инфекциях, вызываемых такими грибами, как *Aspergillus fumigatus* или *Candida albicans* [2]. Следует отметить, что молекулярные механизмы взаимодействия данного препарата с биологическими объектами сложны, на сегодняшний день недостаточно изучены и, таким образом, подлежат дальнейшей разработке.

В связи с вышеизложенным, целью данной работы явилось исследование влияния «Амфотерицина В» на спектральные свойства гемоглобина человека. В экспериментах использовали гепаринизированную кровь доноров, полученную в филиале БСМП БУЗ ВО «Воронежская областная станция переливания крови». Все процедуры проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 года [1]. Гемоглобин из крови доноров получали по стандартной методике [3]. Затем к 4 мл белка, в концентрации 10-5 моль/л, добавляли «Амфотерицин В» в концентрациях $2,5 \cdot 10^{-5}$ и $5,4 \cdot 10^{-5}$ М. Регистрацию электронных спектров поглощения (ЭСП) исследуемых образцов проводили на спектрофотометре UV-2401 PC (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 230 до 700 нм. Оптическую плотность растворов регистрировали на протяжении всего исследуемого диапазона через 1 нм при ширине спектральной щели 1 нм.

На ЭСП нативного раствора гемоглобина было обнаружено два максимума в УФ-области (273-275 и 342-346 нм) и три полосы поглощения в видимой части спектра (414, 541 и 576 нм). После инкубации в течение 15 минут растворов гемоглобина с «Амфотерицином В» было выявлено изменение положения максимумов поглощения как в УФ-, так и в видимой области спектра: после воздействия антибиотика в концентрации $2,5 \cdot 10^{-5}$ М полосы поглощения в УФ- и видимой частях ЭСП приходились на 275-276; 325-331; 411-412; 541-542 и 576-577 нм, а при концентрации $5,4 \cdot 10^{-5}$ М — на 273-276; 327-331; 411-414; 540-541 и 576 нм. На ЭСП растворов гемоглобина, модифицированного антибиотиком, было отмечено повышение оптической плотности в максимумах при 325-331 нм и 327-331 нм по сравнению с интактным раствором.

Таким образом, «Амфотерицин В» индуцирует частичное окисление железа гема, о чем свидетельствует сдвиг полосы Сорэ в коротковолновую область, и нарушает гем-белковые взаимодействия, на что указывают изменения на ЭСП гемоглобина в области 330-346 нм.

Библиографические ссылки

1. Amphotericin B as a Cholesterol Identifier in Human Erythrocyte's Membrane / E.A. Kalaeva, L.O. Sokolova, V.G. Artyukhov, M.A. Nakvasina, O.V. Putintseva // Opera Medica et Physiologia. — 2022. — Vol. 9, № 1. — P. 42-48.
2. Chattopadhyay A., Jafurulla M. A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis // Biochemical and biophysical research communications. — 2011. — Vol. 416, №. 1-2. — P. 7-12.
3. Артюхов В.Г. Практикум по биофизике / В.Г. Артюхов [и др.] — Воронеж: Изд-во ВГУ, 2016. — 294 с.

Антиоксидантное и нейропротекторное действие меконовой кислоты в модельных системах

Козин С.В.^{1,2,3*}, Кравцов А.А.^{1,2}, Моисеев А.В.⁴, Левченко А.А.², Иващенко Л.И.²
¹Южный научный центр РАН, Ростов-на-Дону;
²Кубанский государственный университет, Краснодар;
³Кубанский государственный технологический университет, Краснодар;
⁴Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина, Краснодар;
kozinsv85@mail.ru

Разработка новых эффективных и безопасных нейропротекторов остается актуальной задачей в фармакологии. В отношении меконовой кислоты установлен антиоксидантный и нейропротекторный эффект, а

хелидоновая кислота обладает выраженным противовоспалительным действием. В отношении меконовой кислоты нейропротекторное и антиоксидантное действие не было изучено. Целью настоящей работы было установление нейропротекторного и антиоксидантного потенциала меконовой кислоты в модельных системах.

Защитное действие меконовой кислоты на культуру нейронов мозжечка изучали на модели глутаматной токсичности и кислородо-глюкозной депривации (КГД) [1]. Антиоксидантную активность меконовой кислоты изучали квантово-механическими расчетами в программном пакете ORCA 5.0.1 и экспериментально методом хемиллюминесцентного анализа в модельных системах: цитрат-фосфат-люминол (ЦФЛ) и желточных-липопротеинов (ЖЛП)[2]. Хелатирующие свойства меконовой кислоты по отношению к Fe^{3+} в растворах изучены Job's методом [3]. Меконовая кислота (МК) была получена из койевой кислоты в отделе биологически активных веществ Кубанского государственного университета. Согласно расчетным данным, меконовая кислота обладает наименьшим значением энтальпии одноэлектронного переноса в трианионной форме и составляет 318,7 кДж/моль, тогда как для дианионной формы данное значение равно 421,3 кДж/моль. Рассчитанные значения энергии переноса электрона в водной фазе для МК соизмеримы с природными антиоксидантами – катехинами, а экспериментально полученные значения ингибирования развития свободнорадикальных реакций в модельных системах выше, чем у этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС). В модельной системе ЦФЛ МК проявила дозозависимое снижение интенсивности свечения хемиллюминесцентной реакции. При концентрации 0,2 мМ МК уменьшает хемиллюминесценцию на 73 % против 48 % ЭМГПС. Снижение интегрального показателя свечения при концентрациях антиоксидантов 0,3 и 0,6 мМ составило 80 и 87% у МК против 55 и 73 % у ЭМГПС ($p < 0,05$). МК и ЭМГПС оказали также дозозависимое снижение интенсивности развития свободнорадикальной реакции окисления липидов желтка в модельной системе желточных-липопротеинов. Полученные экспериментальные данные в двух модельных системах и расчетные данные указывают на высокий антиоксидантный потенциал МК. Было установлено, что МК оказывает защитный эффект на моделях ишемии *in vitro*. Ее действие приводит к снижению уровня внутриклеточного кальция и восстановлению мембранного потенциала митохондрий в культуре нейронов мозжечка при глутаматном воздействии, и увеличению процента живых клеток при кислородо-глюкозной депривации. При действии КГД в отсутствие МК количество живых клеток составило 12 %. Добавление МК в культуру нейронов мозжечка, подвергшихся КГД, способствовало увеличению выживаемости клеток. Статистически значимого отличия в количестве живых клеток между исследуемыми концентрациями не наблюдалось, однако, максимальный эффект наблюдался при концентрации 1 мМ и составил 56 %, а минимальный при концентрации 0,001 мМ и составил 31 %. Десятиминутная инкубация глутамата приводила к 60% гибели нейронов мозжечка по сравнению с контролем, при этом добавление МК во всех концентрациях способствовало уменьшению гибели нейронов. Достоверного отличия в количестве живых клеток между исследуемыми концентрациями не было, однако наблюдалась такая тенденция, что максимальная концентрация МК 1 мМ оказывает наименьший эффект (55% живых клеток), тогда как при концентрации 0,01 и 0,001 мМ количество выживших клеток максимально и составило 65 %. Воздействие глутаматом приводило к возрастанию уровня цитозольного кальция на 69 % по отношению к контролю. С другой стороны, в культурах с добавлением МК повышение уровня кальция было существенно меньше и составило 38 %, 46 %, 46 %, 48 % к контролю, соответственно для концентраций 1; 0,1; 0,01 и 0,001 мМ. Действие возбуждающей аминокислоты на клетки головного мозга приводило к снижению мембранного потенциала митохондрий на 17 % по отношению к контролю. Меконовая кислота способствовала меньшему снижению мембранного потенциала митохондрий на 9 %, 8%, 7% и 10 % по сравнению с контролем для концентраций 1; 0,1; 0,01 и 0,001 мМ. Спектроскопические результаты исследований меконовой кислоты с Fe^{3+} показали, что при физиологическом значении pH преобладает комплекс с соотношением меконовая кислота/ Fe^{3+} 3:1 в значении ~ 97% с высокой константой устойчивости, тогда как на долю комплекса составом 2:1 приходится ~ 3%. Эти данные позволяют говорить о возможном хелатировании ионов железа МК в тканях головного мозга и уменьшению интенсивности окислительных процессов за счет ингибирования реакции Фентона, и, как следствие, снижению повреждения и гибели нейронов.

Полученное антиоксидантное, хелатирующее и цитопротекторное действие меконовой кислоты дает основание для дальнейшего изучения возможных нейропротекторных свойств данного соединения в экспериментах *in vivo*, а полученные в работе данные о ее физико-химических свойствах могут быть полезны для синтеза и изучения новых координационных соединений на основе меконовой кислоты.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания ЮНЦ РАН № 122020100351-9.

Список литературы:

1. A. Kravtsov, S. Kozin et al. 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. – DOI 10.3390/molecules27010243.
2. Козин С. В., Кравцов А. А. и др. Цитопротективный и антиоксидантный эффект меконовой кислоты в модельных системах // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2021. – Т. 171. – № 5. – С. 592-595. – DOI 10.47056/0365-9615-2021-171-5-592-595. – EDN WESBMK.
3. Козин С. В., Иващенко Л. И. и др. Меконовая кислота – возможный нейропротектор: обоснование на экспериментах *in vitro* и физико-химических свойствах // *Биофизика*. – 2023. – Т. 68. – №1. – С. 20-32.

Биологическая активность фуллеренолов различной структуры. Роль активных форм кислорода. Билюминесцентный мониторинг

Сушко Е.С.^{1,2*}, Сачкова А.С.³, Внукова Н.Г.^{2,4}, Чурилов Г.Н.^{2,4}, Степин Е.А.⁴, Кичеева А.Г.^{1,5},
Кудряшева Н.С.^{1,4}

¹Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия;

²Институт физики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия;

³Отделение ядерно-топливного цикла, Томский политехнический университет, Томск, Россия ;

⁴Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия;

⁵ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия;

kkovel@yandex.ru

Фуллерены – объемные пустотелые молекулярные соединения, принадлежащие к классу аллотропных форм углерода. Фуллерены практически нерастворимы в полярных растворителях, в том числе и в воде, но существует возможность получения водорастворимых форм фуллеренолов.

Фуллеренолы – водорастворимые полигидроксилированные производные фуллеренолов, наноразмерные биологически активные соединения, перспективные агенты для разработки лекарственных препаратов. Особенно перспективными в радиомедицине, считаются: (1) редокс-активные производные фуллеренолов, способные влиять на окислительно-восстановительные процессы в биохимических циклах (например, атомы железа); (2) перспективные кандидаты для использования в качестве новых контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (например, фуллеренолы, содержащие гадолиний). Наиболее широко используемыми Gd-содержащими соединениями являются гадолиамид, гадопентетат димеглумин, гадотерат меглумин и др.; токсичность которых уменьшает перспективы их использования в медицине. Производные металлофуллерена удерживают токсичные ионы Gd³⁺ в инертной, но прочной углеродной оболочке, предотвращая их высвобождение, понижая их токсичность.

В работе проведен анализ токсичности и антиоксидантной активности фуллеренолов различной структуры: C₆₀,70O_y(OH)_x, где x + y = 10-12; Gd@C₈₂O_y(OH)_x, где x + y = 20-24; C₆₀O_y(OH)_x, C₆₀,70O_y(OH)_x, где x + y = 24-28; C₆₀,70O_y(OH)_x, Fe_{0,5}C₆₀O_y(OH)_x, Gd@C₈₂O_y(OH)_x, где x + y = 40-42. Для мониторинга токсичности растворов фуллеренолов использовали люминесцентные клеточные и ферментативные биотесты (соответственно светящиеся морские бактерии *Photobacterium phosphoreum* и их ферментативные реакции), где главный тестируемый параметр физиологической активности – интенсивность билюминесценции. Для характеристики токсичности фуллеренолов определяли их концентрации, ингибирующие билюминесценцию тестовых систем на 50%. Антиоксидантную активность фуллеренолов изучали в растворах модельных окислителей (1,4-бензохинона и K₃[Fe(CN)₆]); по уменьшению токсичности растворов модельных окислителей рассчитывали коэффициенты антиоксидантной активности. Содержание активных форм кислорода (АФК) оценивали в экспериментальных растворах хемилюминесцентным люминольным методом, определяли корреляции с токсичными/антиоксидантными характеристиками.

В работе продемонстрирован высокий потенциал люминесцентных биотестов для сравнения биологической активности фуллеренолов. Все исследуемые фуллеренолы продемонстрировали токсичность при высоких концентрациях (>10⁻³ г/л) и антиоксидантную способность при низких. Токсичность и антиоксидантная активность фуллеренолов связаны с уменьшением содержания АФК в исследуемых растворах. Показано, что меньшей токсичностью, большей антиоксидантной активностью обладают фуллеренолы в структуре которых количество кислородосодержащих групп равно ½ количества атомов углерода в каркасе, что связано с соотношением размера фрагментов гидрофобной π-системы и количеством полярных (гидрофильных) кислородосодержащих групп. Фуллеренолы интенсивнее ингибируют билюминесценцию бактериального биотеста, чем ферментативного, что вероятно определяется наличием дополнительных путей воздействия – на гидрофобные фрагменты бактериальной клеточной мембраны. При этом, наименьшей токсичностью для бактериальной тестовой системы обладают Gd-содержащие фуллеренолы Gd@C₈₂O_y(OH)_x (x+y=20–24; x+y=40–42), что вероятно связано с большим размером их углеродного каркаса и склонностью к агрегации. Антиоксидантный эффект фуллеренолов зависит от амфифильных характеристик среды и максимален в растворах органического окислителя – 1,4-бензохинона. Фуллеренолы ускоряют ферментативные НАДН-зависимые реакции, что приводит к ускорению билюминесцентных реакций и вносит вклад в их антиоксидантный эффект.

Биофизические характеристики уромодулина ин витро в верификации роли метаморфозы его изоформ ин виво

Яковлева А.В.^{1*}, Залеский М.Г.¹, Шаповалов В.В.²

¹СПБГМУ| Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. Павлова;

² Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И.

Ульянова (Ленина);

gi_ns@mail.ru

Актуальность. Мочекаменная болезнь является значимой медико-социальной проблемой, поскольку широко распространена среди трудоспособного населения и занимает одно из лидирующих мест в структуре урологической патологии.

Цель исследования: изучение биофизического феномена фазового перехода «золь-гель» изоформ уромодулина используя различные технологии.

Материалы и методы исследования: В ходе работы было обследовано 100 пациентов: мужчин - 48(48%), женщин – 52(52%). В исследуемую группу в подавляющем большинстве были включены пациенты с оксалатным уролитиазом, учитывались результаты «Литос-системы». Определение гидродинамических размеров биологических объектов проводили на анализаторе ЛКС-03, ИНТОКС (Россия) методом гидродинамического светорассеяния. Исследование Z-потенциала по измерению электрофоретической подвижности частиц с использованием эффекта Доплера, определение молекулярной массы по интенсивности рассеянного света с применением графика Дебая и оценка динамики этих характеристик при изменении pH и ионной силы с метрологической прослеживаемостью к стандартам NIST (анализатор Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments).

Результаты. На модельных растворах, имитирующих состав мочи (плотность 1,010 (300 mosm/l); 1,017 (650 mosm/l); 1,030 (1000 mosm/l)), методом динамического светорассеяния было выявлено преобладание у здоровых лиц олигомерной формы UMD (7 МДа) как при низкой осмоляльности (95% при 300 mosm/l), так и при очень высокой осмоляльности (75% при 1000 mosm/l). Уромодулин из мочи пациента с уролитиазом в подавляющем большинстве представлен полимерной формой: при 300 mosm/l на 60% в полимерной форме UMD (28 МДа), а в концентрированной моче (1000 mosm/l)- UMD (28 МДа) обнаруживается в 95% .

При измерении Z-потенциала пула UMD, обнаружено, что уромодулин из мочи больных уролитиазом формирует кривую с двумя пиками. Второй пик представлен частью макромолекул, фактически лишенных отрицательного заряда.

При исследовании размеров молекул уромодулина в процессе охлаждения пробы до 4°C уромодулин из мочи пациентов с уролитиазом прогрессивно увеличивает гидродинамический размер, измеренный методом динамического светорассеивания. Образование кристаллических минеральных компонентов происходит при нарушении (снижении) коллоидной устойчивости биологических сред организма. Уникальные биофизические свойства уромодулина обеспечивают коллоидно-осмотические свойства мочи и препятствуют образованию камней, предотвращая адгезию кристаллоидов. Обнаружение гелеобразного осадка - криогеля при охлаждении мочи подтверждает присутствие в моче высокомолекулярных соединений.

Феномен фазового перехода «золь» в «гель» регистрировали на разработанной модели медицинского изделия «Уроскрин». Электронно-оптический прибор позволяет фиксировать образование «криогеля мочи» при выполнении «холодовой пробы мочи».

Апробация анализатора позволяет в дальнейшем его использовать для констатации эффекта фармакологической модификации процесса кристаллогенеза.

Выводы. Стабильность и устойчивость коллоидной системы обеспечивает олигомерная форма уромодулина (7 МДа) за счет выраженных электроотрицательных свойств данной формы, значительно преобладающая в популяции у здоровых людей над олигомерной формой (28 МДа). «Уроскрин» - новая медицинская технология для изучения диагностической эффективности скрининга оценки состояния коллоидного гомеостаза мочи, как критерия ренальных дисфункций.

Биоцидные свойства наноразмерных потенциально мембранно-активных 1,10-фенантроцианинов (би-1,10-фенантролиленов) редокс-чувствительных Co(II) и Mn(II)

Демидов В.Н.^{1*}, Богомолова Е.В.², Бадалян А.Г.³, Пахомова Т.Б.⁴

¹Институт химии силикатов им. И.В. Гребенщикова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

³Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия;

⁴Санкт-Петербургский государственный технологический институт (ТУ), Санкт-Петербург,

Россия;

vndemidov@mail.ru

В настоящее время ввиду прогрессирующей бактериальной и грибной антибиотико-резистентности весьма актуальны разработка принципиально новых методов целенаправленного синтеза координационных соединений d-элементов с фармакофорными лигандами и исследование возможностей их применения в качестве металло-лекарств [1], в частности, фунгистатиков [2], а также экологических (eco-friendly) биоцидов в составе защитных покрытий. Металло-лекарства не имеют такой длительной предыстории как органические антибиотики и по отношению к ним не зафиксировано развитие существенной устойчивости микроорганизмов. Одним из многообещающих подходов к синтезу новых металло-лекарств и биоцидов (так называемая новая парадигма) является создание биядерных структур $[LnMz+(\mu-L)Mz+Ln] X-m$ ($Mz+$ – ион металла, L – лиганды, $\mu-L$ – мостиковый лиганд, X – анионы).

В работе синтезированы парамагнитные (низкоспиновые, с лигандами сильного поля) наноразмерные биядерные комплексы $Co^{2+} [Ar]3d7$ и новые комплексы $Mn^{2+} [Ar]3d5 (phen)_nM^{2+}(\mu-\sigma N, \pi N-PCN)M^{2+}(phen)_n(OAc)_4$ с фармакофорными N,N'-N'',N'''-бис-хелатными 1,10-фенантроцианиновыми (би-1,10-фенантролиленовыми) мостиковыми лигандами $\mu-\sigma N, \pi N-PCN$ (phen-1,10-фенантролин, –OAc – ацетатные анионы, n=0, 1), их исходные пурпурно-фиолетовые (а также производные желто-коричневые хромофорные формы, $\mu-\sigma N, \pi N-PCN'$), мягкие цветные коллоидные стекла, и исследованы их фунги-, бактерио-, виро- и цитостатические свойства. Синтез комплексов осуществлен на базе термического металл-ассистируемого негидрогенативного $C(sp^2)N$ -сочетания 1,10-фенантролина [3] в предшественниках $M(phen)_n(OAc)_2$ (n=1,2). Соединения охарактеризованы методами ИК-спектроскопии, ЭПР, данными элементного анализа.

Первичные данные о фунгистатических свойствах желто-коричневых форм соединений $(phen)_nM(\mu-PCN')M(phen)(OAc)_4$ по отношению к грибам из родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Trichoderma* показывают, что комплекс Mn(II) можно отнести к умеренным (мягким) фунгистатикам. Активность соединения Co(II) существенно ниже. Тем не менее, найденная для него IC₅₀ для грибов *Ulocladium chartarum* составила 89,06 µg/ml, что указывает на значительное фунгистатическое действие [4]. Изучение поведения 1,10-фенантроцианинов (PC) Co(II), Zn(II) и Cd(II) по отношению к *Mycobacterium tuberculosis*, *Herpes virus*, *Candida albicans*, а также клеткам HeLa in vitro свидетельствует об их выраженной бактерио- (IC₅₀ 0,1-3,0 µg/ml), виро- (IC₅₀ 0,1-10,0 µg/ml), фунги- и цитостатической активности.

В связи с обнаруженными биоцидными свойствами соединений важно изучение механизмов их биостатического действия. Рассмотрено несколько возможных вариантов (мод) взаимодействия “металлокомплекс–мишень”. Возрастание приведенной вязкости растворов ДНК в присутствии $Co(phen)_2(OAc)_2$ говорит о том, что для него не исключена интеркаляция лиганда phen в двойную спираль ДНК [5]. Ввиду склонности ассоциатов PC Co(II) и Mn(II) (как объемных хромофоров, по свойствам приближающихся к органическим красителям) к ММВ дисперсионного (“поверхность – поверхность”) типа [6], можно ожидать, что наиболее вероятными первичными биологическими мишенями для них будут являться мембраны – клеток и клеточных органелл, в частности ядра. Рассмотрено предполагаемое влияние редокс-чувствительности Mn^{2+} на биоцидные свойства его комплекса. Для соединений методом ЭПР выявлены температурно-достижимые низшие электронные бирадикальные триплетные состояния. Фото-активация также приводит к появлению подобных форм. В связи с этим мы исследуем вероятное термо- и фото-активирование биостатического действия комплексов.

Исследование ЭПР соединений выполнено в ФТИ РАН и РЦ МРМИ СПб ГУ, изучение их фунгистатических свойств – в БИН РАН, в рамках темы «Биоразнообразие, экология и структурно-функциональные особенности грибов и грибообразных протистов» (АААА-А19-119020890079-6).

Авторы благодарят д.м.н., проф. В.В. Теца, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии СПб ГМУ, за исследование биостатических свойств комплексов.

1. Viganor L., Howe O., McCarron P., et al. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2017. V. 17. No. 11. P. 1280-1302.

2. Gandra R., McCarron P., Viganor L., et al. *Frontiers in Microbiology*. 2020. V.11. 470.

3. Демидов В.Н., Симанова С.А., Савинова А.И. и др. *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева)*. 2009. Т. 53. № 1. С. 128-134.

4. Демидов В.Н., Панина Л.К. Успехи медицинской микологии. 2022. Т. 23. С. 200-201.
5. Павленова К.Н., Демидов В.Н., Касьяненко Н.А. Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2017. Т. 2. № 1. С. 343-347.
6. Пирсон Р. Правила симметрии в химических реакциях. М.: Мир, 1979. 592 с.

Взаимодействие ДНК с координационными соединениями иридия и рутения

Теплухина К.А.^{1*}, Касьяненко Н.А.¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет ;
tepluhina.ksenya@gmail.com

Используемые в работе координационные соединения могут рассматриваться как биологически активные соединения, взаимодействующие *in vivo* с молекулой ДНК. Предварительно известна их потенциальная противоопухолевая активность. Однако, в результате реакции акватации координационные соединения этого типа могут приобретать в водном растворе заряд 3+, что может способствовать тому, что при взаимодействии с молекулой ДНК они могут индуцировать компактизацию макромолекулы в растворе вплоть до формирования тороидальных структур, как это ранее было показано для соединений кобальта подобной структуры. Поэтому целью настоящего исследования было не только рассмотрение возможности формирования биологически значимых комплексов этих соединений с молекулой ДНК в растворе, но также еще анализ их влияния на третичную структуру макромолекулы в растворе и ее персистентную длину, а также сопоставление полученных при исследовании результатов с действием широко известного конденсирующего агента – гексамина кобальта, который индуцирует формирование тороидальных наноструктур ДНК с предварительным структурированием статистического клубка макромолекулы в растворе.

Для таких исследований необходимо использование именно высокомолекулярной ДНК. В качестве объекта исследования работали с коммерческим препаратом высокомолекулярной ДНК тимуса теленка (компания Sigma Aldrich). Исследования проводили в растворах с избытком низкомолекулярной соли (NaCl), когда подавлены электростатические взаимодействия, и ее недостатком. Базовые растворы содержали 0,005 М NaCl.

Для исследования комплексообразования соединений с ДНК использовали набор экспериментальных методов, которые дают информацию о состоянии вторичной и третичной структуры ДНК: атомная силовая микроскопия, динамическое светорассеяние, низкомолекулярная вискозиметрия, двойное лучепреломление в потоке, спектральные методы. Использовали методику, позволяющую изучить возможную конкуренцию за место связывания на ДНК изучаемых соединений с другими биологически активными агентами, молекулярный механизм взаимодействия которых с ДНК хорошо известен. В качестве таких агентов использовали ионы двухвалентных металлов, некоторые координационные соединения (например, транс- и цисплатин), ПАВ. Рассматривали также соединения палладия и кобальта с разными лигандами, что позволило выявить роль различных взаимодействий (электростатических, ван-дер-ваальсовых, водородных связей, ион-дипольных) при формировании комплексов.

Взаимосвязь самоорганизации, флуоресцентных и физико-химических свойств разбавленных систем этанол-вода

Рыжкина И.С.^{1*}, Мелешенко К.А.^{1,2}, Докучаева И.С.^{1,2}, Костина Л.А.¹

¹Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН,
Российская Федерация, 420088, Казань, ул. Акад. Арбузова, 8;

²Казанский национальный исследовательский технологический университет, Российская Федерация,
420015, Казань, ул., К. Маркса, 68.
irina.s.ryzhkina@mail.ru

В продолжение работ по установлению физико-химических закономерностей образования и функционирования самоорганизующихся разбавленных водных дисперсных систем биологически активных соединений (БАС), свойства которых, в том числе биологические, определяются главным образом строением и характеристиками водно-молекулярной дисперсной фазы (наноассоциатов) размером в сотни нм и отрицательным электрическим поверхностным зарядом [1-5], изучены самоорганизация, физико-химические

свойства, УФ поглощение и флуоресценция разбавленных систем этанол-вода в интервале расчетных концентраций этанола 10 - 1×10^{-15} % об. Аналогичные исследования проведены для водных систем в интервале от 1 до 15 десятичных разбавлений.

В качестве незаменимого биогенного вещества этанол постоянно (эндогенно) присутствует в крови в концентрациях около 1×10^{-4} М (6×10^{-4} %), выполняя разнообразные функции, участвуя в поддержании гомеостаза организма человека и животных. Экзогенное воздействие этанола на организм сопровождается разнонаправленными концентрационными профилями биоэффектов, связанных преимущественно с действием этанола на центральную нервную и иммунную системы. Известно, что водные растворы этанола в интервале высоких концентраций (20-70%) являются гидротропными структурированными системами, способными к солубилизации плохо растворимых БАС. Процесс самоорганизации разбавленных систем этанол-вода и его связь со свойствами систем до настоящего времени не исследованы.

Методом динамического рассеяния света (ДРС) нами показано, что разбавленные растворы этанола в интервале от 1×10^{-2} - 1×10^{-15} % об. являются самоорганизованными дисперсными системами, которые по мере разбавления претерпевают перестройку дисперсной фазы, сопровождающуюся немонотонным увеличением структурированности и размерной однородности, достигающей максимума при 1×10^{-6} , 1×10^{-9} - 1×10^{-12} % об. (мономодальность распределения, снижение индекса полидисперсности до 0.3, размер наноассоциатов около 150-200 нм). В этом интервале концентраций наблюдаются наиболее выраженные изменения УФ поглощения (A225 и A275), pH, удельной электропроводности (χ), редокс-потенциала (U) систем, а также максимальная интенсивность флуоресценции (I) при λ_{em} 340 нм (λ_{ex} 230 и 280 нм), которая в 2-3 раза превосходит I340 при других концентрациях. Установлена тесная корреляция между размером наноассоциатов, I340, A225 и A275, pH, χ и U систем в интервале 1×10^{-6} - 1×10^{-15} % об. этанола. Коэффициенты корреляции, характеризующие степень взаимосвязи данных величин, лежат в интервале от 0,7 до 0,8. При концентрациях этанола 1, 1×10^{-1} , 1×10^{-5} , 1×10^{-7} % об. методом ДРС структур не обнаружено, УФ поглощение и флуоресценция практически отсутствуют.

Изучение разбавленных водных систем выявило их способность по мере разбавления к структурообразованию и немонотонному изменению свойств, которые менее выражены, чем в системе этанол – вода, и в отличие от последних характеризуются практически полным отсутствием взаимосвязи размера структур и свойств систем.

Как показано ранее на примере разбавленных растворов биогенных органических и аминокислот [1,4], полученные данные позволяют прогнозировать биоэффекты разбавленных систем этанол-вода, которые могут проявляться наиболее явно в интервале 1×10^{-9} - 1×10^{-12} % об. этанола.

1. Ryzhkina I. S. et al. Fluorescence characteristics of aqueous dispersed systems of succinic acid as potential markers of their self-organization and bioeffects in low concentration range // *Environmental Technology & Innovation*. – 2021. – V. 21. – P. 101215. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101215>.

2. Ryzhkina I. S. et al. Interrelation of physicochemical, spectral, and biological properties of self-organized multi-component aqueous systems based on N-(phosphonomethyl) glycine in the low concentration range // *Russian Chemical Bulletin*. – 2021. – V. 70. – №. 1. – P. 81-90. <https://doi.org/10.1007/s11172-021-3060-3>

3. Ryzhkina I. et al. Diluted Aqueous Dispersed Systems of 4-Aminopyridine: The Relationship of Self-Organization, Physicochemical Properties, and Influence on the Electrical Characteristics of Neurons // *Frontiers in Chemistry*. – 2021. – V. 9. – P. 623860. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.623860>

4. Ryzhkina I. S. et al. L-Tryptophan Aqueous Systems at Low Concentrations: Interconnection between Self-Organization, Fluorescent and Physicochemical Properties, and Action on Hydrobionts // *Nanomaterials*. – 2022. – V. 12. – №. 11. – P. 1792.. <https://doi.org/10.3390/nano12111792>

5. Ryzhkina I. et al. Doxorubicin aqueous systems at low concentrations: Interconnection between self-organization, fluorescent and physicochemical properties, and action on hydrobionts // *Frontiers in Chemistry*. – 2022. – V. 10. DOI:10.3389/fchem.2022.1063278

Влияние высокочастотного электромагнитного излучения на распределение супероксиддисмутазы sod1 в мозге медоносной пчелы

Прибышина А.¹, Лопатина Н.¹, Зачепило Т.^{1*}

¹Институт Физиологии им. И.П. Павлова РАН;

polosataya2@mail.ru

На стрессорное влияние повышения уровня электромагнитного фона окружающей среды на биосистемы указывает ряд исследований последних лет. К организмам, чувствительным к магнитным и электрическим полям, относят многих насекомых, в частности, медоносную пчелу. Ранее было показано ухудшение пищевой возбудимости и кратковременной памяти медоносной пчелы (Лопатина и др., 2019), а также изменение

распределения белка теплового шока hsp70 в мозге медоносной пчелы (Зацепило и др., 2021) при действии высокочастотного электромагнитного излучения 2.4 ГГц. Возможным следствием действия электромагнитного излучения может быть развитие окислительного стресса, маркерами которого является повышение уровня антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталазы и др.).

Целью данной работы было изучить влияние высокочастотного электромагнитного излучения 2.4 ГГц на распределение супероксиддисмутаза 1 (sod1) в ЦНС медоносной пчелы в мозге пчелы. В данной работе использовали действие электромагнитным излучением бытового Wi-Fi роутера (1 ч) с последующим иммуногистохимическим окрашиванием срезов мозга медоносной пчелы. Далее оценивали соотношение между уровнем окрашивания тел нейронов и нейропиля грибовидных тел в экспериментальной и опытной группе.

Было показано, что у пчелы одночасовая экспозиция электромагнитным излучением Wi-Fi роутера, работающего на частоте 2.4 ГГц вызывает изменение в соотношении окрашивания тел нейронов и нейропиля грибовидных тел в мозге медоносной пчел. Полученные результаты свидетельствуют об изменении окислительно-восстановительного состояния грибовидных тел – структур мозга, отвечающих за обучение и память у насекомых. Развитие окислительного стресса в этих структурах может в значительной мере снизить уровень пищедобывательной, а, следовательно, и опылительной активности медоносных пчел.

Влияние газов на процессы замораживания-оттаивания и выживаемость клеточных культур при низкотемпературной консервации

Уграицкая С.В.^{1*}, Фесенко Е.Е.¹
¹Институт биофизики клетки РАН;
ugraitskaya@mail.ru

Сохранение биологического материала в замороженном состоянии является актуальной проблемой в связи с бурным развитием медицины и необходимостью развития долговременных криобанков. Требуется как усовершенствовать существующие подходы, разработанные в основном для консервации клеток, повышая их эффективность, так и создать принципиально новые, чтобы решить проблему обратимого замораживания таких объектов как, фрагменты тканей, изолированные органы.

Это невозможно без понимания биологических и физико-химических процессов, сопутствующих охлаждению, замораживанию и последующему оттаиванию биоматериала, который, как известно, может подвергаться при криоконсервации механическому воздействию со стороны растущих кристаллов льда и осмотическому стрессу. Изучен широкий спектр газов при низкотемпературной консервации и исследованы их криозащитные свойства. Впервые показано, что природа растворенного в жидкости газа оказывает влияние на сохранность клеточных линий HeLa и L929 при криоконсервации. Выживаемость клеток HeLa и L929 уменьшается с ростом растворимости газа в воде в ряду: He<Ne<SF₆< N₂<Ar<Kr<Xe. Гелий и неон обладают выраженными криозащитными свойствами, обеспечивая выживаемость до 30% клеток линии HeLa в среде без криозащитных агентов. Оба газа могут быть использованы для снижения концентрации классических проникающих протекторов, в частности глицерина с 10 до 3%, снижая потенциальные цитотоксические эффекты криозащитного раствора. По данным микроскопического анализа растворенные газы влияют на структуру замороженного раствора за счет образования микропузырьков при кристаллизации воды. Экспериментально обосновано, что природа растворенного газа влияет на количество и размер газовых микропузырьков в процессе замораживания раствора. Раскрыт механизм криозащитного действия гелия, основанный на замещении газов воздуха (дегазация) и уменьшении образования газовых микропузырьков во время кристаллизации за счет снижения газовой составляющей раствора, а также способности легких инертных газов растворяться во льду. Для формируемого при этом массива льда характерна тенденция к снижению вероятности растрескивания при охлаждении до минус 50°C, что положительно сказывается на сохранности замораживаемого биоматериала.

Полученные результаты представляют интерес как вспомогательный элемент для разработки и внедрения эффективных методов криоконсервации клеток, решения проблемы криоконсервации тканей и органов.

Влияние гелиевой плазменной модификации на морфо-механические и адгезивные свойства магнитоэлектрических субстратов для инженерии костной ткани

Антипова В.Н.^{1*}, Соболев К.В.¹, Омельянчик А.С.¹, Корепанова Е.П.¹, Пшеничников С.Е.¹, Левада Е.В.¹, Родионова В.В.¹

¹*Балтийский федеральный университет им. И. Канта;*
valya.antipova24@gmail.com

Регенерация костной ткани длительный и сложный процесс, сопряженный с высоким риском развития осложнений, ввиду чего необходим поиск новых эффективных методов лечения. Так, например, в тканевой инженерии все больший интерес вызывает использование функциональных субстратов, способных оказывать влияние на клеточное поведение, в том числе на скорость пролиферации и дифференциации стволовых клеток, за счет биофизической стимуляции. Для инженерии костной ткани наиболее интересным является использование биосовместимых материалов, механические и пьезоэлектрические свойства которых схожи со свойствами костной ткани, например полимер поливинилиденфторид.

Поли(винилиденфторид) (PVDF) - это фторсодержащий полукристаллический полимер, который имеет не менее пяти различных кристаллических фаз, из которых β -фаза обладает наибольшим пьезоэлектрическим откликом. Однако, 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. Существуют различные методы модификации поверхности пленок на основе PVDF (химическое травление, дефторирование-сульфирование и др.), однако наиболее оптимальным является плазменная обработка, поскольку позволяет сохранить основные физико-химические объемные свойства субстратов.

В данной работе было исследовано влияние плазменной обработки на морфо-механические и адгезивные свойства магнитоэлектрических субстратов. Наноконпозиты были изготовлены методом ракельного ножа и затем обработаны гелиевой плазмой. В качестве основы для наноконпозитов использовался PVDF, модифицированный магнитными наночастицами (CoFe₂O₄). Структурные и магнитные свойства полученных образцов были охарактеризованы с помощью рентгеновской порошковой дифракции (XRD) и вибрационного магнитометра (VSM). Морфо-механические свойства наноконпозитов исследовались до и после плазменной обработки с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Наноконпозиты были дополнительно протестированы на культуре мезенхимальных стволовых клеток человека (оценка жизнеспособности и адгезии клеток).

В данном исследовании было продемонстрировано, что гелиевая плазменная модификация способствует улучшению смачиваемости и увеличению шероховатости поверхности магнитоэлектрических субстратов на основе PVDF (более длительная обработка приводит к более выраженному эффекту), не изменяя при это магнитные и структурные свойства образцов. Кроме того, было установлено что обработка плазмой улучшает адгезивные свойства наноконпозитов на основе PVDF, что делает их интересными для использования в различных биомедицинских приложениях, таких как инженерия костной ткани.

Исследование выполнено при финансовой поддержке БФУ им. И. Канта в рамках научного проекта № 122041300142-6.

Влияние гипоксии на организацию хромосомного аппарата и когнитивные функции у дрозофилы

Никитина Е.А.^{1,2*}, Медведева А.В.², Реброва А.В.¹, Сафарова Д.Д.¹, Каровецкая Д.М.^{1,2}, Савватеева-Попова Е.В.²

¹*Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена;*

²*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН;*
21074@mail.ru

Все живые организмы находятся в непрерывном взаимодействии с внешней средой, испытывая воздействие неблагоприятных факторов, вызывающих в клетке различные повреждения. Необходимость координации реакций внутри организма и в ответ на внешнее воздействие опосредовало появление механизма временной связи, которая преобразовалась в адаптивную реакцию — условный рефлекс, связующий организм и окружающую среду. Формируя условный рефлекс, организм приспосабливается не только к внешней среде, но и

к экстремальным воздействиям. Гипоксия как экстремальное воздействие — один из самых распространенных повреждающих факторов. Поскольку мозг является наиболее зависимым от кислорода органом, чувствительную мишень гипоксии представляют когнитивные функции, неразрывно связанные с целостностью генетического аппарата. В связи с этим большой интерес представляет изучение уровня двухцепочечных разрывов (ДЦР) ДНК и способности к обучению и формированию памяти у дрозофилы - модельного организма, широко используемого в исследованиях молекулярных механизмов, лежащих в основе когнитивных функций у высших эукариот. Исследования проводили с привлечением линии дикого типа Canton-S *Drosophila melanogaster*. Для моделирования физиологического уровня гипоксии использовали барокамеру проточного типа. Частоту и профиль хромосомных перестроек определяли с помощью анафазного анализа. Способность к обучению и формированию среднесрочной памяти оценивали в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания. Анализ когнитивного поведения проводили, используя различные схемы воздействия: интактный контроль, воздействие гипоксии до, после или во время тренировки. Для обработки результатов применяли двухфакторный рандомизационный анализ. Показано достоверное увеличение частоты появления мостов, являющихся результатом ошибок репарации ДЦР при межхромосомных взаимодействиях. Это позволяет предположить, что действие гипоксии приводит к формированию ДЦР. Поскольку разрывы ДНК сопутствуют интенсивным матричным процессам при нейрогенезе и являются показателем физиологической активности нейронов, возможно, ДЦР необходимы при ремоделировании хроматина и экспрессии генов, вовлеченных в процессы формирования памяти и обучения. Полученные цитогенетические данные находятся в русле положения о единых механизмах, лежащих в основе стрессорной реакции организма и обучения. По-видимому, увеличение частоты разрывов при гипоксии способствует пространственной реорганизации хромосомного аппарата в ядре. Анализ когнитивного поведения не выявил нарушений памяти ни в одном из вариантов воздействия гипоксии. Однако, гипоксическое воздействие до тренировки приводило к достоверному ухудшению обучения по сравнению с интактным контролем и другими вариантами воздействия. По-видимому, гипоксия оказывает краткосрочный эффект на обучение, но не затрагивает механизмов формирования памяти. Полученные данные позволяют говорить о том, что запуск клеточной реакции на гипоксию влечет за собой активацию каскадов, значимых для реализации когнитивных функций.

Работа выполнена при поддержке Государственной программы РФ 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019-2030) (тема 63.1) и гранта РФФИ (№ 20-015-00300 А).

Влияние дегидротермического кросслинкинга на физические, структурные и биологические свойства Корнеопласта

Горшкова Ю.Е.^{1,2*}, Анисимов С.И.^{3,4}, Попов И.А.³, Науменко М.В.^{2,1}, Виноградов И.И.¹, Нечаев А.Н.¹, Анисимова Н.С.^{3,4}, Позябин С.В.⁵, Орлова М.Н.⁵, Шилкин А.Г.⁵

¹Объединенный институт ядерных исследований;

²Институт физики, Казанский федеральный университет;

³Глазной центр «Восток-Прозрение»;

⁴Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

⁵Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»;

Yulia.Gorshkova@jinr.ru

Тканевая инженерия – одно из последних достижений в области молекулярной и клеточной биологии, целью которой является конструирование и выращивание вне организма человека живых, функциональных тканей или органов для последующей трансплантации пациенту с целью замены или стимуляции регенерации поврежденных органов или тканей. При этом происходит регенерация ткани, а не простое замещение ее синтетическим материалом, как это происходит в случае использования имплантатов из инертных материалов, которые устраняют только физические и механические недостатки поврежденных тканей. Проблема создания искусственной сетчатки в медицине имеет критическую важность, поскольку существуют патологии (травмы, опухоли, кровоизлияния, дегенеративные процессы), вызывающие необратимые изменения сетчатки, в результате которых человек слепнет.

Строма роговицы млекопитающих имеет выраженную тенденцию к пассивной гидратации. В дистиллированной воде влагосодержание стромы роговицы может достигать 96% по массе. Однако, в

физиологических условиях влагосодержание роговицы удерживается в пределах 75-78%, что обусловлено действием эндотелиального слоя клеток роговицы, основная функция которой состоит в регулировании поступления жидкости в строму роговицы из влаги передней камеры. Известно, что основу стромы роговицы составляет коллаген I типа. Кросслинкинг коллагена (образование поперечных сшивок между полипептидными цепями) снижает способность последнего к гидратации. Дегидротермический кросслинкинг (ДТК) – образование поперечных сшивок в биоматериалах при их нагревании под вакуумом – широко распространен в тканевой инженерии, однако его влияние на свойства стромы роговицы практически не изучены, и к настоящему времени не известно ни одной попытки оценить перспективы использования таких материалов в кератопластике.

Изучена возможность управления физическими, структурными и биологическими свойствами при дегидротермическом сшивании стромальных роговичных трансплантатов на основе материала Корнеопласт. Несмотря на идентичную морфологию поверхности образцов, подверженных ДТК при различных температурах, на что указывает топология поверхности, полученная методом атомно-силового сканирования, внутренняя их структура на наноуровне различна. Структурные исследования проводились методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) на станции USAXS/SAXS/WAXS XEUSS 3.0. Полученные результаты позволили сделать следующие выводы: 1) укорочение фибрилл вдоль оси на 3 нм в зоне пересечения, происходящее при 140°C, следует признать уже критическим, приводящим к потере прочности; 2) уменьшение среднего расстояния между тройными спиралями в четвертичной структуре возможно связано с термической деградацией полисахаридов. Все это приводит к снижению эластичности, прочности трансплантата, повышению гидрофобности, снижению биосовместимости и водопроницаемости. Как следствие, образцы, обработанные при 140°C, непригодны для использования в офтальмологической хирургии. Кроме того, графты Корнеопласт не прошли тест на эпителизацию после обработки при 140°C. Одной из причин этого является крайне малая способность графтов свиньи, подверженных ДТК при 140°C, к гидратации, как было продемонстрировано методом рамановской спектроскопии (РС). Корнеопласт, обработанный при температуре 100°C и ниже, сохраняет биоинтеграционные свойства.

Влияние ионов кадмия на активность митохондрий, изолированных из проростков пшеницы (*Triticum Aestivum* L.)

Антонян А.П.¹, Погосян Г.А.^{1*}, Саргсян Э.Г.¹
¹*Ереванский государственный университет;*
g.poghosyan@ysu.am

Кадмий является одним из наиболее токсичных антропогенных загрязнителей, негативно влияющих на рост и развитие растений. Фитотоксичность тяжелого металла проявляется через ингибирование ряда физиологических и биохимических процессов жизнедеятельности растения, в том числе и путем образования активных форм кислорода (АФК), вызывающих деградацию белков, повреждение нуклеиновых кислот и перекисидацию липидов [1]. Митохондрии играют центральную роль во всех аэробных эукариотических клетках, будучи центрами дыхания и синтеза АТФ в цикле окислительного фосфорилирования [2, 3].

Кадмий является сравнительно новым загрязнителем биосферы, содержание которого в окружающей среде связано в первую очередь с деятельностью человека. С этой точки зрения, общие механизмы защиты растений от токсического воздействия тяжелого металла еще до конца не изучены. В связи с этим целью данной работы было изучение влияния малых концентраций ионов CdCl₂ (10 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ при 250С, 5 мин.) на интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность АТФазы и объем митохондрий, выделенных из проростков пшеницы для выявления возможной вовлеченности кадмия в индукцию окислительного стресса в митохондриях.

Митохондрии выделяли из 7-идневных проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта "Безостая", выращенных в чашках Петри на фильтровальной бумаге в термостате (при 230С) в темноте. Митохондрии получали методом дифференциального центрифугирования в градиенте перколла (18, 23 и 35%), приготовленного на основе среды промывания (300 мМ сахарозы, 1 мМ EDTA, 0.1% БСА, 10 мМ К-фосфатного буфера, рН 7.5) [4]. Интенсивность процессов ПОЛ определяли по накоплению малонового диальдегида-МДА, по тесту с тиобарбитуровой кислотой. Активность АТФазы определяли по концентрации выделенного неорганического фосфата по методу [5]. Измерения изменения объема или набухания митохондрий проводили при 250С на спектрофотометре СФ -65 (СССР) по изменению поглощения суспензии митохондрий при λ=520 нм. [6].

Согласно полученным данным, в присутствии кадмия по мере увеличения концентрации тяжелого металла, возрастает активность ПОЛ, то есть содержание МДА. В контрольных образцах митохондрий была зарегистрирована высокая АТФазная активность. Добавление растворов кадмия различной концентрации к суспензии митохондрий приводило к статистически достоверному (P<0.05) ингибированию АТФазной

активности вплоть до 60%. А при концентрации кадмия 30μM скорость гидролиза АТФ практически сводилась к нулю. Аналогичные изменения поглощения суспензии митохондрий при λ=520 нм, связанные с изменением объема органелл, наблюдались при концентрации ионов кадмия 20 μM, 30μM .

Таким образом, согласно полученным результатам, ионы кадмия индуцируют в изолированных митохондриях пшеницы концентарционнно зависимый окислительный стресс, что выражается в повышении содержания МДА, в угнетении АТФазной активности и в набухании митохондрий.

1. Irfan M., Hayat S., Alyemeni M. Soil Cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations, Saudi J. Sci., 2013, 20(1), p. 1-10.

2. Morelli A., Rosano C. A True Symbiosis for the Mitochondria Evolution, Bioenergetics, 2016, v. 5, № 2, p. 137, DOI: 10.4172/2167-7662. 1000137.

3. Pastore D. The Enigmatic Metabolic Transport in Plant Mitochondria Lacking Proton Motive Force- news from Durum Wheat Mitochondria, Bioenergetics, 2014, 3:3, DOI: 10.4172/2167-7662. 1000e121.

4. Шугаева Г., Выскребенцева Э. И. Выделение интактных митохондрий из корнеплодов сахарной свеклы, Физиол. растений, 2018, т. 29, с. 799-803.

5. Ames B. N. Methods in Enzymology, 1966, № 8, p. 115-118.

6. Chagra A., Djabar R., Rouabhi R., Berrebbah H. Cadmium Induced Changes in Metabolic Function of Mitochondrial Isolated from Potato Tissue (Solanum tuberosum L.), Amer. J. of Biochem. And Biotech., 2009, 5 (1). p. 35-39.

Влияние миллиметровых электромагнитных волн на перекисное окисление липидов и хемилюминесценцию мембран эритроцитов крови человека *in vitro*

Вардеванян П.О.¹, Погосян Г.А.^{1*}, Микаелян М.С.¹

¹Ереванский государственный университет;

g.poghosyan@ysu.am

Электромагнитные волны биосферы- неотъемлемая часть внешних факторов, воздействующих на живые организмы [1]. В настоящее время актуальными являются исследования, посвященные изучению влияния электромагнитных волн миллиметрового диапазона (ММ ЭМВ) на биологические системы разного уровня организации. В наши дни интенсивность этих волн постоянно растет, в связи с ростом числа искусственных источников электромагнитных волн. Следовательно большое значение приобретают работы, направленные на выявление возможных последствий влияния ММ ЭМВ 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 и подвижность эритроцитов 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].

Вместе с тем до последнего времени первичные мишени восприятия ММ ЭМВ и механизмы его действия в биологических системах однозначно не выяснены. В ряде исследований показано, что слабые физические воздействия могут изменить свойства водных растворов и при этом может меняться активность кислородзависимых реакций в клетках с образованием активных форм кислорода (АФК) – супероксидного радикала (O₂), перекиси водорода (H₂O₂) и гидроксильного радикала (ОН.). Взаимодействие последних с ненасыщенными жирнокислотными остатками мембранных липидов индуцирует образование пероксидных радикалов липидов-RO₂, в результате рекомбинации которых образуется неустойчивый тетроксид, распадающийся с выделением кванта света хемилюминесценции (ХЛ) [5].

В представленной работе проведено изучение влияния ММ ЭМВ на ПОЛ - содержание малонового диальдегида (МДА-по тесту с тиобарбитуровой кислотой) и интенсивность H₂O₂ -индуцированной ХЛ мембран эритроцитов, выделенных из цельной 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 ЭМВ с частотой 41.8 ГГц и 51.8 ГГц с продолжительностью 5, 10 и 20 мин. Выбор частоты 41,8 ГГц основан на том, что электромагнитные волны в 41.8-42.2 ГГц интервале имеют ярко выраженный биологический эффект, а частота 51.8 ГГц является резонансной для молекул воды [1]. После облучения кровь разделяли центрифугированием. Эритроциты выделяли в градиенте плотности фиколл-верографин с последующим отмыванием забуференным физиологическим раствором. Эритроцитарные мембраны получали по методу [6]. В качестве источника ММ ЭМВ использовали генератор Г4-141 (“Исток”, Россия) с рабочим интервалом частот 37.5-53.5 ГГц и плотностью

потока мощности ≈ 0.64 мВт/см² при мощности 8 мВт на выходе. Регистрацию ХЛ образца проводили на хемилуминометре LB 9509 (Berthold Technologies, Germany).

В результате проведенных экспериментов было установлено изменение концентрации МДА и интенсивности H₂O₂ -индуцированной ХЛ мембран эритроцитов в зависимости от частоты облучения ММ ЭМВ и длительности экспозиции. Показано также, что при облучении частотой 41.8 ГГц воздействие ММ ЭМВ выражено гораздо слабее, чем при облучении частотой 51.8 ГГц, что утверждает роль воды во влиянии ММ ЭМВ, поскольку частота 51.8 ГГц является резонансной частотой для воды. При облучении цельной крови в течении 5 мин. ЭМВ с частотой 41.8 и 51.8 ГГц не наблюдалось статистически достоверных различий содержания МДА в эритроцитарных мембранах по сравнению с контролем. Воздействие ЭМИ с частотой 41.8 ГГц продолжительностью 10 и 20 мин. приводило к небольшому увеличению МДА и интенсивности ХЛ, однако статистически значимых различий не наблюдалось. 10-и и 20-минутные экспозиции ММ ЭМВ с частотой 51.8 ГГц, резонансной для воды, индуцировали статистически достоверное увеличение концентрации МДА ($P < 0,05$) и светосуммы H₂O₂ -индуцированной ХЛ в эритроцитах.

Результаты, представленные в данной работе показывают, что воздействие ММ ЭМВ нетепловой интенсивности индуцирует изменения метаболизма клетки, что говорит о стрессовом воздействии фактора на клетки красной крови человека *in vitro*.

1. Девятков Н. Д., Голант М. В., Бецкий О. В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности- Москва, Радио и связь, 1991, 198 с.

2. Погосян, Г. А., Шагинян М. А., Микаелян М. С. Влияние миллиметровых электромагнитных волн на перекисное окисление липидов в эритроцитах крови человека *in vitro*, 2022, Материалы XVII международной научной конференции, БФФХ- 2022, «Актуальные вопросы биологической физики и химии», Севастополь, 19-23 сентября 2022 г., с. 41-42.

3. Kinemaki M., Shimizu H. O., Inujima H., Miyake T. Shimizu K.- Analysis o Red Blood Cell Movement in Whole Blood Exposed to DC and ELF Electric Fields, 2022, Bioelectromagnetics, 43: 149-159, DOI: 10.1002/ bem. 22395.

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. Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилуминесценция, 2009, Успехи биолог. химии, № 49, с. 341-388.

6. Dodge J. T., Mitchell C.V., Hanahan D. J. The Preparation and Chemical Characteristics of Hemoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes, Arch. Biochem. Biophys. Acta, 1963, v. 100, p. 119-123.

Влияние модулированного магнитного поля на биополимеры

Текуцкая Е.Е.¹, Шпаков И.А.^{1*}, Панченко И.А.¹

¹Кубанский Государственный Университет;
hpdefender@yandex.ru

Изучение влияния электромагнитного излучения на различные биологические объекты – важная задача. Электромагнитное поле окружает человека на протяжении всей его жизни. Исследование механизмов влияния данного излучения на биополимеры даст понимание влияния на весь организм.

Нами было исследовано влияние модулированного электромагнитного поля на растворы готовых коммерческих препаратов: водный раствор ДНК — лекарственный препарат «Деринат», водный раствор человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) — лекарственный препарат, производства г. Москва.

Концентрация исходного раствора ДНК – 2,5 г/мл, а исходного раствора ЧСА — 20%. Итоговая концентрация водного раствора ДНК – 1,25 г/мл, а для водного раствора ЧСА – 2%. Для достижения данных концентрации растворы исследуемых веществ разбавляли дистиллированной водой.

Проведена обработка водных растворов ДНК и ЧСА ЭМП в диапазоне частот от 1 до 60 Гц. Проведено облучение водных растворов ДНК и ЧСА модулированным электромагнитным полем. Спектры флуоресценции были получены с помощью спектрофотометра Hitachi F-2700. Обработка электромагнитным полем низкой частоты происходила в экранированной камере, излучение генерировалось генератором сигналов АК ИП 3408/3.

Анализ полученных зависимостей, показал частоты облучения электромагнитного поля, демонстрирующих максимальное влияние на флуоресцентные характеристики. Такими частотами при обработке ЭМП КНЧ для водного раствора ДНК – 25 Гц при всех исследуемых в данной работе длинах волн возбуждения, а для водного раствора ЧСА – 40 Гц для длин волн возбуждения 290-295 нм, а для 300-305 нм – 5 Гц. При обработке модулированным ЭМП - для водного раствора ДНК – при значении несущей частоты 1 КГц, а

модулирующей – 1 Гц. Для водного раствора ЧСА – при длине волны возбуждения 290 нм – 1 КГц, модулирующая 1 Гц, при 295 нм – 3 КГц, модулирующая – 35 Гц, при 300 нм – 3 КГц, модулирующая – 5 Гц, а при 305 нм – 3 КГц, модулирующая 15 Гц.

Влияние низкоинтенсивных импульсного и непрерывного лазерных излучений и иммуномодуляторов на мышей *in vivo*

Дюкина А.Р.^{1*}, Заичкина С.И.¹, Поцелуева М.М.¹, Юсупов В.И.²

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

²Институт фотонных технологий Федерального научного исследовательского центра “Кристаллография и фотоника” РАН, г. Москва, г. Троицк, Россия;

Dyukina@rambler.ru

Исследования закономерностей воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения на живой организм относятся к одной из приоритетных областей науки. Параллельно с внедрением лазерной терапии в медицинскую практику проводятся исследования по выяснению первичных механизмов взаимодействия лазерного света с живой материей. Однако известно, что различные ионизирующие и неионизирующие излучения, как природного, так и техногенного характера, являются факторами экологического риска. Поиск способов выявления действия этих факторов является актуальной проблемой современной радиоэкологии. В настоящее время ведутся интенсивные исследования по поиску нефармакологических способов лечения различных заболеваний с помощью активации биологического резерва устойчивости к различным повреждающим воздействиям, которые могут привести к генетическим нарушениям, злокачественному перерождению клеток и возникновению дефектов развития у потомства.

Исходя из наших многочисленных исследований действия низких доз ионизирующей радиации на разные объекты *in vitro* и *in vivo*, мы предполагаем, что наиболее перспективным для выявления и изучения этого резерва устойчивости является использование феномена радиационного адаптивного ответа, который заключается в том, что предварительное облучение объекта в малых адаптирующих дозах гамма- или рентгеновского излучения приводит к снижению чувствительности к последующему выявляющему воздействию больших доз этих же воздействий (0.1 Гр + 1.5 Гр). Проблема поиска различных агентов физической или химической природы, способных, как и малые дозы ионизирующей радиации, активировать естественную защиту организма, является до сих пор актуальной.

Цель настоящей работы – выявление клеточных реакций в цельной крови и лимфоидных тканях мышей при облучении различными физическими и химическими агентами: с помощью анализа клеточного состава и уровня продукции активных форм кислорода в цельной крови, а также клеточности лимфоидных органов (тимуса и селезенки). Работу проводили на самцах мышей линии SHK. В качестве физических агентов использовали низкие дозы ионизирующего (рентгеновские лучи (0.1 Гр, 0.5 Гр) и неионизирующих излучений (фемтосекундный лазер (АВЕСТА, РФ) (525 нм, 200 фс, 70 МГц) при мощностях дозы 0.05, 0.5 и 5 мВт, и экспозиции облучения от 1 до 50 с, что соответствует плотности потока энергии 0.1 – 52 мДж/см²); непрерывный зеленый лазер (532 нм, 3.7 мВт, 1, 5 и 10 с, что соответствует плотности потока энергии 4.8, 24 и 48 мДж/см²)) и химических агентов – иммуномодуляторы CaCl₂ (0.4 % раствор в течение 6 суток) и дибазол (0.002% раствор в течение 6 суток). Через сутки по отработанной ранее нами схеме индукции радиационного адаптивного ответа все группы животных дополнительно облучали рентгеновским излучением в дозе 1.5 Гр (60 мДж/см²). На каждую экспериментальную точку использовали не менее 5 мышей.

С помощью стандартных методик был проведен гематологический анализ, определен уровень продукции АФК в цельной крови методом люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции (СНЕМЛУМ-12, Россия) и индекс относительной массы тимуса и селезенки.

Обнаружено, что при всех вариантах обработки мышей химическими и физическими агентами клеточный состав крови, уровень продукции АФК в цельной крови и клеточность лимфоидных органов не отличались от спонтанного фона.

Анализ клеточности лимфоидных органов показал, что предобработка животных всеми изученными агентами приводила к снижению радиочувствительности при последующем облучении рентгеновским излучением в дозе 1.5 Гр по сравнению с неподобработанными животными, т.е. индекс массы лимфоидных органов оставался в пределах контрольных значений, кроме групп предварительно облученных рентгеновским излучением в более высокой дозе 0.5 Гр, фемтосекундным лазерным излучением в дозе 2.1 и 52 мДж/см² (0.5 мВт), 21 и 52 мДж/см² (5 мВт) и непрерывным зеленым лазерным излучением в дозе 48 мДж/см² (3.7 мВт) не защищало от действия последующего облучения в дозе 1.5 Гр, т.е. приводило к снижению индекса массы органа по сравнению с необлученным контролем.

Определение уровня продукции АФК показало, что индекс активации, рассчитанный по отношению индуцированной светоплощади к спонтанной, был достоверно выше у всех предобработанных групп мышей, что говорит об активации резерва естественной защиты по сравнению с группой животных, облученных только в дозе 1.5 Гр. В то же время предварительное облучение животных рентгеновским излучением в дозе 0.5 Гр или фемтосекундным лазерным излучением в дозе 2.1 и 52 мДж/см² (0.5 мВт), 21 и 52 мДж/см² (5 мВт) и непрерывным зеленым лазерным излучением в дозе 48 мДж/см² (3.7 мВт) не увеличивало индекс активации по сравнению с непредобработанными животными. Обнаружено изменение клеточного состава крови в зависимости от дозы и мощности излучения. Защитный эффект всех изученных агентов выявляется в одинаковом узком диапазоне доз и коррелирует с образованием АФК, что указывает на схожий механизм его индукции и на возможность активации резерва естественной защиты организма.

Таким образом, полученные результаты по исследованию защитных свойств различных агентов на мышах, облученных рентгеновским излучением, зависят от величины и качества дозы активирующего воздействия, выбранных тканей и методов и могут служить дополнительным чувствительным тестом для выявления повреждений от различных экологических факторов. По количеству факторов, запускающих процессы адаптивного ответа, свидетельствующих об активации естественной защиты организма и количеству реакций организма в одной и той же области потоков энергии, нам кажется, что триггерный механизм естественной защиты организма неспецифичен.

Влияние низкочастотного магнитного поля на физическую выносливость лабораторных животных в условиях стрессовой нагрузки

Лопаткина Н.В.^{1*}, Девяткова Н.С.¹

¹Российский Федеральный Ядерный Центр Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной физики;
natali.lopatkina.80@mail.ru

Важнейшим направлением в решении проблемы снижения рисков функциональных нарушений, вызываемых острой стрессовой нагрузкой, является поиск средств профилактики и реабилитации, стимулирующих мобилизацию собственных функциональных резервов организма. Одним из таких средств может быть низкочастотное магнитное поле (НМП).

В работе представлены результаты экспериментальных исследований действия вихревого низкочастотного (до 110 Гц) магнитного поля с максимальным значением магнитной индукции (B_{max}) до 3,15 мТл на физическую выносливость лабораторных животных в условиях острой стрессовой нагрузки.

Моделирование условий острого стресса проводили по методу «Вынужденное плавание с грузом до полного утомления» с троекратным нагрузочным плаванием животных. Критерием работоспособности являлось время плавания животных до «полного утомления» в течение 180...1200 секунд [-].

Эксперимент проводили на половозрелых белых аутбредных (нелинейных) крысах - самцах массой от 260 до 320 граммов в количестве 64 особей, распределенных на экспериментальные и контрольную группы. Экспериментальные группы различались по вариантам действия НМП: до моделирования стрессовой нагрузки - пятидневное (один раз в сутки) прекодиционирующее с $B_{max}=3,5$ мТл; в процессе нагрузки между второй и третьей попытками - одноразовое с $B_{max}=1,4$ мТл; комбинированное, т.е. как до, так и в процессе нагрузки при максимальных значениях магнитной индукции 3,5 мТл и 1,4 мТл, соответственно. В контрольной группе действие НМП было мнимым.

Полученные результаты в контрольной группе подтверждают, что состояние «утомление-восстановление» в условиях острой стрессовой нагрузки проходило по стандартной схеме: достоверное снижение (в 2,2 раза, $p \leq 0,05$) времени плавания животных во второй попытке плавания относительно первой с последующим ростом (в 1,2 раза, $p \leq 0,005$) исследуемого показателя в третьей попытке относительно второй, а также отсутствием достоверных отличий между временем плавания в третьей и в первой попытках.

В экспериментальной группе с прекодиционирующим действием НМП время плавания животных во всех трех попытках достоверно не отличалось. Можно предположить, что НМП является «актопротектором», повышающим физическую выносливость животных к неблагоприятным условиям стрессовой нагрузки.

Изменение исследуемого показателя в группе животных с применением НМП в процессе нагрузки между второй и третьей попытками было близко к контрольной группе: снижение (в 2,4 раза, $p \leq 0,005$) времени плавания во второй попытке относительно первой и повышение (в 1,1 раза, $p \leq 0,05$) в третьей попытке относительно второй. Однако, время плавания животных в третьей попытке было достоверно ниже (в 2,1 раза, $p \leq 0,05$), чем в первой попытке. Можно предположить, что единичное воздействие магнитного поля на утомленных животных являлось дополнительным нагрузочным фактором, «снижающим» восстановительные процессы организма.

В группе животных с комбинированным воздействием НМП между первой и второй попытками отметили достоверное снижение (в 2,4 раза, $p \leq 0,002$) исследуемого показателя, т.е. для «сдерживания» развития состояния усталости после первой плавательной нагрузки эффективности магнитного поля было недостаточно. Следовательно, прекодиционирующее действие НМП может показывать нестабильный «актопротекторный» эффект. Дополнительное применение НМП в процессе нагрузки между второй и третьей попытками привело к увеличению (в 1,8 раза, $p \leq 0,002$) времени плавания в третьей попытке относительно второй. Кроме того, время плавания животных между третьей и первой попытками достоверно не отличалось. Полученные результаты доказывают, что низкочастотное магнитное поле, в зависимости от варианта применения, способствует сохранению физической устойчивости животных в условиях стрессовой нагрузки.

Таким образом, вихревое низкочастотное (до 110 Гц) магнитное поле с максимальным значением магнитной индукции до 3,15 мТл является мобилизующим фактором сохранения функциональных резервов и физической выносливости организма животных в условиях острого стресса. Причем, реализацию стабильности полученных эффектов целесообразно осуществлять в варианте комбинированного воздействия, включающем прекодиционирующее и дополнительное действие НМП с максимальными значениями магнитной индукции 3,5 мТл и 1,4 мТл, соответственно.

1. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010. – 358 с.

2. Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., et.al. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment // Eur.J. Pharmacol. 1978. V. 47. – P. 379 - 391.

3. Волчегорский И.А. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма / Волчегорский И.А. Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. // Челябинск: Изд-во Челябинского гос. пед. ун-та, 2000. – С. 13 – 15.

4. Ковалева М.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Применение теста «Принудительное плавание» при проведении доклинических исследований / Международный вестник ветеринарии, № 4, 2015. – С. 90 – 95.

Влияние постоянного освещения на стресс реактивность гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы у приматов, различающихся по адаптивному поведению, в разные возрастные периоды

Гончарова Н.Д.^{1*}, Чигарова О.А.¹, Оганян Т.Э.¹, Тимошенко Н.В.¹
¹Научно-исследовательский институт медицинской приматологии;
ndgoncharova@mail.ru

Гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система (ГГАС)— ключевой регулятор эндокринной и поведенческой стресс адаптации в ответ на угрозу. Однако ее дисфункции, сопровождаемые нарушениями в продукции глюкокортикоидных гормонов, могут играть важную роль в развитии различных стресс-зависимых заболеваний, включая преимущественно ассоциированные со старением, например, ментальные, метаболические, когнитивные, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные и др. В последние десятилетия отмечен существенный рост как стрессогенности окружающей среды, так и заболеваемости стресс-ассоциированной патологией. Среди стрессовых факторов окружающей среды большое значение отводится нарушениям в природном цикле свет - темнота, особенно с повышением освещенности в ночное время. В то время как разрыв ритма свет - темнота давно известен как мощный поведенческий стрессор, до сих пор остается чрезвычайно плохо изученными функция ГГАС в условиях постоянного освещения (CL), особенно ее реакция на другие стрессовые воздействия, в частности, на психоэмоциональное стрессовое воздействие, с учетом возраста и особенностей стресс поведения. Цель настоящего исследования - изучение влияния хронического круглосуточного освещения на реакцию ГГАС на острое психоэмоциональное стрессовое воздействие (ОСВ) с учетом возраста и особенностей стресс поведения на модели лабораторных приматов.

В экспериментах было использовано 35 молодых взрослых (5-8 лет) и 23 старых (21-33 года) самок макак резусов (*Macaca mulatta*). Эксперименты проводили в летнее время, когда для этого вида приматов не характерны овариальные циклы. Половину животных составляли особи с контрольным стандартным поведением (SB), а другую половину — особи с избыточно тревожным (беспокойным) и депрессивно-подобным поведением (DAB). После периода адаптации к условиям проживания в индивидуальных метаболических клетках и процедуре взятия образцов крови, а также после контрольного базального периода половина молодых и старых животных (опытные) находились в условиях CL (LED lamp "Navigator" 71 302 NLL-G-T8-18-230-4K-G13, Limited Liability Company "TM Navigator", Moscow, Russia; made in China – Xiamen Neex Optical Electronic Technology CO., LT; в течение 4 - 8 недель, 330-400 lux), а другая половина молодых и старых животных (контрольные) — при стандартном освещении (SL) с естественным режимом: свет (днем) — темнота (ночью). Все животные

подвергались ОСВ (ограничению подвижности в течение 2-х час в метаболических клетках с началом в 15.00), функциональным тестам с введением кортиколиберина (CRH) и аргинина-вазопрессина (АВП), а также изучению циркадианных ритмов секреции кортизола и пинеального гормона мелатонина.

Впервые был продемонстрирован ингибирующий СЛ на реакцию коры надпочечников на ОСВ у молодых половозрелых и старых самок макак резусов. Хотя ингибирование функции коры надпочечников было отмечено у всех экспериментальных животных, несмотря на возраст и поведение, механизм этого феномена, по-видимому, является зависимым от возраста. Так, молодые животные характеризовались ингибирующим эффектом СЛ как на величину подъема секреции кортизола, так и на величину подъема уровня АКТГ в плазме крови и отсутствием этих эффектов у контрольных животных с нормальным ритмом свет-темнота. Кроме того, снижение величины подъема уровня АКТГ предшествовало снижению величины подъема концентрации кортизола. Таким образом, можно полагать, что ингибирующий эффект СЛ на секрецию кортизола у молодых приматов происходит вследствие ингибирования секреции АКТГ. В свою очередь, ингибирующий эффект СЛ на секрецию АКТГ, похоже, опосредован ингибированием АКТГ - стимулирующих эффектов АВП, одного из центральных драйверов ГАС, так как функциональный тест с АВП в условиях СЛ выявил ингибирующее действие СЛ на секрецию АКТГ и кортизола, аналогичное ОСВ. У старых животных ингибирующий эффект СЛ на величину подъема уровня кортизола в ответ на ОСВ был отмечен преимущественно в отсутствующих соответствующих изменений в подъеме уровня АКТГ. Возможно, у старых животных ингибирующий эффект СЛ на реакцию коры надпочечников на ОСВ опосредуется трансмиссией световых сигналов из супрахиазматического ядра гипоталамуса, главного регулятора биоритмов в организме, прямо в надпочечники с помощью экстрагипофизарного нервного пути без соответствующей активации гипоталамо-аденогипофизарной оси. Этот вывод подтверждается результатами тестов с CRH и АВП, которые не выявили статистически значимого ингибирующего действия СЛ на секрецию АКТГ и кортизола у старых животных. Было отмечено также деструктивное влияние СЛ на циркадианный ритм концентрации кортизола в плазме крови при отсутствии существенных изменений в секреции мелатонина.

Выявленный феномен ингибирующего влияния СЛ на стресс реактивность коры надпочечников может быть использован для коррекции повышенной уязвимости организма к ОСВ, отмеченной у индивидов с тревожным и депрессивно-подобным стресс поведением. Кроме того, результаты данного исследования предостерегают о возможности снижения адаптационных способностей организма у здоровых индивидов с стандартным поведением в условиях продолжительной непрерывной экспозиции свету.

Ключевые слова: психоэмоциональный stress, гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система, мелатонин, хроническое круглосуточное освещение, поведение, старение, макаки резусы

Влияние реверберации на стратегию локационного поиска дельфинами (*Tursiops truncatus*) объектов на разных глубинах акватории

Ахи А.В.^{1*}

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН;*
andrey.akhi@gmail.com

Реверберация, как процесс отражения и рассеяния различными неоднородностями звуковой волны, приводящий к послезвучанию, затрудняет восприятие акустической информации. В морской среде существует объемная, поверхностная и донная реверберации. Объемная реверберация в толще воды обычно невелика, если нет большого количества биологических рассеивателей (рыб, планктона и т.п.). Поверхностная реверберация происходит из-за рассеяния звука колеблющейся поверхностью моря и большого количества растворенных в верхнем слое воды воздушных пузырьков. Она вызывает мощную помеху, которая тем больше, чем спокойнее море. Эта помеха маскирует объект поиска, находящийся вблизи поверхности. Донная реверберация возникает из-за рассеивания звуковой энергии от неоднородностей и неровности дна (камни, твердые грунты). Она акустически маскирует предметы, лежащие на дне или находящиеся в слое морских осадков. Наличие реверберации является проблемой для слуховых систем эхолоцирующих морских животных, таких как дельфины. Трудность заключается в том, что реверберация, как ответная акустическая реакция среды, происходит на той же частоте, что и излученный эхолокационный импульс. Поэтому недостаточно просто перейти в другой от помехи частотный диапазон, нужна более комплексная отстройка. Как показали исследования, она у дельфинов не только эхолокационная, но и поведенческая.

В наших исследованиях была поставлена задача оценить возможность адаптации эхолокации и поведения афалин при поиске, обнаружении и идентификации объектов, находящихся на разных глубинах акватории, в том числе под слоем морских осадков, с различной интенсивностью реверберации. Опыты проходили в свайно-сетевом вольере морской бухты по поведенческой методике с пищевым подкреплением в условиях свободного

плавания животных. Перед дельфином ставилась задача не только обнаружить положительную мишень (стальной цилиндр высотой 120 мм, диаметром 120 мм, толщиной стенок 5 мм), но и отличить ее от отрицательной мишени, тех же размеров, но из латуни.

Объемная реверберация для эхолокации дельфинов проблемы обычно не представляет. В толще воды дельфин использует обычные (наиболее комфортные для него) эхолокационные импульсы, короткие по длительности (10-12 мкс) с широкополосным энергетическим спектром, с верхней границей до 140-170 кГц [1].

Наши исследования [2] показали, что в начале поиска цели, находящейся вблизи поверхности, дельфин излучает обычный широкополосный (до 170 кГц) сигнал короткой длительности (10-12 мкс). После обнаружения мишени при ее идентификации, как более сложной задачи, дельфин изменяет структуру эхосигнала: сужает его спектр по верхней границе до 40-60 кГц и увеличивает его длительность до 45 мкс, увеличивая так же амплитуду сигнала.

Было установлено [3], что при поиске цели в придонной области дельфин переходит от импульсов, применяемых им при локации в толще воды, к сигналам со смещенным спектром в область низких и средних частот до 100 кГц с максимумом в районе 50 кГц. Длительность импульса возрастает до 15 мкс. Если объект скрыт слоем морских осадков, что еще более затрудняет обнаружение и распознавание, происходит дальнейшее изменение структуры сигнала. Эффективная полоса спектра сужается до 80 кГц с максимумом в районе 20 кГц. Длительность сигнала увеличивается до 17-20 мкс, а его амплитуда возрастает в полтора раза по сравнению с сигналами при поиске на дне и в четыре раза по сравнению с поиском в толще воды. Кроме частотной отстройки и выбора частотного диапазона, менее подверженного затуханию, это увеличивает энергию сигнала, что бы компенсировать его ослабление при затухании и многочисленных отражениях.

Кроме того, что сонар дельфина способен адаптивно менять три параметра локационного импульса – длительность, частоту и интенсивность, было показано [3, 4], что дельфин меняет и поведенческую стратегию поиска, переходя от линейного движения к движению по более сложной траектории. При идентификации мишени дельфин совершает над ней вращательные движения, постепенно приближаясь к ней по поверхности конуса с вершиной в точке мишени. Это позволяет ему находить оптимальное место и угол локации, необходимые для получения полной информации об объекте в грунте, необходимой для его распознавания.

Работа выполнена в рамках госзадания № 122022600167-5 на 2023 г.

Ключевые слова: дельфин, локация, поиск, идентификация, спектр сигнала.

Литература:

1. Дубровский Н.А. Эхолокационный анализатор черноморской афалины// Черноморская афалина *Tursiops truncatus ponticus*. Морфология, Физиология. Акустика. Гидродинамика. Под. ред. Соколова В.Е., Романенко Е.В. М. 1997. 672 с.

2. Зайцева К.А., Королев В.И., Кривченко А.И., Ахи А.В., Бутырский Е.Ю. Способность дельфинов (*Tursiops truncatus*) целенаправленно изменять спектрально-временные параметры локационных сигналов // Журн. эвол. биохим. физиол. 2019. Т. 55. №3. С. 211-214. DOI:10.1134/S0022093019030098.

3. Zaitseva K.A., Korolev V.I., Akhi A.V., Akhi A.A. Adaptation of dolphin's (*Tursiops truncatus*) location signals when searching for and identifying objects hidden by sea sediments. *Bioacoustics*. 2021. V. 31. №5. P. 535-544. DOI: 10.1080/09524622.2021.1994467.

4. Zaitseva K.A., Korolev V.I., Akhi A.V., Butyrskiy E.Yu. Detection of targets masled by marine sediments in dolphins *Tursiops truncates*. // J. Evol. Biochem. Physiol. 2020.V. 56. №6. P. 76-81. DOI: 10.31857/S004445292006011X.

Влияние редкоземельных металлов на кальций-зависимые процессы в миокарде

Коротков С.М.¹, Соболев К.В.^{1*}

¹ИЭФБ РАН;

peep9@yandex.ru

Тяжелые металлы уверенно занимают второе место по степени опасности, уступая пестицидам. Известно, что уровень фактора техногенного обогащения тяжелыми металлами значительно увеличился в последнее время, что особенно негативно влияет на людей с сердечно-сосудистыми и нервными патологиями. Острые или хронические отравления могут возникать при контакте с тяжелыми металлами через загрязненный воздух, воду, почву и потребительские товары.

Экспоненциальное использование редкоземельных металлов в промышленности и плохое управление процессами утилизации отходов, содержащих соединения этих металлов, вызывает серьезные опасения по поводу качества и безопасности окружающей среды. Нежелательной особенностью редкоземельных металлов является их способность к биоаккумуляции [1, 2], что может значительно увеличивать их токсичность. Причем, концентрация редкоземельных металлов, например, La³⁺ в биологических объектах не снижается после

прекращения воздействия, что свидетельствует о длительном биологическом периоде полувыведения этого металла из организма [2, 3].

Цель – исследовать действие редкоземельных металлов на сердечно-сосудистую систему и энергетику митохондрий.

Методы - исследования проводятся на изолированных митохондриях, на сократительной модели сердца и сосудов, а также на выделенных кардиомиоцитах.

Результаты - нами показано, что лантаноиды (La^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Gd^{3+}) при больших, миллимолярных концентрациях обладают отрицательным инотропным и хронотропным эффектами, который проявляется в снижении амплитуды и частоты спонтанных сокращений, соответственно. При этом, лантаноиды слабо влияют на дыхание изолированных митохондрий, находящихся в состоянии 3 или 3РДНФ (разобценное 2,4-динитрофенолом, ДНФ). Например, в отличие от Cd^{2+} , лантаноиды не способны к прочному связыванию с тиоловыми группами дыхательных ферментов. Лантаноиды могут оказывать влияние на ионную проницаемость внутренней мембраны митохондрий и усиливать активный транспорт K^{+} в митохондриальный матрикс.

В предварительных экспериментах нами впервые обнаружено, что при низких концентрациях (менее 0.2 мМ) лантаноиды могут стимулировать сердечную деятельность как в норме, так и в условиях ингибирования функций митохондрий с помощью азидата натрия, тем самым, обнаруживая эффекты прекодиционирования. Не исключено, что данный эффект связан с увеличением активного транспорта K^{+} в митохондриальный матрикс и соответствующим снижением Ca^{2+} перегрузки митохондрий.

Заключение, обнаруженные нами отрицательные инотропный и хронотропный эффекты лантаноидов вероятно, в большей степени, обусловлены влиянием ионов этих металлов на кальций-зависимые процессы в кардиомиоцитах, включая митохондрии [4-6]. В миллимолярных концентрациях лантаноиды могут блокировать систему возбуждения-сокращения в миокарде, а именно первоначальный вход Ca^{2+} в сердечную клетку.

Литература

[1]. Pagano G, Aliberti F, Guida M, Oral R, Siciliano A, Trifuoggi M, Tommasi F (2015) Rare earth elements in human and animal health: state of art and research priorities. *Environ Res* 142:215–220.

[2]. Kang, J., & Kang, A. M. (2020). Trend of the research on rare earth elements in environmental science. *Environmental science and pollution research international*, 27(13), 14318–14321. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08138-z>

[3]. Das T, Sharma A, Talukder G (1988) Effects of lanthanum in cellular systems. A review. *Biol. Trace Elem Res* 18:201-228. <https://doi.org/10.1007/BF02917504>

[4]. Korotkov SM, Sobol KV, Shemarova IV, Furaev VV, Shumakov AR, Nesterov VP (2016) A comparative study of the effects of Pr^{3+} and La^{3+} ions on calcium dependent processes in frog cardiac muscle and rat heart mitochondria. *Biophysics* 61:733-740. <https://doi.org/10.1134/S0006350916050122>

[5]. Korotkov SM, Sobol KV, Schemarova IV, Furaev VV, Novozhilov AV, Nesterov VP (2019) Effects of Nd^{3+} on calcium-dependent processes in isolated rat heart mitochondria and frog heart muscle. *Biochemistry (Moscow), Suppl A: Membr Cell Biol* 13, 161–197. <https://doi.org/10.1134/S1990747819070018>

[6]. Korotkov SM, Sobol KV, Schemarova IV, Novozhilov AV, Nikitina ER, Nesterov VP (2020) Effects of Gd^{3+} and Ca^{2+} on frog heart muscle contractility and respiration, swelling and inner membrane potential of rat heart mitochondria. *J Evol Biol Biochem Physiol* 56, 541–549. <https://doi.org/10.1134/S0022093020060071>

Работа выполнена с использованием средств государственного бюджета по госзаданию по теме № 075-00967-23-00.

Влияние слабых магнитных полей на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами

Новиков В.В.^{1*}, Яблокова Е.В.¹, Фесенко Е.Е.¹

¹ИБК РАН - ФИЦ ПНЦБИ РАН;

docmag@mail.ru

Показано, что воздействие магнитного экранирования на перитонеальные нейтрофилы вызывает снижение внутриклеточной продукции АФК в гипомагнитных условиях (ГМУ), регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123. В этих экспериментах обнаружено, что действие гипомагнитного поля проявляется на нейтрофилах без их дополнительной стимуляции химическими активаторами респираторного взрыва и, следовательно, механизм такого действия может быть не связан с нарушением ответа нейтрофилов на эти стимулы. Мы также использовали другой метод, активированную хемиллюминесценцию с селективным зондом для супероксида, люцигенином, для оценки способности нейтрофилов к продукции радикалов после воздействия ГМУ. Внимание было уделено определению значений остаточного статического магнитного поля (СМП), при которых могут

быть воспроизведены эффекты ГМУ. Предварительная инкубация суспензии нейтрофилов в «нулевом» магнитном поле (<0,02 мкТл) приводила к достоверному снижению интенсивности люцигенин-зависимой хемиллюминесценции (примерно на 30%). При увеличении постоянного поля до 2,5 мкТл этот эффект исчезал, но при значении СМП = 7 мкТл появлялся снова; при 30 и 44 мкТл эффект отсутствовал (значение соответствовало значению СМП в контроле). Такой полиэкстремальный характер зависимости ответа на слабое СМП был отмечен и в экспериментах на нейтрофилах при регистрации продукции АФК методом флуоресцентной спектроскопии. Показано, что добавление в среду инкубации дифенилиодония, ингибитора НАДФН-оксидазы, приводит к снижению интенсивности хемиллюминесценции как в опытных (ГМУ), так и в контрольных (геомагнитное поле) образцах. Различия между группами, вызванные действием «нулевого» магнитного поля, наблюдались в широком диапазоне концентраций этого ингибитора (2,5-100 мкМ) в одинаковой степени. Напротив, добавление агента, разобщающего окисление и фосфорилирование в митохондриях, 2,4-динитрофенола, от 5 мкМ до 200 мкМ практически полностью нивелировало различия между контрольной и экспериментальной группой, которые наблюдались в отсутствие или при более низких концентрациях этого ингибитора. Эти данные показывают перспективность изучения митохондрий нейтрофилов как потенциальных мишеней, реагирующих на изменение СМП.

Эффекты комбинированных магнитных полей (КМП) отличаются от эффектов «нулевого» поля и слабого СМП. Как показали наши эксперименты, респираторный взрыв нейтрофилов чувствителен к предшествующим этому событию изменениям магнитных параметров. Прайминг-эффект (преактивация респираторного взрыва в нейтрофилах) комбинированного слабого статического (42 мкТл) и коллинеарного низкочастотного переменного (сумма частот 1, 4,4 и 16,5 Гц, суммарная амплитуда 0,86 мкТл) магнитных полей проявлялся в виде более значительного усиления хемиллюминесценции суспензии нейтрофилов в ответ на аппликацию бактериального пептида fMLF или форболового эфира ФМА в присутствии люминола. Наоборот, при использовании других параметров КМП, например частоты, настроенной на циклотронный резонанс иона Fe³⁺, была продемонстрирована деактивация респираторного взрыва. При этом статическое магнитное поле 60 мкТл и коллинеарное переменное низкочастотное магнитное поле частотой 49,5 Гц и амплитудой 60-180 нТл вызывали после 40-минутной предобработки значительное уменьшение интенсивности респираторного взрыва в нейтрофилах в ответ на активатор fMLF, регистрируемое методом люминол-зависимой хемиллюминесценции.

Влияние ультра-короткого воспроизведения невесомости на подвижность сперматозоидов мыши

Жданкина Ю.С.^{1*}, Огнева И.В.¹

¹*Институт медико-биологических проблем РАН;*
juliaszd@yandex.ru

Двигательная активность сперматозоидов млекопитающих является необходимым условием поддержания вида у животных. Несмотря на развитие разнообразных вспомогательных репродуктивных технологий, в том числе, применимых для человека, поддержание подвижности мужских половых клеток при действии разнообразных факторов внешней среды не перестало быть актуальной задачей. Исследования влияния изменения силы тяжести на двигательную способность сперматозоидов млекопитающих, возможно, не имеют прямого практического применения, однако, позволяют понять фундаментальные механизмы регуляции подвижности и, кроме того, могут быть полезны при разработке мер защиты мужской репродуктивной системы при освоении дальнего космоса.

Полученные ранее результаты свидетельствуют о том, что скорость движения сперматозоидов мыши снижается через 1 час пребывания в условиях 2g и через 6 часов – в условиях 0g (Ogneva I.V. et al., 2020). Изменения двигательной активности сопровождаются изменением содержания цитоскелетных белков и уровня фосфорилирования (Ogneva I.V., 2021). Однако можно полагать, что инициация подобных изменений имеет место в самый ранний период экспозиции в измененных гравитационных условиях (Ogneva I.V., 2022). В связи с вышеизложенным, целью данной работы было определение содержания цитоскелетных белков в сперматозоидах мыши через 30 минут экспонирования в условиях воспроизведения невесомости.

Сперматозоиды выделяли из каудального эпидидимиса самцов мышей. Все процедуры с животными были одобрены комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол №521 от 25 сентября 2019). Микрогравитационные условия создавали с использованием машины случайного позиционирования (RPM), позволяющей воспроизводить невесомость в среднем за 15 секунд. Культивирование проводили при температуре 37°C в течение 30 минут. Для анализа подвижности использовали видеофайлы движения сперматозоидов, полученные с помощью камеры Basler puA1600-60uc с частотой 60 кадров/с и разрешением 2 мегапикселя

(Basler AG, Германия). Определение содержания белков проводили методом вестерн-блоттинга с использованием специфичных первичных антител к различным цитоскелетным белкам.

Ожидаемо, через 30 минут экспозиции на RPM скорость движения сперматозоидов мыши не менялась относительно контроля, однако отмечали изменения содержания цитоскелетных белков. Так, в группе RPM достоверно увеличилось содержание бета-тубулина достоверно на 36,5% ($p < 0,05$), хотя содержание SKAP5, связывающего микротрубочки, снижалось на 24% ($p < 0,05$). Напротив, содержание бета-актина имело тенденцию к снижению – на 13,3% ($p < 0,1$), а относительное содержание SVILL, связывающего актиновые филаменты, – увеличивалось на 16% ($p < 0,1$). При этом относительное содержание фокально-адгезивной киназы FAK, играющей важную роль в ремоделировании цитоскелета подвижных клеток, в группе RPM увеличивалось на 31% ($p < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что даже 30-минутная экспозиция сперматозоидов мыши в условиях, воспроизводящих невесомость, приводит к перестройкам цитоскелета, которые в свою очередь, могут приводить к запуску сигнальных путей и формированию адаптационного структурно-функционального паттерна.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований ГНЦ РФ–ИБМП РАН 65.4.

Влияние физетина на интенсивность процессов ПОЛ и активность фосфолипазы С в процессе регенерации периферических нервов

Зайцева Ю.В.^{1*}, Игнатьева О.В.¹, Громова Н.В.¹

¹*Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия;*
zaitsevaiuliiia.v@gmail.com

Нарушение целостности периферических нервов в результате травм являются одной из важнейших проблем нейрохирургии. Актуальность данной проблемы связана с высоким удельным весом повреждений периферических нервов главным образом у лиц молодого и среднего возраста. Это требует пристального внимания к проблемам хирургического лечения посттравматических поражений периферических нервов. Одним из перспективных направлений является изучение влияния на регенерационные процессы различных физиологически активных соединений, в том числе флавоноидов (в частности – физетина).

Исследование предполагало изучение влияния физетина на интенсивность процессов ПОЛ и активность фосфолипазы С в процессе регенерации периферических нервов.

В ходе работы над темой исследования были использованы такие методы, как определение количества диеновых конъюгатов и хроматографическое разделение диацилглицерина с предварительным получением экстракта липидов, а также проводили определение малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты.

Объектом исследования служили белые крысы линии Vistar массой 200-300 г в возрасте 3-4 месяцев, поделенные на здоровую группу и 2 группы подвергшихся перевязке седалищного нерва, одной из которых в дальнейшем осуществлялось внутримышечное введение физетина в дозе 50 мг/кг крысы. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 7, 14 и 21 сутки.

Обнаруженные эффекты физетина многокомпонентны, и определяются, с одной стороны, его антиоксидантной способностью снижать интенсивность процессов перекисного окисления липидов, с другой стороны стабилизирующий эффект физетина может быть опосредован повышением активности липолитических ферментов, таких как, фосфолипаза С.

Согласно полученным результатам, можно утверждать, что физетин продемонстрировал положительный эффект, оказывая благотворное влияние на регенерацию нервного волокна, и может сократить период заживления при травмах седалищного нерва.

Влияние хронического облучения в малых дозах на механизмы преобразования электрических сигналов в функциональные ответы у растений

Немцова Ю.А.^{1*}, Ладейнова М.М.¹, Кузнецова Д.В.¹, Агеева М.Н.¹, Гринберг М.А.¹, Воденев В.А.¹
¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И.

Лобачевского;

julnemtsova@yandex.ru

Все растения растут и развиваются в постоянно изменяющихся условиях. Для формирования адаптации к различным негативным факторам среды требуется распространение по растению дистанционных сигналов, которые могут регулировать физиологические процессы, вызывая функциональные изменения на уровне целого организма. Значительную роль в ответе на стрессор играют электрические сигналы (ЭС), они особо важны для реагирования на быстро нарастающие стрессоры среды, такие как изменение температуры, освещённости, атаку листогрызущих насекомых и т.д. Наряду с быстро нарастающими стрессорами на растения в природной среде могут воздействовать факторы, на протяжении длительного времени модифицирующие статус сигнальных систем, что влияет на формирование адаптации и устойчивости растений. Одним из таких хронических факторов может являться повышенный уровень ионизирующего излучения (ИИ) в зоне произрастания растений. Согласно данным литературы и предыдущим работам, ЭС претерпевают изменения в условиях повышенной радиационной нагрузки. Однако до сих пор остается не исследованным вопрос о механизмах влияния ИИ на стрессовые сигналы и роли облучения в формировании индуцируемых сигналом функциональных ответов. Целью данной работы является анализ механизмов влияния хронического облучения на ЭС растений и процесс преобразования сигналов в фотосинтетический ответ.

В работе использовались растения табака (*Nicotiana tabacum* L.), экспрессирующие флуоресцентный ратиометрический рН-чувствительный белок Pt-GFP и пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) сорта «Дарья». В качестве хронически действующего источника ИИ использовался закрытый источник ⁹⁰Sr-⁹⁰Y. Источник ИИ располагался над растениями на расстоянии около 22 см. Мощность дозы источника составляла примерно 31 мкЗв/час. Для обеспечения равномерного облучения растения регулярно перемещались относительно источника. Облучение начиналось со дня посадки и продолжалось на протяжении всего периода выращивания растений, общее время облучения растений табака 6 недель, растений пшеницы – 2 недели. Суммарная накопленная доза составляла около 32 мГр для табака и 11,3 мГр для пшеницы. Контрольные растения выращивались в аналогичных условиях в отсутствие источника ИИ. В качестве морфометрических параметров определялась площадь листьев, сырой и сухой вес контрольных и облучённых растений. ЭС индуцировался нагревом кончика листа при помощи резистора. Регистрация поверхностных потенциалов производилась при помощи макроэлектродной техники. Для регистрации параметров фотосинтеза растений табака использовался РАМ-флуориметр. Детекция изменений рН на уровне целого растения осуществлялась по флуоресценции Pt-GFP с использованием установки флуоресцентного имиджинга на целом растении, а также с использованием конфокального микроскопа. Устьичная проводимость оценивалась при помощи инфракрасного газоанализатора. Анализ концентраций фитогормонов проводился методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии.

На устойчивость к стрессорам значительное влияние оказывает базовый статус растения – состояние в покое. Результаты проведённых экспериментов демонстрируют увеличение морфометрических показателей, таких как сырой и сухой вес, площадь листа у облучённых растений. При действии ИИ у растений также имеет место повышение активности фотосинтеза.

У контрольных и облучённых растений локальное раздражение вызывает распространение стрессового ЭС. В нашем эксперименте ИИ не вызвало изменений в амплитуде индуцированных локальным нагревом ЭС. При прохождении по листу ЭС вызывает временное снижение интенсивности фотосинтеза, что, согласно данным литературы, способствует формированию устойчивости растений к неблагоприятным условиям. У облучённых растений обнаружено усиление фотосинтетических ответов, вызываемых ЭС, а также наблюдается существенное нарушение корреляции между амплитудами ЭС и вызываемых ими ответов.

Снижение активности световой стадии фотосинтеза при прохождении ЭС может быть связано с 1) изменениями внутри и внеклеточного рН, и 2) с изменением устьичной проводимости и доступности CO₂. В ходе изучения первого потенциального механизма – сдвигов рН – обнаружено, что у облучённых растений при прохождении ЭС имели место более выраженные сдвиги рН. Также наблюдалось нарушение корреляции между амплитудами ЭС и рН, сходное с эффектами, оказываемыми ИИ на ответы фотосинтеза. В качестве ключевой мишени ИИ, влияющей на величину сдвигов рН, по-видимому, выступает H⁺-АТФаза. Показано, что у облучённых растений её активность возрастает. Изучение второго потенциального механизма – изменения устьичной проводимости – показало, что ИИ также усиливает вызванных ЭС ответы устьиц. Влияние ИИ, вероятно, реализуется за счёт изменения концентрации фитогормонов. Показано, что у облучённых растений усиливаются ответы жасмоновой и абсцизовой кислот.

Таким образом, результаты экспериментов позволяют предположить существование двух основных путей модификации вызываемых ЭС фотосинтетических ответов у растений табака, выращенных в условиях хронического облучения. Первый путь связан с влиянием ИИ на системы поддержания рН клетки, второй – на систему регуляции устьичной проводимости.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки (проект № 075-15-2021-1068)

Влияние хронического облучения на индуцированную электрическими сигналами устойчивость к неблагоприятным факторам среды у растений

Гринберг М.А.^{1*}, Немцова Ю.А.¹, Громова Е.Н.¹, Иванова А.В.¹, Воденев В.А.¹

¹*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского;*

mag1355@yandex.ru

Ионизирующее излучение (ИИ) является одним из значимых, но при этом недостаточно изученных факторов среды. Уровень ИИ оказывает существенное влияние на рост и развитие живых организмов, включая растения. Хорошо известно, что график зависимости доза-эффект для ИИ имеет сложную нелинейную форму, особенно в диапазоне малых доз. Отмечается, что малые дозы зачастую не оказывают выраженного эффекта или могут приводить к некоторому повышению ряда показателей. Однако при комбинированном действии на растения ИИ и других факторов эффект облучения может стать существенно более выраженным. Одной из возможных причин такого эффекта является влияние ИИ на сигнальные системы растений, которые участвуют в формировании стрессового ответа и развития устойчивости к стрессору. Нужно отметить, что между воздействием стимула и формированием адаптации к нему лежит каскад событий, ключевыми из которых являются 1) генерация и трансдукция дистанционного сигнала, 2) активация «вторичных» сигнально-регуляторных систем и преобразование сигнала в физиологические ответы и 3) формирование устойчивости к стрессору. К настоящему времени неизвестно, какие из элементов каскада событий являются ответственными за изменение итогового ответа на стрессор под действием ИИ.

В качестве основного объекта экспериментов использовались 15-дневные проростки пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.). Для проверки универсальности эффектов ИИ наиболее значимые этапы экспериментов дополнительно выполнялись с использованием 6-недельных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) и арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.). В качестве источника ИИ использовался β -излучатель ^{90}Sr - ^{90}Y с активностью 0,1 МБк и мощностью дозы порядка 31 мкГр/час. Облучение растений производилось непрерывно на протяжении всего периода выращивания. Индуцированный нагревом электрический сигнал регистрировался внеклеточно с использованием многоканальной макроэлектродной установки. Активность фотосинтеза и интенсивность транспирации измерялись при помощи инфракрасного газоанализатора и РАМ-флуориметра. Тепловой стресс создавался путём прогрева сосуда с растениями в термостате.

В ходе работ анализировалось влияние хронического облучения на основные этапы, лежащие между действием стрессора и формированием индуцированной сигналом устойчивости (сигнал – функциональный ответ – устойчивость), а также на базовый статус растений (до начала действия стрессора). Было показано, что используемые в экспериментах мощности доз не оказывают существенного влияния на базовый статус растений. Имело место некоторое увеличение ряда морфометрических показателей, что, по-видимому, обусловлено небольшой активацией фотосинтетических процессов. При этом ИИ оказывает выраженное влияние на устьичную проводимость, существенно повышая уровень транспирации.

Несмотря на слабый эффект ИИ до действия стрессора, облучение оказывает выраженное влияние на дистанционные электрические сигналы, вызванные локальным нагревом. ИИ способствует снижению порога генерации сигнала, увеличивает его амплитуду, скорость развития и распространения, а также площадь охвата растения сигналом.

ИИ существенно усиливает вызванные электрическим сигналом функциональные ответы – переходное снижение активности фотосинтеза и интенсивности транспирации. У облучённых растений показано повышение амплитуды ответов, скорости их развития и площади охвата растения ответом. Отмечается, что у облучённых растений разных видов имеет место нарушается корреляция между амплитудами сигналов и вызываемых ими фотосинтетических ответов.

Эксперимент по изучению устойчивости облучённых растений к тепловому стрессу показал, что ИИ способствует сохранению более высокого уровня остаточного фотосинтеза. Электрические сигналы у контрольных растений также способствуют сохранению фотосинтеза после прогрева. При этом прохождение электрического сигнала у облучённых растений ведёт к парадоксальному снижению активности фотосинтеза после теплового стресса.

Таким образом, несмотря на слабый стимулирующий эффект ИИ на базовый статус растений хроническое облучение может оказывать существенное влияние на индуцированную сигналом устойчивость к стрессорам. Направленность такого влияния, по-видимому, определяется природой стрессора и особенностями влияния ИИ на сигнальные системы. ИИ оказывает влияние на все этапы, лежащие между действием стрессора и формированием устойчивости. Наиболее значимым представляется этап преобразования сигнала в функциональный ответ, поскольку для него показана наибольшая величина эффектов ИИ, кроме того, на этой стадии происходит нарушение корреляции между последовательными этапами развития устойчивости.

Работа выполнена в рамках проекта Национального центра физики и математики (НЦФМ) «Экспериментальная лабораторная астрофизика и геофизика».

Водный режим в клеточных стенках

Мейчик Н.Р.^{1*}

¹МГУ, биологический факультет;
meychik@mail.ru

Водный режим в клеточных стенках (КС) регулируется через набухание их полимерного матрикса, которое изменяется под влиянием состава внешней среды, но находится под метаболическим контролем клетки. Причиной набухания ионообменных материалов в водном растворе, в том числе и КС, как природного ионообменника, является наличие гидрофильных групп, причиной нерастворимости - существование поперечных связей. Способность к набуханию – это свойство полимерного материала (в том числе и КС растений), определяемое его строением и составом, а само набухание является не просто механическим вхождением воды в пустоты и поры, которых в полимере, в сущности, нет, а представляет собой результат межмолекулярного взаимодействия, обусловленного, главным образом, гидратацией макромолекул, что свидетельствует о коллоидно-химической, а не физической природе этого процесса. Кроме того, коэффициент набухания КС (K_{sw}) связан с осмотическим давлением в КС, и, следовательно, с ее водным потенциалом: чем меньше K_{sw} , тем больше осмотическое давление в КС и меньше ее водный потенциал.

Значение коэффициента набухания клеточных стенок зависит от вида растения, pH и концентрации ионов в среде. Так, величина коэффициента набухания меньше у злаков и маревых по сравнению с бобовыми, для всех растений этот показатель меньше в кислой области, по сравнению с нейтральной. Это означает, что полимерный компонент КС корня может уменьшаться в объеме (в некоторых случаях до 10 раз) при снижении pH в среде или апопласте. Аналогичные изменения происходят при увеличении ионной силы раствора. Эти данные ясно показывают, что объем ионообменного полимерного компонента клеточных стенок не является постоянной величиной, а в значительной мере зависит от ионных условий и pH в окружающей среде и апопласте.

Важно отметить, что у всех растений набухание клеточных стенок, изолированных из сухого и интактного материала, значительно отличается. Это свидетельствует о том, что поглощение воды клеточными стенками обеспечивается не только разностью водных потенциалов между внешней средой и стенкой, но и конформацией полимеров в клеточных стенках.

В корнях пшеницы уменьшение pH среды до 4 приводило к уменьшению в гидравлической проводимости клеточных стенок. В тоже время известно, что объемный ток воды в растении изменяется также, как гидравлическая проводимость. Сопоставляя эти данные с результатами, полученными в настоящем исследовании, можно заключить, что изменение в набухании клеточных стенок в ответ на изменение условий в окружающей среде может приводить к изменению водного тока через корни растений. Кроме того, можно говорить о том, что существует прямая связь между биохимическим составом полимерного матрикса клеточных стенок, их ионным окружением, набуханием клеточных стенок и водным током.

Известно, что чем меньше ионная сила почвенного раствора, тем больше интенсивность транспирации растений и, согласно результатам, тем больше набухание КС корня. Более того, показано, что в отсутствии водного дефицита и при высокой скорости транспирации образуется большой градиент водного потенциала в континууме почва – корень – лист – атмосфера, сопротивление корня низкое, корни быстро поглощают воду из почвы, а апопластный путь движения воды будет доминировать. Эти данные также ярко демонстрируют прямую связь между набуханием КС корня и водным током и указывают на важную физиологическую роль полимерного матрикса в регуляции не только переноса ионов, но и водного режима растений.

Однако главный фактор, который определяет способность к набуханию – это степень сшивки полимерных цепей в матриксе КС. Этот параметр нельзя определить экспериментальным путем, однако есть возможность оценить этот показатель непрямым методом. На основании экспериментальных и теоретических исследований о физико-химических свойствах слабосшитых карбоксилсодержащих ионообменников установлено, что чем выше степень сшивки полимеров, тем ниже коэффициент набухания полимерного материала в воде. В соответствии с

этим данными и результатами об измерении коэффициента набухания в воде клеточных стенок можно заключить, что в ряду бобовые, злаки, маревые степень сшивки полимеров в КС шпината и сведы выше по сравнению с другими растениями, т.к. у первых коэффициент набухания в воде в 2 и 4 раза меньше, чем у пшеницы и бобовых соответственно. Можно также предполагать, что степень сшивки полимеров в клеточной стенке корней растений не превышает 4 %, так как такие значения этого показателя характерны для синтетических карбоксилсодержащих ионитов с подобными значениями коэффициентов набухания в воде. Таким образом существуют отличия в строении полимерного матрикса клеточных стенок растений разных видов, которые обусловлены, в том числе, разной степенью сшивки полимеров в матриксе КС.

Возможные механизмы влияния низких концентраций дейтерия на живые системы

Лясота О.М.^{1*}, Басов А.А.^{2,3}, Дорохова А.А.^{1,2}, Козин С.В.^{1,2}, Моисеев А.В.⁴, Даньшин Н.А.², Джимаков С.С.^{1,2}

¹ИОНЦ РАН;

²ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»;

³ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России;

⁴ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет»;

artsybasheva@mail.ru

Вода с модифицированным изотопным составом со сниженным содержанием дейтерия (ВМИС ССД) обладает потенциалом в противоопухолевой терапии, особенно в отношении методов, вызывающих окислительный стресс в раковых клетках [1]. ВМИС ССД может облегчить вызванные ожирением состояния и связанные с ним метаболические нарушения [2].

Введение в пищевой рацион ВМИС ССД приводит к формированию изотопного D/H градиента в первые три недели между плазмой крови и тканями органов. Происходит снижение концентрации дейтерия в крови на 93,6% и в тканях печени, почки и сердца на 37,6%, 39,9% и 37,6% соответственно, что сопровождается изменением адаптационных возможностей организма [3].

С целью изучения механизмов влияния D/H градиента на энергообмен в печени была исследована динамика продукции перекиси водорода изолированными митохондриями печени крыс в зависимости от наличия предварительной адаптации к пониженному содержанию дейтерия в питьевом рационе *in vivo* и инкубации *in vitro* в среде с пониженной концентрацией дейтерия. При инкубации в среде, обеднённой дейтерием, выявили рост на 35% генерации перекиси водорода митохондриями, выделенными из гепатоцитов крыс, потреблявших питьевую воду с пониженной концентрацией дейтерия (46 ppm), по сравнению с митохондриями из клеток печени крыс, потреблявших воду с концентрацией дейтерия 152 ppm. Выявленное изменение функциональной активности митохондрий свидетельствует о способности организма животных адаптироваться к режиму потребления питьевой воды, обеднённой дейтерием, что, возможно, обусловлено формированием трансмембранного изотопного градиента D/H [4]. Полученные результаты коррелируют с данными X. Zhang и др. Ими установлено, что ВМИС ССД ингибирует пролиферацию клеток, главным образом, вызывая дисбаланс между продукцией и нейтрализацией АФК в митохондриях и, таким образом, вызывая окислительный стресс в клетках [5]. Согласно этой же работе, ВМИС ССД модулирует экспрессию белков, участвующих в следующих клеточных процессах: клеточный цикл, активность оксидоредуктазы, метаболизм глутатиона и др.

Таким образом, механизм влияния дейтерия должен лежать глубже – возможно в воздействии на свойства молекул ДНК при попадании в них атома дейтерия, за счет чего могут изменяться процессы транскрипции, что в свою очередь окажет влияние на экспрессию.

Для проверки этого предположения нами были проведены следующие модельные эксперименты: для моделирования процессов расплетения двойной спирали ДНК, образования открытых состояний и пузырей в двойной спирали ДНК мы применили математическую модель, описывающую вращательное движение азотистых оснований вокруг сахаро-фосфатного остова молекулы ДНК [6].

Проведенные методами математического моделирования оценочные эксперименты по влиянию изотопного D/H обмена на процессы раскрытия пар оснований показывают, что присутствие дейтерия в последовательности нуклеотидов может приводить – в зависимости от значений энергии разрыва водородной связи – как к увеличению, так и к уменьшению вероятности возникновения открытых состояний [7,8]. В естественных условиях атом дейтерия более вероятно способен замедлять скорость считывания генетической информации в процессах транскрипции, сужая при персистентном воздействии в течение клеточного цикла низкоинтенсивного неблагоприятного фактора диапазон регуляторных механизмов и приводя к снижению адаптационного потенциала у клетки.

Более того, нельзя исключить и другие механизмы реализации изотопных эффектов при их включении в макромолекулы, например, связанные с изотопным резонансом [9,10] в живых системах. Поэтому даже при

замене в молекуле ДНК всего одного атома протия на дейтерий и одинаковой средней скорости репликации ДНК могут возникать отдельные периодические замедления и эквивалентные им в таком случае по суммарной выраженности ускорения, хотя в целом и нивелирующие друг друга, но способные за счет изменения внутритакового паттерна считывания генетической информации приводить к общему накоплению ошибок ее воспроизведения, сопровождающихся на определенном этапе переходом количественных изменений (число сбоев репликации) в качественные дефекты структуры ДНК.

Таким образом, участие атомов дейтерия в образовании водородных связей двойных спиралей молекул ДНК может приводить к изменению времени передачи генетической информации, чем можно объяснить влияние даже небольших изменений концентрации дейтерия в среде на метаболические процессы у живых систем.

Работа выполнена при финансовой поддержке 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. Yaglova, N.V., Timokhina, E.P., Obernikhin, S.S., et al. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 3107. doi: 10.3390/ijms24043107
2. Halenova T., Zlatskiy I., Syroeshkin A., et al. Molecules 2020, 25(1), 23. doi: 10.3390/molecules25010023
3. Dzhimak S. S., Barishev M. G., Basov A. A., et al. Biophysics, 2014, Vol. 59, No. 4, pp. 614–619 doi: 10.1134/S0006350914040101
4. Dzhimak S.S., Basov A.A., Volchenko N.N., et al. Doklady Biochemistry and Biophysics, 2017, Vol. 476, P. 323–325. DOI: 10.1134/S1607672917050088
5. Zhang et al., Molecular & Cellular Proteomics, 2019, 18(12), 2373–2387. doi: 10.1074/mcp.RA119.001455
6. Svidlov A., Drobotenko M., Basov A., et al. International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol.22. №15. P. 7873. doi: 10.3390/ijms22157873
7. Dzhimak S.S., Drobotenko M.I., et al. Doklady Biochemistry and Biophysics. 2018. Vol. 483. P. 359–362. doi: 10.1134/S1607672918060169.
8. Svidlov A.A., Drobotenko M.I., et al. Physics of Wave Phenomena. 2021. Vol. 29. №2. P. 180–185. doi: 10.3103/S1541308X2102014X
9. Xie X., Zubarev R.A. Isotopic Resonance Hypothesis: Experimental Verification by Escherichia coli Growth Measurements. Scientific reports. 2015. V. 5. № 9215. doi: 10.1038/srep09215
10. Basov A.A., Fedulova L.V., Vasilevskaya E.R., et al. Molecules. 2019. V. 24. № 22. P. 4101. doi: 10.3390/molecules24224101

Гематологические показатели мышей при пероральном введении биогенных и синтетических наночастиц ферригидрита

Бирюкова Е.А.^{1*}, Коленчукова О.А.¹, Киреева А.В.¹, Столяр С.В.¹, Лошкарева М.В.¹

¹ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»;
helena.biryukova.1996@gmail.com

В эксперименте использованы наночастицы ферригидрита, синтезированные химическим и биологическим способом. После перорального введения данных частиц были отмечены изменения некоторых показателей крови в группе, получавшей биогенные наночастицы, по сравнению с контролем.

Ключевые слова: наночастицы; ферригидрит; *Klebsiella oxytosa*; показатели крови

1. Введение. Наночастицы (НЧ) железа имеют большую привлекательность в биомедицинских приложениях, так как данные частицы обладают как магнитными, так и полупроводниковыми свойствами [1]. Магнитные НЧ являются отличным выбором например в качестве модуля доставки лекарств [2]. Но, медицинское применение НЧ требует всестороннего изучения, поэтому целью данной работы является анализ гематологических показателей мышей при пероральном введении биогенных и синтетических НЧ ферригидрита.

2. Материалы и методы. Биогенные наночастицы ферригидрита получали из культуры бактерий *Klebsiella oxytosa*, выращенных на питательных средах, содержащих Fe²⁺ оксалат и Fe³⁺ цитрат. Выделение ферригидрита из осадка и получения золя проводилось по стандартной методике, описанной ранее [3]. В результате получали золь наночастиц, который сушили при комнатной температуре. Образцы синтетического ферригидрита были получены гидролизом нитрата железа (III).

Объекты исследования – мыши, самцы. Всего в эксперименте участвовало 65 особей, разделенных на 3 группы: Контрольная группа: 15 особей, 16 гр корма в сутки на голову; 1 опытная группа: 25 особей, 16 гр корма + 0,049 г золя синтетических наночастиц на голову; 2 опытная группа: 25 особей, 16 гр корма + 0,034 г золя биогенных наночастиц на голову. Эксперимент проводили в динамике в течении 36 дней. Контрольными точками были выбраны 1й день, 21й день и 36й день. В первый день эксперимента 5 особей были усыплены для

получения контрольных гематологических показателей. На 22й и 37й дни были усыплены 25 мышей (5 особей из контрольной группы, по 10 особей из каждой опытной группы). Анализ цельной крови с антикоагулянтом производили на анализаторе «Heska Element HT5». Статистическую обработку проводили с помощью программы STATISTICA 10 Trial.

3. Результаты исследования.

После обработки результатов на 36 день в группе биогенных НЧ количество гемоглобина было на 4,8% ($p = 0,001$) выше группы синтетических НЧ, увеличилось количество лейкоцитов у 1 (122%, $p = 0,034$) и 2 (162% , $p = 0,023$) групп относительно контрольных измерений 1 дня, отмечалось увеличение количества эритроцитов на 8,75% ($p = 0,008$) у 2 группы относительно показателей на 21 день.

Наблюдалось незначительное снижение средней концентрации гемоглобина 1 (1,4% $p = 0,009$) и 2 (0,4% $p = 0,009$) опытных групп относительно контроля на 21 день и увеличение этого показателя на 3,3% ($p = 0,004$) у 2 группы относительно 1 на 36 день. Так же у группы 1 снижается среднее количество тромбоцитов на 29,9% ($p = 0,01$) к концу эксперимента относительно 21 дня.

У 2 группы на 36 день на 6,3% ($p = 0,02$) увеличился гематокрит относительно 21 дня и среднее содержание гемоглобина в эритроците на 4,6% ($p = 0,031$) относительно 1 дня. У 1 группы к концу эксперимента, относительно 21 дня, на 28,5% ($p = 0,01$) снизилась средняя плотность тромбоцитов. На 21 день эксперимента средний показатель различия эритроцитов по объему увеличился на 6,4% ($p = 0,04$) у 2 группы относительно 1. Средний объем тромбоцита в крови 2 группы на 21 день был на 9% ($p = 0,005$) ниже группы контроля.

4. Обсуждение. Полученные данные могут говорить о значительном влиянии наночастиц биогенного происхождения на кровь исследуемых животных, так как внутри данной опытной группы при обработке результатов отмечалось наибольшее количество достоверных различий в течении эксперимента. Разной степени увеличение показателей 2 группы, таких как МНС, MCV, RBC, HCT, а так же повышение уровня гемоглобина на 36 день и показателя RDW на 21 день у 2 группы относительно 1, может говорить о увеличении активности эритропоэза. Влияние наночастиц синтетического на тромбоциты крови (снижение их количества, средней плотности и увеличение объема) требует дальнейшего изучения. Разница влияния различных наночастиц на гематологические показатели мышей при пероральном введении в сухом виде с кормом может быть объяснена различной степенью биодоступности. Можно предположить, что наночастицы ферригидрита биогенного происхождения лучше усваиваются в процессе пищеварения.

5. Заключение. Наименьшее влияние на гематологические показатели мышей оказывают наночастицы ферригидрита синтетического происхождения. Можно предположить, что при добавлении в прикорм наночастиц ферригидрита синтетического происхождения происходит замедление роста объема эритроцитов и тромбоцитов крови. Наночастицы биогенного происхождения при пероральном введении могут вызвать значительное увеличение уровня гемоглобина.

Список литературы

1. Anik, M.I., Hossain, M.K., Hossain, I., Mahfuz, A.M.U.B., Rahman, M.T., Ahmed, I. Recent progress of magnetic nanoparticles in biomedical applications: A review. *Nano Select.* 2021; 2: 1146–1186.
2. Z. M. Avval, L. Malekpour, F. Raeisi, A. Babapoor, S. M. Mousavi, S. A. Hashemi, M. Salari, *Drug Metab. Rev.* 2020, 52, 157.
3. Stolyar, S.V.; Ladygina, V.P.; Boldyreva, A.V.; Kolenchukova, O.A.; Vorotynov, A.M.; Bairmani, M.S.; Yaroslavtsev, R.N.; Iskhakov, R.S. Synthesis, Properties, and in vivo Testing of Biogenic Ferrihydrite Nanoparticles

Гено- и цитотоксическое действие динитрозильного комплекса железа с меркаптосукцинатом на клетки MCF-7

Тронов В.А.^{1,2*}, Ткачев Н.А.^{1,2}, Некрасова Е.И.^{1,2}, Ванин А.Ф.¹

¹ФИЦ ХФ РАН, Москва, Россия;

²ИБХФ РАН, Москва, Россия;

vtronov@yandex.ru

Известны заболевания, ассоциированные с дефицитом в тканях больных оксида азота (NO). К ним относятся сахарный диабет, гипертония, эндометриоз, онкологические заболевания. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что синтетические динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), обеспечивая доставку NO в ткани, открывают возможность терапии таких заболеваний. Однако ДНКЖ проявляют и цитотоксическое (ЦТ) действие. Источником цитотоксичности ДНКЖ могут быть как продукты его распада на NO и ион нитрозония (NO⁺), так и механизм репарации ДНК в клетке. В данной работе методом МТТ-оценки выживаемости и методом ДНК-комет регистрировали ЦТ и генотоксический (ГТ) эффекты и оценили вклад последнего механизма в цитотоксический эффект синтезированного нами комплекса ДНКЖ с меркаптосукцинатом (ДНКЖ-

МС) на опухолевые клетки человека MCF-7. Показано, что ЦТ действие ДНКЖ-МС, в 2 раза выше такового смеси предшественников его синтеза (МС+Fe²⁺). В то же время, смесь (МС+Fe²⁺) индуцировала в клетках одностранные разрывы ДНК (ОР). Эти повреждения полностью репарировались спустя 24 ч. Хотя комплекс ДНКЖ-МС индуцировал в клетках меньше ОР, часть из них сохранялась нерепарированными в 19% клеток спустя 24 ч. Методом нейтральных комет показано, что эти разрывы являются двунитевыми (ДР). Корреляция генотоксичности по выходу нерепарированных ОР в ДНК и МТТ-цитотоксичности на клетках MCF-7 говорит о том, что токсичность динитрозильного комплекса на клетках MCF-7 ассоциирована с возникающими ДР в ДНК. ДР могли образоваться в результате атаки клеточными эндонуклеазами одностранных участков и АП-сайтов в ДНК, которые фомируются как интермедиаты механизма репарации NER (nucleotide excision repair), активируемого в ответ на появление в ДНК сложных аддуктов оснований под действием ДНКЖ-МС. Т.о., механизм репарации ДНК, переводя не летальные или потенциально летальные повреждения в геноме, вызываемые ДНКЖ комплексом, в летальные ДР, обеспечивает цитотоксичность ДНКЖ-МС на опухолевых клетках MCF-7.

Гидрогели на основе пектинов имитируют микроокружение ниши нервных стволовых клеток

Белюсов А.С.^{1*}, Швед Н.А.^{1,2}, Гринченко А.В.^{1,2}, Ланских Д.В.¹, Малыкин Г.В.², Кузякова О.Ю.¹,
Ковалев В.В.², Кумейко В.В.^{1,2}

¹Дальневосточный федеральный университет;

²Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН;
andrei-belousov@mail.ru

Среди всех опухолей головного мозга мультиформная глиобластома является наиболее распространенной среди взрослых, а также наиболее агрессивной. Стандартное лечение глиобластомы фокусируется только на опухолевых клетках, игнорируя их внеклеточный матрикс (ВКМ). Однако было доказано, что ключевую роль в развитии и прогрессировании опухоли играют не сами опухолевые клетки, а внеклеточный матрикс и ниша опухолевых стволовых клеток, которую он образует.

Использование материалов, которые имитируют физико-химические свойства нормального ВКМ и создают микроокружение для клеток в резекционной полости после удаления опухоли головного мозга, может значительно улучшить прогноз. Требуемый матриксный материал должен максимально имитировать биомеханические свойства нативной ткани.

Перспективным применением гидрогелей является использование их в качестве имплантируемого матриксного материала в регенеративной медицине и трансплантологии для ремоделирования структуры ткани, доставки клеток или лекарств в мозг.

Углеводные полимеры играют очень важную роль в ВКМ нервной ткани, формируя уникальное микроокружение, препятствующее активной пролиферации и миграции нервных клеток взрослой нервной системы.

Нами разработан набор гидрогелей на основе пектинов с различным содержанием свободных карбоксильных групп. Все гидрогели биосовместимы и при подкожной имплантации не вызывают значимого иммунного ответа. Скорость биодеградации зависит от степени этерификации пектина. Модули упругости гидрогелей находятся в диапазоне от 100 до 1100 Па в зависимости от степени этерификации, что соответствует вязкоупругим свойствам нормального мозга человека. Все гидрогели, используемые в качестве матриц для культивирования клеток, поддерживают высокую жизнеспособность нервных стволовых клеток (НСК), клеток глиомы С6 и нейробластомы N2a, снижают скорость пролиферации, защищают НСК от дифференцировки и сохраняют нейросферы, морфология которых зависят от степени этерификации пектина. Молекулярные механизмы воздействия биоматериала на клетки, включают подавление сигнального пути MAPK/ERK. Транскриптомный анализ выявил изменения в путях регуляции клеточного цикла, поддерживающие высокие уровни экспрессии нескольких компонентов, необходимых для сохранения способности к пролиферации, в то время как обнаруженная высокая экспрессия ингибирующих факторов может быть ответственна за замедление пролиферации НСК и поддержание стволовости клеток, культивируемых на пектиновых гидрогелях.

Работа выполнена при поддержке проекта Государственного задания Минобрнауки России FZNS-2023-0017.

Дивергенции зарождающихся хемоавтотрофных путей фиксации CO₂ в гидротермальных условиях

Маракушев С.А.^{1*}, Белоногова О.В.¹

¹Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН;

²Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН;
shukaram@yandex.ru

Дивергенции зарождающихся хемоавтотрофных путей фиксации CO₂ в гидротермальных условиях
Маракушев С.А., Белоногова О.В.

Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, 142432
Московская область, г. Черноголовка E-mail:
shukaram@yandex.ru

Фиксация неорганического углерода в органический материал является химической основой функционирования первых самовоспроизводящихся C–H–O систем в подводных гидротермальных системах на древней Земле. Там создавались благоприятные термодинамические и кинетические условия для этого процесса благодаря оптимальному составу минералов – катализаторов – термическим и химическим градиентам, возникающим в результате импульсов водородной дегазации жидкого ядра и взаимодействию, пороуда-вода. По современным представлениям в гидротермальных условиях архея создавался пул карбоксильных и кетокислот – автокатализаторов [напр., Braakman, Smith, 2012; Goldford et al., 2017; Маракушев, Белоногова, 2009, 2021], которые в парагенезисе с углеводородами на поверхности минералов трансформировался в автокаталитическую сеть фиксации CO₂.

В представляемой работе обосновывается существование обратимых метастабильных равновесий между неметановыми углеводородами и продуктами их окисления (карбоновыми кислотами, спиртами и альдегидами) в гидротермальных условиях вулканических выбросов. Предполагается, что на древней Земле в этих условиях сформировался пул прото-метаболитов трехкомпонентной системы C–O–H, находящихся в обратимых метастабильных равновесиях друг с другом и обладающих способностью ассимилировать CO₂ из окружающей среды. Эволюция этого пула интермедиатов зарождающегося метаболизма регулировалась обратимыми шунтами - узлами бифуркации, определяющими альтернативные направления развития в сетях химических реакций и приводящие к формированию различных прото-метаболических путей хемоавтотрофной фиксации CO₂. Парагенетический анализ системы C–H–O в гидротермальном окружении, основанный на методе термодинамических потенциалов (Marakushev, Belonogova, 2009), применен для исследования центральных химических переключателей (шунтов) бифуркации электронов прото-метаболической сети определяющих химическую эволюцию пяти зарождающихся бактериальных циклов: восстановительный пентозо-фосфатный (RPP) цикл, ацетогенный и метаногенный Вуда-Лундгвала (WL) путь, восстановительный цитратный (RC) цикл, 3-гидроксипропионатный (3-HP) би-цикл. Управляемое давлением водорода равновесие фумарат (C₄H₄O₄) + H₂ = сукцинат(C₄H₆O₄) регулирует развитие прото-метаболической сети в направлении образования RC цикла или 3-HP би-цикла. Увеличение давления водорода приводит к увеличению концентрации сукцината, инициирующего образование RC цикла, а его уменьшение инициирует 3-HP би-цикл. Эволюция циклов также управлялась химическим потенциалом CO₂, что отражено в работе на схеме дивергенции модулей прото-метаболических циклов. Такое зависимое от парциального давления CO₂ переключение в обратную сторону направления потока электронов в RC цикле недавно было впервые продемонстрировано на примере термофильной серо-редуцирующей дельта-протеобактерии *Hirpea maritima* [Steffens et al., 2021].

Интересная особенность бактериального автотрофного метаболизма – способность переключать CO₂-фиксирующий метаболизм с WL пути на RPP цикл и наоборот была недавно открыта в термофильной анаэробной бактерии *Ammonifex degensii*. В зависимости от химического потенциала водорода эта бактерия организует свою автотрофную фиксацию углерода как WL путь или как RPP цикл [Berg et al., 2022], что регулируется другим эффективным водородным шунтом - равновесной парой пируват (C₃H₄O₃) + H₂ = 1,5 ацетат (C₂H₄O₂). Этот унаследованный современными микроорганизмами механизм переключения очевидно существовал и в прото-метаболических сетях, в которых обратимость фазового перехода через равновесие пируват ↔ ацетат создает возможность выбора развития между этими CO₂-фиксирующими системами. Кроме того, химический потенциал молекулярного водорода окружающей гидротермальной среды определяет развитие сети в направлении двух кластеров фиксации CO₂ – пируватный: (RC и RPP цикл) или ацетатный (ацетогенный и метаногенный WL путь и 3-HP би-цикл). Таким образом пируват (центральный хаб или метаболический репликатор), образуя парагенезис с ацетатом, создает важнейший шунт метаболического пула интермедиатов, с участием которого происходило зарождение и эволюция всех известных бактериальных автотрофных метаболических путей фиксации CO₂.

Работа выполнена по теме государственного задания, № регистрации AAAA-A19-119071190045-0.

Литература

- Маракушев С.А. Белоногова О.В. Физико-химические условия образования и самоорганизации компонентов архаического цикла фиксации CO₂ в гидротермальных системах, *Биофизика*, 2009, 54 (4), 748–759.
- Маракушев С.А., Белоногова О.В. Химическая основа автотрофного палеометаболизма фиксации углерода, *Изв. РАН, Сер. Биол.*, 2021, 5, 453–463.
- Berg I., Mall A., Steffens L. et al. H₂ partial pressure switches autotrophic pathways in an anaerobic bacterium, 2022. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1456100/v1>
- Braakman R., Smith E. The emergence and early evolution of biological carbon-fixation, *PLOS Comput. Biol.*, 2012, 8, 1–16.
- Goldford J.E., Hartman H., Smith T.F., Segre D. Remnants of an ancient metabolism without phosphate, *Cell*, 2017, 168, 1–9.
- Marakushev S.A., Belonogova O.V. The parageneses thermodynamic analysis of chemoautotrophic CO₂ fixation archaic cycle components, their stability and self-organization in hydrothermal systems, *J. Theor. Biol.*, 2009, 257 (4), 588–597.
- Marakushev S.A., Belonogova O.V. Ideas and perspectives: Development of nascent autotrophic carbon fixation systems in various redox conditions of the fluid degassing on early Earth, *Biogeosciences*, 2019, 16, 1817–1828.
- Scheffen M., Marchal D.G., Beneyton T. et al. A new-to-nature carboxylation module to improve natural and synthetic CO₂ fixation. *Nat. Catal.*, 2021, 4, 105–115.

Защитное действие 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина и осмолитов на стабильность и агрегацию глутаматдегидрогеназы при повышении температуры и замораживании-оттаивании

Борзова В.А.^{1*}, Черников А.М.¹, Михайлова В.В.¹, Чеботарева Н.А.¹
¹ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН;
vera.a.borzova@gmail.com

Влияние 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина (ГПЦД) и осмолитов (трегалозы, сорбитола, бетаина) на стабильность, кинетику агрегации и олигомерное состояние глутаматдегидрогеназы (ГДГ) из печени быка было изучено методами дифференциальной сканирующей калориметрии, динамического светорассеяния и аналитического ультрацентрифугирования, соответственно. Использовались 2 агрегационные тест-системы: тепловая агрегация ГДГ и агрегация, индуцированная циклом замораживания-оттаивания. Было показано, что все изученные соединения проявляют защитный эффект при агрегации белка. В случае нативной ГДГ термостабильность белка повышается, тогда как при замораживании-оттаивании трегалоза и сорбитол предотвращают полную потерю нативной структуры белка, а ГПЦД и бетаин, кроме того, еще и повышают термостабильность ГДГ, увеличивая температуру денатурации T_{max}. Также, по данным аналитического ультрацентрифугирования, все изученные соединения защищают ГДГ от агрегации (а в случае замораживания-оттаивания – от полной преципитации), стабилизируя как нативную гексамерную форму ГДГ с коэффициентом седиментации 14,5 S, так и небольшие олигомеры белка и его диссоциированные формы. Количественная оценка антиагрегационной активности ГПЦД и осмолитов была проведена с помощью анализа кинетики агрегации ГДГ при 50 град. С и агрегации ГДГ, индуцированной замораживанием-оттаиванием, при 25 град. С. Из соотношения начальных скоростей агрегации в присутствии различных концентрациях осмолитов и ГПЦД (v₀) и в отсутствие добавок (v₀(0)) была рассчитана концентрация полунасыщения [L]_{0.5} для каждого соединения. В случае тепловой агрегации наиболее высокую антиагрегационную активность продемонстрировала трегалоза ([L]_{0.5} = 142 мМ). В случае агрегации, индуцированной замораживанием-оттаиванием наибольшим защитным эффектом обладал бетаин: агрегация при 25 град. С после размораживания не наблюдалась при минимальных исследованных концентрациях бетаина (10-50 мМ).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №21-14-00178)

Изменение содержания дейтерия в крови и мозге крыс при потреблении обеднённой по дейтерию воды

Козин С.В.^{1,2,3}, Кравцов А.А.^{1,2,3*}, Лясота О.М.²

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»;

²ФГБУН ФИЦ «Южный научный центр РАН»;

³ФГБОУ ВО «Кубанский государственный технологический университет»;

aakravtsov@mail.ru

Содержание дейтерия в природной воде составляет 150 ppm. Вода, в которой содержание дейтерия ниже природного значения – обедненная дейтерием вода (ОДВ). На сегодняшний день в научной литературе имеются данные о влиянии низких концентраций дейтерия на метаболические процессы в клетках и тканях млекопитающих. Уменьшение концентрации дейтерия в организме животных способствует усилению его антиоксидантных и антиоксидесических функций. Изменение баланса между дейтерием и протием во внутренней среде положительно влияет на стрессоустойчивость и уровень тревожности лабораторных животных при действии продолжительных стресс-факторов [5], способствует улучшению референтной памяти [4], изменяет электрофизиологическую активность гиппокампа [2], повышает устойчивость к гипоксии и повышает когнитивные способности лабораторных крыс [1, 3] Тем не менее, данных о том, как изменение содержания дейтерия в потребляемых продуктах влияет на баланс изотопов водорода в организме недостаточно.

Целью данной работы было исследовать влияние потребления лабораторными животными ОДВ на уровень дейтерия в крови и головном мозге крыс.

Обеднённую по дейтерию воду получали на установке, разработанной в Кубанском государственном университете [6]. Содержание дейтерия в ОДВ составляло 50 ppm. Затем полученную воду с пониженным содержанием дейтерия и дистиллированную воду, с естественным содержанием дейтерия (150 ppm), подвергали дополнительной отчистки в системе Milli-Q. После чего ОДВ и дистиллированную воду с природным содержанием дейтерия минерализовали. Минерализацию воды осуществляли путем добавления в нее минеральных солей для получения физиологически полноценного минерального состава (минерализация 314–382 мг/л: гидрокарбонаты 144–180, сульфаты <1, хлориды 60–76, кальций - 6, магний - 3, натрий 50–58, калий 50–58).

Эксперимент был выполнен на 66 крысах-самцах линии Вистар. Все животные содержались в одном виварии при одинаковых условиях и имели свободный доступ к корму и воде.

Животных разделили на две группы:

1-я группа (n=33) - крысы, которые получали воду с природным содержанием дейтерия;

2-я группа (n=33) - крысы, которые получали ОДВ.

Из каждой группы животных выводили по 3 крысы каждый день в течение недели, затем на 10, 15, 21, 42 сутки для забора крови путем декапитации. Из полученной крови готовили сыворотку и определяли в ней концентрацию дейтерия на ЯМР - спектрометре (JEOL JNM-ECA 400 MHz). На 42 день эксперимента извлекали головной мозг и подвергали его лиофильной сушке для дальнейшего определения содержания дейтерия в нём с помощью масс-спектрометра DELTAplus (Finnigan, Германия).

Анализ результатов показал, что у крыс, в рационе которых была ОДВ (группа 2) происходило заметное снижение концентрации дейтерия в крови. При этом наибольшее замещение дейтерия на протий в крови наблюдалось в течение первой недели поения. Так после первого дня поения содержание дейтерия снизилось на 5%, на второй день уже на 12% по сравнению с начальным уровнем в момент начала поения. На восьмой день эксперимента концентрация дейтерия в крови уменьшилась на 23% и составила 113 ppm. Кривая, отражающая динамику изменения концентрации дейтерия, вышла на плато на 10 день и в последующие две недели динамика значительно не менялась. При этом концентрация дейтерия в контрольной группе (группа 1) не менялась в течение всего эксперимента. Концентрация тяжелого водорода в тканях головного мозга на 42 день эксперимента уменьшилась на 19 % и составила 119 ppm.

Выход графика на плато может означать насыщение крови и лимфы протием и началом активного замещения дейтерия на протий в тканях и органах в условиях созданного изотопного градиента. Снижение концентрации дейтерия в экстрацеллюлярной жидкости и тканях организма происходит вследствие изотопного D/H обмена в белках, липидах и нуклеиновых кислотах, образующих клетки. Известно, что наиболее активно такое замещение происходит в функциональных группах, имеющих неподелённую электронную пару и способных образовывать водородные связи. К таким атомным группировкам относятся гидроксильные (-OH), карбоксильные (-COOH), аминогруппы (-NH₂). По цепочкам водородных связей по механизму Гротгуса реализуется переход протонов и дейтронов от одной биомолекулы к другой. Также активному замещению дейтерия на протий в организме способствует изотопный обмен, реализующийся между данными группами биомолекул и гидратной оболочкой посредством водородных связей.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания ЮНЦ РАН № 122020100351-9.

Литература:

1. Kozin, S.V., Kravtsov, A.A., Zlischeva, E.I. et al. The Influence of a Deuterium Depleted Drinking Diet on the Functional State of the Central Nervous System of Animals in Hypoxia. *Biophysics*. 2020. 65, 1017–1022.
2. Kozin S, Skrebitsky V, Kondratenko R, et al. Electrophysiological Activity and Survival Rate of Rats Nervous Tissue Cells Depends on D/H Isotopic Composition of Medium. *Molecules*. 2021 Apr 2;26(7):2036.
3. Kravtsov A, Kozin S, Basov A, et al. Reduction of Deuterium Level Supports Resistance of Neurons to Glucose Deprivation and Hypoxia: Study in Cultures of Neurons and on Animals. *Molecules*. 2021 Dec 31;27(1):243.
4. Mladin C, Ciobica A, Lefter R, et al. Deuterium-depleted water has stimulating effects on long-term memory in rats. *Neurosci Lett*. 2014 Nov 7;583:154-8.
5. Petriev, I.S., Bolotin, S.N., Frolov, V.Y. et al. Hydrogen Permeability of a Foil of Pd–Ag Alloy Modified with a Nanoporous Palladium Coating. *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 82, 807–810.
6. Strekalova T, Evans M, Chernopiatko A, et al. Deuterium content of water increases depression susceptibility: the potential role of a serotonin-related mechanism. *Behav Brain Res*. 2015 Jan 15;277:237-44.

Изменение содержания регуляторов дифференцировки зародышевых стволовых клеток в яичниках *D. melanogaster* после 79-часовой экспозиции в условиях воспроизведения невесомости

Голубкова М.А.^{1*}, Огнева И.В.¹

¹*Лаборатория биофизики клетки, Институт медико-биологических проблем РАН;
ma_golubkova@mail.ru*

Одной из приоритетных задач при освоении дальнего космоса в будущем может стать поддержание вида. Невесомость, как фактор, оказывающий непрерывное действие на организм человека во время космического полёта, препятствует решению данной задачи. Воздействие невесомости способно индуцировать перестройки цитоскелета и изменение экспрессии генов, следствием чего, в частности, может служить нарушение регуляции пролиферации и дифференцировки стволовых клеток, наблюдаемое в условиях микрогравитации (Ogneva I.V., 2022). В случае возникновения нарушений в клетках-предшественниках ооцитов, фертильность особей, предположительно, может снижаться.

D. melanogaster является широко используемым модельным организмом, подходящим для изучения контроля самообновления и дифференцировки стволовых клеток, ввиду консервативности большинства механизмов, осуществляющих данный процесс.

Зародышевые стволовые клетки (ЗСК), служащие предшественниками ооцитов, у дрозофилы локализованы в проксимальной части яичника - гермариуме. В гермариуме различают ниши самообновления и дифференцировки, последовательно сменяющие друг друга. Морфоген *Dpp* - гомолог BMP человека, секретлируемый соматическими клетками ниши самообновления, по-видимому, является одним из ключевых участников процесса определения клеточной судьбы ЗСК в яичниках *Drosophila* (Xie T, Spradling AC, 1998). *Dpp* направляет дочерние ЗСК по пути самообновления за счет репрессии генов - таких как *bam*, экспрессия которых необходима для дифференцировки ЗСК (Song X. et al., 2004; Kirilly D., Xie T., 2007).

В экспериментах, проводимых в условиях 1g, установлено, что в результате сверхэкспрессии *Dpp*, дифференцировка стволовых клеток в гермариуме не происходит (Xie T, Spradling AC, 1998). Эктопическая экспрессия белка *Bam*, напротив, приводит к истощению пула стволовых клеток зародышевой линии (Ohlstein B, McKearin D, 1997).

Определяли относительное содержание морфогена *Dpp* и белка *Bam* в яичниках 2-дневных *D. melanogaster*, экспонируемых в условиях симулированной невесомости на машине случайного позиционирования, в течение 79 часов, что соответствует полному циклу оогенеза плодовой мушки.

Согласно полученным результатам, в группе, 79-часовая экспозиция которой проходила в условиях симулированной невесомости, содержание морфогена *Dpp* было уменьшено относительно показателя контрольной группы, но уровень содержания белка *Bam* в группе при этом был сопоставим с контролем.

Результаты, отражающие отсутствие изменений содержания *Bam*, при снижении относительного содержания *Dpp*, в яичниках мух после 79-часового воздействия условий невесомости, могут косвенно свидетельствовать об ускорении истощения пула стволовых клеток зародышевой линии в этих условиях и иметь значение для понимания механизмов, участвующих в его поддержании в условиях изменённой гравитации.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН 65.4.

Изменения состояний воды в листьях растений в условиях управляемой искусственной засухи

Галль И.Р.^{1*}

¹*Институт Аналитического Приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия;*
ivan.gall@mail.ru

Структурное состояние водной компоненты растения играет важнейшую роль в его водном режиме, определяя развитие и приспособляемость растения к условиям внешней среды. В соответствии с предсказаниями теории [1] водная система в живой клетке представлена двумя различными состояниями: водной компонентой цитоплазмы, электростатически напряженной растворенными в ней ионами и клеточными элементами, и стержневыми, близкими к фрактальным и кристаллическим, энергонапряженными структурами из молекул воды. Однако получить экспериментальное подтверждение такой водной структуры в живом сложно, поскольку большинство методов, используемых для исследования химического состава водной компоненты, не пригодны для работы с живыми системами без их разрушения. Ранее нами было показано, что низкочастотная Л-диэлькометрия, позволяющая проводить измерения в частотном режиме, характерном для структурных процессов в водных и водно-молекулярных системах живого позволяет получать требуемую информацию для растений без их разрушения [2]. В этом методе присутствие структуры воды определяется пиками в спектре тангенса диэлектрических потерь, получаемом при изменении частоты ЭМП колебательного контура, в котором исследуемое растение размещено в катушке индуктивности. Этим методом по изменению интенсивностей пиков в спектре $\text{tg}\delta$ в условиях искусственной засухи для различных фитотест-объектов было показано, что вода в живых растениях присутствует в виде двух независимых структур: воды свободной и воды связанной, причем при высыхании растения пики спектра, относящиеся к различным структурам, изменяются по-разному, что позволяет восстанавливать водный режим растения [3]. При этом «свободная» вода – водная составляющая цитоплазмы, высыхает в растении первой, в то время как «связанная» вода, составляющая сеть межмолекулярных и межклеточных коммуникаций растения, разрушается и высыхает значительно позже, когда вода цитоплазмы уже давно испарилась. Эта ситуация иллюстрируется последовательностью спектров на приведенном рисунке.

Полученные результаты полностью коррелируют с данными, получаемыми методом импульсного ЯМР, опубликованными в работах Казанской научной школы физиологов [4]. Результаты исследований состояния воды в листьях хлорофитума, высушенных различными методами, показывают, что режимы сушки по-разному изменяют соотношение свободной и связанной воды в процессе сушки растений.

1 Л.Н. Галль. Квантовая физика и биоэнергетика живых организмов 2023

2 Л.Н. Галль., С.И. Максимов, Т.С. Скуридина, Н.Р. Галль. Низкочастотная индуктивная диэлькометрия – информативный метод для изучения структурирования воды в водных растворах.//Научное приборостроение, 2016, Т.26, №1, с 19-24.

3 Л. Н. Галль, Т. Э. Кулешова, Н. Р. Галль, А. С. Бердников, И. Р. Галль.

О физико-химических свойствах воды в цитоплазме клеток растений. Журнал физической химии, 2023, том 97, № 1, с. 1–5.

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

Изучение влияния различных режимов сочетания фотобиомодуляции и ионизирующего излучения на опухолевые клетки Hela Kyoto

Белотелов А.О.^{1*}, Черкасова Е.И.¹, Юсупов В.И.³, Минаев Н.В.³, Кононова У.А.¹, Масленникова А.В.^{1,2}

¹*Нижегородский государственный университет им. Лобачевского ;*

²*Приволжский исследовательский медицинский университет;*

³*Институт фотонных технологий ФНЦ «Кристаллография и фотоника» РАН;*

arteom.belotelow@yandex.ru

Побочные эффекты со стороны нормальных тканей, возникающие в процессе лучевой терапии по поводу злокачественных новообразований, до сих пор представляют собой одну из нерешенных проблем современной радиационной онкологии. Фотобиомодуляция (ФБМ) на основании положительных результатов клинической практики в течение многих лет используется для профилактики и лечения побочных эффектов облучения, однако ее воздействие может происходить непосредственно в зоне расположения опухолевого очага (например,

при опухолях полости рта и глотки). С этой точки зрения, необходима оценка возможного стимулирующего и адаптивного эффекта фотобиомодуляции в отношении опухолевых клеток, которые могут оказаться в зоне светового воздействия параллельно с проведением лучевой терапии, а также изучение механизмов сочетанного действия ионизирующего и низкоинтенсивного оптического излучения на опухолевые клетки.

Целью данной работы было изучение влияния фотобиомодуляции видимого красного диапазона в сочетании с ионизирующим излучением на жизнеспособность, митохондриальный потенциал и клеточный цикл клеточной линии Hela Kyoto, в зависимости от дозы ионизирующего излучения, флюенса ФБМ, а также последовательности этих воздействий.

На первом этапе эксперимента на клетки опухоли воздействовали фотобиомодуляцией с флюенсами 3 мДж/см², 30 мДж/см² и 300 мДж/см², а также 0,5 Дж/см², 1 Дж/см² и 2 Дж/см², через час клетки облучались гамма-излучением в дозах 2 Гр, 4 Гр и 6 Гр. Через сутки после облучения производилась оценка жизнеспособности клеток методом МТТ-теста. На втором этапе первично проводилось гамма-облучение опухолевых клеток Hela в дозах 2 Гр, 4 Гр и 6 Гр, после чего на клетки воздействовали ФБМ с флюенсами, указанными выше. Через сутки проводилась оценка жизнеспособности клеток методом МТТ-теста. В качестве контроля использовались клетки после гамма-облучения в соответствующих дозах. Изучалось влияние различных режимов ФБМ в сочетании с ИИ на клеточный цикл и митохондриальный потенциал опухолевых клеток после сочетанного воздействия в режимах, описанных выше. Эксперименты проводились на проточном цитофлуориметре FACS Aria III (Becton, Dickinson and Company, США). Определение фаз клеточного цикла для клеток проводили при помощи набора для определения фаз клеточного цикла (APC BrdU Flow Kit, кат. № 552598 Becton, Dickinson and Company, США) с бромдезоксисуридином, меченным APC. Метод основан на совместном окрашивании общей ДНК 7-аминоактиномицином (7-AAD) и бромдезоксисуридином (BrdU). BrdU включается во вновь синтезированную клетками ДНК, входящими и проходящими через S-фазу клеточного цикла (синтез ДНК). При комбинации 7-AAD и инкорпорированного BrdU двухцветный проточный цитометрический анализ позволяет перечислять и характеризовать клетки, которые активно синтезируют ДНК с точки зрения их положения в клеточном цикле. По интенсивности окраски 7-Aminoactinomycin D судили о распределении клеток по фазам клеточного цикла и судили о процентном разделении клеток находящимся в S-фазе, фазе G₀/G₁ и перешедшим в фазу G₂/M.

Для определения трансмембранного потенциала митохондрий клеток использовали краситель MitoStatus TMRE (BD Pharmingen, США) - этиловый эфир тетраметилпродамина, катионный липофильный флуоресцентный краситель, и 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) (BD Pharmingen, США) - ДНК-связывающийся флуоресцентный краситель. Гейтирование проводили по присутствию в клетках красителей: 1) живые клетки с деполяризованной митохондриальной мембраной: TMRE(-) и 7-AAD(-); 2) живые клетки с неповрежденной митохондриальной мембраной: TMRE(+) и 7-AAD(-); 3) мертвые клетки с деполяризованной митохондриальной мембраной: TMRE(+) и 7-AAD(+); 4) мертвые клетки с неповрежденной митохондриальной мембраной: TMRE(-) и 7-AAD(+). При проведении подсчетов учитывали количество живых клеток с неповрежденной ММ, количество мертвых клеток с неповрежденной ММ и общее количество клеток (живых и мертвых) с деполяризованной ММ.

В результате исследования было выяснено, что фотобиомодуляция приводит к разнонаправленным эффектам в зависимости от дозы ионизирующего излучения, флюенса и последовательности этих воздействий на клетки. Предварительное воздействие фотобиомодуляции вызвало незначительное, но статистически значимое ингибирование пролиферации опухолевых клеток. В тоже время у опухолевых клеток, предварительно подвергнутых воздействию ионизирующего излучения (стимулирующий эффект), ФБМ с низкими флюенсами вызвало повышение пролиферативной активности. А воздействие фотобиомодуляции с высокими флюенсами, напротив, в некоторых случаях вызвало статистически значимое ингибирование клеточной пролиферации. При изучении изменения потенциала на внутренней ММ было показано, что возрастание количества живых клеток после ФБМ происходит именно за счет снижения доли клеток с деполяризованной митохондриальной мембраной, что соответствует данным МТТ-теста, который продемонстрировал повышение количества жизнеспособных опухолевых клеток при проведении ФБМ после гамма-облучения. Анализ клеточного цикла опухолевых клеток при различных режимах облучения показал, что воздействие ИИ вызывает блок митоза клеток и их накопление в фазе G₀/G₁, в свою очередь дополнительное воздействие фотобиомодуляции в некоторых случаях может усиливать этот процесс и увеличивать процент клеток накопившихся в данной фазе.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант №20-02-00531).

Изучение термостабильности комплекса бычьего сывороточного альбумина с галловой кислотой методами ИК-Фурье спектроскопии

Федорцов Н.М.^{1*}, Будкевич Р.О.¹

¹Северо-Кавказский Федеральный университет, Ставрополь, Россия;
fedortsov729@gmail.com

Бычий сывороточный альбумин (далее БСА) известен своими функциональными и технологическими свойствами, одним из которых является возможность связывания лигандов [1]. Ранее нами было показана возможность получения комплекса БСА с галловой кислотой для пищевой добавки с оптимальным составом [2]. Использование данного комплекса в пищевой промышленности для придания антиоксидантных свойств продуктам с функциональными свойствами предполагает проведение пастеризации и сохранение стабильности под влиянием высоких температур. Целью данной работы является изучение изменения термостабильности по показателям ИК-Фурье спектроскопии комплекса БСА с галловой кислотой.

Для проведения исследования использован комплекс, полученный в соответствии с ранее описанным методом [2]. Моделировали термическую обработку молочных продуктов (процесс пастеризации) в трех температурных диапазонах с различным временем выдержки образца – 62-65°C в течение 30 минут, 72-75°C в течение 30 секунд и 85-90°C без выдержки. В комплексе БСА с галловой кислотой в жидких образцах исследовали трансформацию химических связей при помощи ИК-Фурье спектрометра Nicolet iS50 (Thermo Scientific, USA) на приставке нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) Smart iTR ATR (ZnSe) (Thermo Scientific, USA).

Исследуемые ИК-спектры содержали различные уширенные пики в исследуемых диапазонах, что затрудняло процесс анализа. Для анализа использованы производные исходных спектров первого порядка с дифференцированием по методу Савицкого-Голея [3]. Термостабильность оценивалась по изменениям интенсивностей и сдвигов полос в регионе амида I, а именно 2 основные волны поглощения, отображающие происходящие изменения с БСА при температурном воздействии – 1652 см⁻¹ и 1675 см⁻¹ [4]. Данные длины волн характерны для изменений α-спирали БСА и разворачивания молекулы в пространстве, соответственно. Рассматривались совместно спектры БСА, прореагировавшего с полифенолом, и без него – контроль.

В контрольном образце на длине волны 1652 см⁻¹ с ростом температуры выявлено постепенное снижение оптической плотности (-1,4×10³, -1,42×10³ и -1,5×10³ соответственно для 62-65°C, 72-75°C и 85-90°C), что указывает на уменьшение доли α-спиралей во вторичной структуре. На полосе поглощения 1675 см⁻¹ наблюдается постепенное увеличение оптической плотности (-1,20×10³, -1,15×10³ и -1,14×10³ соответственно, с повышением температуры: 62-65°C, 72-75°C и 85-90°C), что указывает на увеличение доли случайных витков в молекуле БСА. Данные изменения свидетельствовали о денатурации исходной молекулы под действием температуры.

В экспериментальных образцах во всех исследуемых спектрах обнаруживается коротковолновый сдвиг. Так, ожидаемый пик 1652 см⁻¹ наблюдается на 1653,7 см⁻¹, а 1675 см⁻¹ на 1676,5 см⁻¹. Подобные сдвиги указывают на изменения характера пептидных связей в комплексе, что можно связать с образованием связей между БСА и полифенолом. На длине волны 1652 см⁻¹ в образцах комплекса, аналогично контролю, при температурном воздействии при росте температуры (62-65°C, 72-75°C и 85-90°C) происходит снижение оптической плотности, соответственно: -1,44×10³, -1,46×10³ и -1,47×10³. На полосе поглощения 1675 см⁻¹ оптическая плотность росла: 62-65°C (-1,23×10³), 72-75°C (-1,13×10³) и 85-90°C (-1,03×10³). В изучаемом комплексе БСА с галловой кислотой изменения обусловлены долей α-спиралей во вторичной структуре, что связано с образованием самого комплекса. При температурном воздействии видно, что даже при высоких диапазонах температур (85-90°C) доля α-спиралей в комплексе сохраняется в большем количестве (-1,47×10³), нежели в контроле – (-1,5×10³). На длине волны 1675 см⁻¹ наблюдается более значительное увеличение доли разворота молекулы БСА в комплексе (-1,03×10³), чем в контроле (-1,14×10³).

Таким образом, галловая кислота позволяет стабилизировать молекулу БСА при температурном воздействии в диапазоне пастеризации молочных продуктов и данный комплекс может быть использован в пищевой промышленности в соответствующих условиях производства.

Исследование финансировалось из средств гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации «Изучение механизмов взаимодействия молочнокислых микроорганизмов, лактозосбраживающих дрожжей и биологически активных веществ при микроинкапсулировании различных фракций микробиоты», Соглашение № 075-15-2022-1129 от 01.07.2022 г.

1. Patil V., Labade S., Khilare Ch. et al. A molecular bridge-like binding mode of buspirone to BSA: Multispectroscopic and molecular docking investigation // Chemical Data Collections, 2022, № 40, 100892.

2. Fedortsov N.M., Budkevich E.V., Evdokimov I.A. et al. Bovine serum albumin with gallic acid: molecular modeling and physicochemical profiling // Foods and Raw Materials, 2022, Т. 10. № 1. pp. 163-170.

3. A.P. Fellows, M.T.L. Casford, P.B. Davies. Spectral Analysis and Deconvolution of the Amide I Band of Proteins Presenting with High-Frequency Noise and Baseline Shifts // Applied Spectroscopy, 2020, T. 74, №5, pp. 597–615.

4. Krimm S., Bandekar J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins // Adv Protein Chem, 1986. №38. pp. 181-364.

Индукция адаптивного ответа у мышей непрямым действием паровоздушной смеси из высоковольтной разрядной камеры

Панчелюга В.А.^{1*}, Панчелюга М.С.¹, Заичкина С.И.¹, Дюкина А.Р.¹, Поцелуева М.М.¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;

victor.panchelyuga@gmail.com

В настоящее время в большинстве ведущих мировых держав существуют обширные государственные программы, направленные на исследование низкоэнергетических ядерных реакций (LENR). Характерная феноменология этих реакций обычно включает избыточное энерговыделение, изотопные изменения продуктов реакции, отсутствие обычных ионизирующих излучений и наличие пока не идентифицированного излучения, впервые описанного в работе [1], где оно было названо «странное излучение» (СИ), в первую очередь, по причине необычных треков, оставляемых им на фотодетекторах. Широкий спектр потенциальных приложений LENR-реакций делает особо актуальным исследование биологического действия сопровождающего их СИ-излучения.

Начало такому исследованию было положено в [2], где была создана экспериментальная система, позволяющая разделить действие СИ и сопутствующих электрическому разряду электромагнитных излучений. В работе [2], в качестве СИ-генератора использовался высоковольтный разряд в водо-воздушной смеси, а также то обстоятельство, что водяной пар может связывать СИ-частицы и транспортировать их по паропроводам [3] в бокс с экспериментальными животными. В качестве контроля использовался аналогичный бокс, наполняемый «чистым» паром от отдельного парогенератора. Оба бокса находились на равных расстояниях от источника электромагнитных излучений – экранированной разрядной камеры. Такая конструкция позволяла выровнять электромагнитное воздействие на опытную и контрольную группы животных, хотя, при этом, пар из разрядной камеры мог иметь несколько иные химические свойства по сравнению с «чистым» паром. Для устранения такого «химического» неравенства была осуществлена модернизация экспериментальной установки, т.о., чтобы исключить контакт животных с паровоздушной смесью. Для этого экспериментальный и контрольный боксы были выполнены в виде больших стеклянных стаканов, на которые были навиты «экспериментальный» и «контрольный» паропроводы из гибкого силиконового шланга.

Суммарно, использованный нами подход основан на трех предположениях: 1) СИ переносится паром; 2) СИ проникает через стенки силиконового шланга; 3) СИ имеет высокую концентрацию в малой окрестности СИ-генератора и паропроводов (около 20-30 см), как это следует из наших экспериментов [3] и из опытов других групп. На расстояниях, превышающих указанные значения происходит резкое (примерно на два порядка) уменьшение концентрации СИ. В силу 3) экспериментальная и контрольная катушки, разнесенные на расстояние около двух метров, оказываются надёжно разделёнными в отношении действия СИ. В то же время диаметры стаканов (18 см) выбраны такими, чтобы концентрация СИ внутри экспериментального стакана была максимальной. Таким образом, геометрия эксперимента, с одной стороны, позволяет выровнять электромагнитную и акустическую нагрузки на контрольную и опытную группы лабораторных животных и разделить эти группы в отношении действия СИ. При этом, в модернизированном варианте установки устраняется влияние неоднородности химического состава пара на животных.

В ходе эксперимента, лабораторных мышей помещали в контрольный и экспериментальный цилиндры на 60 минут в течение одного и двух дней. Одновременно, отдельную группу мышей облучали в дозе 0.1 Гр рентгеновского излучения и через сутки все группы облучали выявляющей дозой 1.5 Гр рентгеновского излучения. Через 28 ч, после облучения выявляющей дозой, мышей выводили из эксперимента методом декапитации и готовили цитологические препараты костного мозга. Цитогенетические повреждения оценивали путем подсчета количества полихроматофильных эритроцитов с микроядрами. В каждой экспериментальной группе использовали не менее 5 мышей.

В экспериментальной группе, предварительно экспонированной действию СИ в течение 60 мин, однократно, и затем дооблученных в дозе 1.5 Гр наблюдается снижение цитогенетических повреждений, т.е. наблюдается индукция адаптивного ответа. При этом, экспонирование животных в течение 2 дней по 60 минут уже не защищает от действия дозы 1.5 Гр, что указывает на преодоление порога адаптирующей дозы и приводит к повреждающим последствиям. Для рентгеновского излучения такая доза начинается от 0.5 Гр. Во всех экспериментах и при различных экспозициях в контрольной группе адаптивный ответ не выявлен.

Т.о., в результате проведенных исследований (выполнено три серии экспериментов), нами обнаружен слабый повреждающий фактор действие, которого на организм экспериментальных животных аналогично, согласно механизму кроссадаптации, влиянию рентгеновского излучения в дозе 0.05-0.4 Гр. Его источником, исходя из геометрии эксперимента, предположительно, являются частицы СИ, транспортируемые паром из разрядной камеры. Аналогичный «чистый» пар, циркулирующий вокруг контрольного бокса подобного действия не оказывает.

ЛИТЕРАТУРА

1. Уруцкоев Л.И., Ликсонов В.И., Циноев В.Г. Экспериментальное обнаружение "странного" излучения и трансформация химических элементов // Прикладная физика, 2000, №4, с.83-100.
2. С.И. Заичкина, А.Р. Дюкина, М.М. Поцелуева, С.С. Сорокина, Д.П. Ларюшкин, М.С. Панчелюга, В.А. Панчелюга, Д.С. Баранов, В.Н. Зателепин Биологические эффекты в окрестности высоковольтного электрического разряда в водо-воздушной среде // Вестник РАЕН, 2022, №1, с.22-30.
3. Баранов Д.С., Зателепин В.Н., Панчелюга В.А., Шишкин А.Л. Перенос "темного водорода" атомарным веществом. Методы диагностики "темного водорода" // РЭНСИТ, 2021, №3(13), с.319-328.

Использование биофизических подходов для выявления структуры признаков устойчивости растений к стрессовым факторам

Федулов Ю.П.^{1*}

¹Кубанский государственный аграрный университет;
fedulov.ju@kubsau.ru

Понимание механизмов реакции растений на стрессовые воздействия необходимо для эффективной селекции растений на устойчивость к повреждающим факторам среды.

В рамках решения этой задачи на большом наборе образцов была проведена оценка морозоустойчивости сортов озимой пшеницы разных регионов селекции комплексом биофизических и физиологических методов.

Исследования проводили на растениях, возделываемых в полевых условиях. Показателем морозоустойчивости являлся процент растений, выживших после промораживания в морозильных камерах (ПВ).

Состояние тканей растений до и после промораживания оценивали методами электропроводности. Устойчивость фотосинтетического аппарата оценивали по параметрам термограмм замедленной флуоресценции хлорофилла (ЗФ). Одновременно определяли содержание фотосинтетических пигментов и морфологические параметры растений.

Для всех параметров были рассчитаны коэффициенты корреляции для двух наборов сортов. Первый – для 10 сортов индикаторов морозоустойчивости, второй – для расширенного набора сортов 35-60 образцов. Выявлено, что ряд параметров имел высокую корреляцию с данными по выживанию растений после промораживания. Во все годы исследований связь изученных параметров с морозоустойчивостью была выше для сортов индикаторов, чем для расширенного набора.

Коэффициент корреляции электрического сопротивления тканей закалённых растений с ПВ был 0,80 для набора из десяти сортов-индикаторов морозоустойчивости, и 0,62 для расширенного набора сортов.

Среди проанализированных параметров термограмм ЗФ наиболее высокую связь с морозоустойчивостью показало отношение уровней ЗФ при 20оС и при температуре на 2-4оС ниже температуры низкотемпературного максимума послесвечения ЗФ. При этой температуре наблюдались максимальные различия в уровне послесвечения между образцами контрастными по морозоустойчивости. Коэффициент корреляции для этого параметра составил 0,46 для сортов-индикаторов и 0,32 для всего набора сортов.

Обработка собранного материала методом ортогонального факторного анализа позволила установить, что общая совокупность физико-химических, физиологических и морфологических признаков, связанных с морозоустойчивостью, можно объединить в компоненты, с помощью которых можно с высокой точностью описать морозоустойчивость.

Для каждого сорта были рассчитаны уравнения, где функцией является уровень морозоустойчивости, а аргументами – значения полученных компонент. Эти уравнения можно рассматривать как модель сложного признака морозоустойчивости, отражающую его сложную генетическую структуру [1].

Анализ распределения изученных параметров по компонентам, а также сравнение значений этих компонент у образцов с различными биологическими характеристиками и характера их изменений в ходе перезимовки позволили дать им биологически содержательную интерпретацию и определить их как физиологические системы, определяющие формирование сложного признака морозоустойчивость.

Первые четыре системы, суммарная значимость которых составляет 65-70%, были интерпретированы как неспецифическая устойчивость, обусловленная уходом в вынужденный зимний покой, способность к

переохлаждению внутриклеточной воды, способность расти при низких температурах и способность репарировать повреждения, нанесённые неблагоприятными факторами перезимовки.

Сравнение уравнений для сортов разных регионов селекции показало, что оптимальный уровень морозоустойчивости в разных регионах селекции может обуславливаться разными компонентами.

В последнее время в селекционной практике всё шире используются молекулярные маркеры различных селекционных признаков [2], в том числе и для поиска локусов количественных признаков – QTL (quantitative trait loci). При этом в качестве параметра, характеризующего морозоустойчивость, используют, процент растений, выживших после промораживания при критической температуре или температуру полувлетального выживания LT50.

Учитывая представленную модель структуры признака морозоустойчивости и характера ее изменения в зависимости от условий внешней среды, можно полагать, что более целесообразно осуществлять поиск QTL, связанных не с интегральным признаком морозоустойчивости, а с отдельными выявленными компонентами морозоустойчивости, которые в конкретном регионе селекции обеспечивают оптимальный уровень морозоустойчивости и не связаны отрицательно с продуктивностью.

Использованный подход позволяет выбрать в каждой компоненте биофизический, физиолого-биохимический или морфологический параметр, имеющий количественное выражение и наиболее тесно связанный с этой компонентой. Этот параметр может быть измерен для каждой особи изучаемой популяции или для группы генетически однородных особей, что является необходимым условием для картирования QTL.

Подобный подход можно использовать при селекции на устойчивость к любому абиотическому фактору, поскольку большинство из них имеет полигенную природу. Использование подобного подхода в селекции позволило бы более точно подгонять интересующие признаки устойчивости под будущие условия возделывания культуры.

Литература

1. Genes for frost resistance in wheat/ Sutka, J.// Euphytica. – 2001. – №119. – P.169–177.
2. Молекулярные маркеры в популяционной генетике и селекции культурных растений : монография / Чесноков Ю. В., Кочерина Н. В., Косолапов В. М.. — Москва : ООО «Угрешская Типо-графия», 2019. — 200 с.

Исследование влияния ЭМП низкой частоты на рост и хемилюминесценцию *B. subtilis*

Бокарева М.А.^{1*}

¹ФГБОУ ВО "Кубанский государственный университет";
mabokar5@icloud.com

В последнее время активно исследуется возможность использования электромагнитных полей (ЭМП) низкой частоты в области пищевой промышленности для обеспечения сохранности и безопасности и качества пищевых продуктов [1, 2], для поддержания пищевых, физико-химических и органолептических свойств пищи, повышения стабильности при хранении за счет устранения вредоносных биологических агентов, блокировки активности ферментов и уменьшения количества микроскопических, плесневых и дрожжевых грибов, бактерий [3]. ЭМП низких частот используется для уменьшения количества микроорганизмов при хранении, орехов, сухофруктов, специй и др. [4]. При воздействии неионизирующего излучения разрушение микроорганизмов осуществляется за счет окислительного повреждения ДНК, белков и липидов и приводит к гибели микробных клеток [5]. Актуальным остаётся вопрос исследования влияния ЭМП низких частот на определенные группы микроорганизмов, имеющие практический интерес или выступающие в качестве модельных объектов.

В качестве таковых интерес представляют микроорганизмы, обитающие на поверхности плодов и овощей. Соответственно, в качестве модельной культуры были использованы *Bacillus subtilis*.

Эффекты влияния бактерий на растения могут иметь различный характер – так упомянутый штамм в нормальных условиях может оказывать рост-стимулирующее влияние, защищать растения от агрессивных фитопатогенов. С другой стороны, при хранении растительной продукции нативная микрофлора в результате интенсивного развития и ассимиляции питательных веществ тканей растений может привести к ухудшению товарных свойств растительной продукции.

Цель работы заключалась в исследовании влияния переменного электромагнитного поля низкой частоты *in vitro* на динамику роста, накопление биомассы клеток и выраженность окислительного стресса лабораторных микроорганизмов *Bacillus subtilis*.

Обработку микроорганизмов перед началом культивирования осуществляли переменным электромагнитным полем с частотами от 7,0 до 25,0 Гц непосредственно в 96-луночных планшетах в экранированной камере [6]. Схема состояла из генератора низкочастотных сигналов ГЗ-118, который представляет собой источник синусоидального сигнала прецизионной формы, катушки индуктивности,

имеющей 1200 витков. Катушка была помещена в экранированную камеру, которая изготавливалась из конструкционной стали толщиной 3 мм. Ослабление внешних ЭМП камерой в диапазоне от 3 Гц до 300 кГц достигало около 100 раз. Сопротивление катушки составляло 320 Ом, напряжение на катушке — 14 В. Обработку ЭМП проводили при комнатной температуре (22 ± 1 °C) в течение 1 мин на выбранной частоте. Напряженность поля в месте нахождения образца составляла 550 ± 30 А/м. Контроль напряженности поля производили с помощью анализатора спектра «Экофизика-110А» и антенны Пб-70.

Обработка электромагнитным полем низкой частоты бактерий, показала, что воздействие ЭМП с частотой 9 Гц приводит к наибольшему снижению интенсивности роста и накопления биомассы (по сравнению с обработкой образцов электромагнитным полем с другими низкими частотами). Максимум вспышки хемиллюминесценции на 39% превышал контрольный образец (без обработки). Одним из возможных механизмов реализации воздействия ЭМП низких частот на живые системы может являться окислительное повреждение ДНК [5]. Полученные данные хемиллюминесценции бактерий подтверждают эту гипотезу.

Литература

1. Mirza Alizadeh, A., Hashempour-Baltork, F., Khaneghah, A. M., Hosseini, H. New perspective approaches in controlling fungi and mycotoxins in food using emerging and green technologies// *Current Opinion in Food Science*. 2021. № 39, P. 7–15. DOI: 10.1016/j.cofs.2020.12.006.

2. Барышев М.Г., Касьянов Г.И., Джимаков С.С. Влияние низкочастотного электромагнитного поля на биологические системы // *Известия вузов Пищевая технология*. 2007. №3. С.44–48.

3. Касьянов Г.И. Перспективы обработки пищевого сырья электромагнитным полем низкой частоты // *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. 2014. № 1 (337). С. 35–38.

4. A review on novel non-thermal food processing techniques for mycotoxin reduction / O. A. Adebo, A. B. Oyediji, S. Gbashi, M. A. Adefisoye, O. M. Ogundele // *Food Science & Technology*. 2020. № 56(1). P. 13–27. DOI: 10.1111/ijfs.14734.

5. Tekutskaya E.E., Baryshev M.G., Gusaruk L.R., Ilchenko G.P. Oxidative Damage to DNA under the Action of an Alternating Magnetic Field // *Biophysics*. 2020. Vol. 65.№. 4.P. 564–568. DOI: 10.1134/S0006350920040247.

6. A Device for Searching for Optimal Alternating Magnetic Field Parameters for the Treatment of Biological Objects / G.P. Il'chenko,

M.G. Baryshev, E.E. Tekutskaya, V.S. Shelistov, A.V. Nikitin// *Measurement Techniques*. 2017.№ 60(6).P. 632–637.DOI: 10.1007/s11018-017-1247-7.

Исследование дефектов структуры ДНК спектральными и гидродинамическими методами

Пастон С.В.^{1*}, Мурзакова И.Ф.¹, Иванова Д.Н.¹

¹СПбГУ;

svpaston@list.ru

Повреждения молекулы ДНК являются одним из пусковых механизмов развития патологических процессов в клетке. Различные виды повреждений делят на две группы: односайтовые, или одиночные повреждения, такие, как однонитевые разрывы (ОР), модификации оснований, отрыв оснований (результатом которого являются апуриновые и апиримидиновые сайты –АП-сайты). Вторая группа – локальные множественные повреждения (ЛМП), такие, как кластерные повреждения (два и более близко расположенных односайтовых повреждения), двунитевые разрывы ДНК (ДР), межмолекулярные сшивки ДНК-белок и ДНК-ДНК [1,2]. Односайтовые повреждения эффективно устраняются репарирующей системой клетки с использованием в качестве матрицы неповрежденной нити ДНК, антипараллельной поврежденной. Такие повреждения возникают в ДНК спонтанно, чаще всего вследствие взаимодействия с окислительными радикалами, образующимися в клетке в норме. Превышение нормального уровня активных форм кислорода (АФК) в результате различных патологических процессов или под действием ионизирующего излучения приводит к накоплению большого количества повреждений ДНК, причем плотноионизирующее излучение индуцирует в ДНК ЛМП по механизму прямого действия [3]. Исследование механизмов образования и распределения дефектов в структуре ДНК под действием различных физико-химических факторов, влияние условий среды и структуры интактной макромолекулы на этот процесс необходимо для понимания начальной стадии таких важных внутриклеточных процессов, как репарация, апоптоз, онкогенез. В настоящей работе применяются спектральные и гидродинамические методы для исследования дефектов в структуре ДНК, вызванных неионизирующим УФС светом, а также гамма-излучением.

Уменьшение объема макромолекулярного клубка ДНК в водно-солевом растворе, являющееся, в частности, следствием локальной денатурации (возникающей в местах нарушения первичной структуры ДНК) фиксировали методом низкоградиентной вискозиметрии. Дозовые зависимости характеристической вязкости

ДНК, пропорциональной её удельному объёму, показывают, что при уменьшении ионной силы раствора радиационные эффекты усиливаются. В работе [4] было показано, что гамма-облучение в дозах до 30 Гр не приводит к уменьшению термодинамической жесткости ДНК, следовательно, наблюдаемое снижение удельного объёма происходит вследствие подавления дальних взаимодействий в цепи ДНК. Другие эффекты, вызванные облучением (снижение температуры плавления, разрушение азотистых оснований ДНК) также существенно зависят от ионной силы раствора: чем меньше ионная сила раствора, тем больше радиочувствительность ДНК. Известно, что при снижении ионной силы раствора объём интактной ДНК в растворе увеличивается, то есть увеличивается размер мишени в облучаемом образце. Кроме того, стабильность вторичной структуры ДНК уменьшается при снижении концентрации противоионов в растворе. Можно заключить, что эти факторы играют определяющую роль в формировании повреждений в структуре ДНК.

Вклад прямого и косвенного действия излучения возможно выявить, используя перехватчики активных продуктов радиолитической воды, либо варьируя концентрацию мишеней в облучаемом образце. В работе определён радиационно-химический выход G разрушения тимидина под действием гамма-излучения в водных (1.60 молекул/100эВ) и водно-этанольных растворах (0.11 молекул/100эВ при $S_{эт} = 15\text{об.}\%$), а также при воздействии реактива Фентона (0.45 моль/2.6 моль реактива). Получена зависимость G разрушенных азотистых оснований ДНК от дозы облучения и от концентрации ДНК в облучаемом растворе ионной силы 5мМ NaCl. В интервале концентраций ДНК 2мг/дл–7мг/дл наблюдается постоянство G – так называемый эффект разбавления, свидетельствующий, что все образованные продукты радиолитической воды вступают в реакции с ДНК. Снижение радиационных повреждений ДНК в присутствии этанола в облучаемом растворе наблюдается в широком диапазоне ионных сил.

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники» и «Оптические и лазерные методы исследования вещества».

1. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М.: Физматлит, 2004.
2. C. von Sonntag. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair, A Chemical Perspective. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006.
3. Murshed H. Fundamentals of Radiation Oncology: Physical, Biological, and Clinical Aspects. 3rd ed. Academic Press, 2019. 743 p.
4. Frisman E., Zarubina O. Effect of gamma-irradiation on the conformation of the native DNA molecule. Biophys. Chem., 1993, v.46, p.37.

Исследование растительных тканей с помощью электроимпедансной спектроскопии

Асташев М.Е.^{1,2*}, Кончечков Е.М.¹, Колик Л.В.¹, Гудков С.В.¹

¹ИОФ РАН;

²Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

astashev@yandex.ru

Электроимпедансная спектроскопия (ЭИС) — это метод анализа электрического сопротивления или проводимости материалов и систем на разных частотах. Записанное сопротивление в зависимости от частоты затем связывают с физическими параметрами или свойствами материалов и систем. В биологии ЭИС применима как к растительным, так и к животным системам. Сосудистая система растений в основном выполняет две функции - доставляет питательные вещества к органам растения и служит системой передачи химических сигналов. Особенности сосудистой системы растений также можно изучать с помощью ЭИС. Для решения этих задач транспортную систему можно представить в виде комбинации сопротивлений и конденсаторов. Флоэма и ксилема, относительно хорошо проводящие электричество вдоль стебля, обеспечивают, преимущественно, резистивные свойства, в то время как разделяющий их камбий с низкой проводимостью - емкостные. Кроме того, измерения электрического импеданса можно проводить неинвазивно на относительно молодых побегах, что позволяет выявлять стрессовые факторы уже на ранних стадиях развития растений. Как правило, использование ЭИС связано с необходимостью организации специальных лабораторных условий для проведения измерений. Нами разработан прибор и алгоритм измерительной процедуры, которые позволяют проводить мониторинг состояния деревьев *in situ*, как в поле, так и в теплицах. При этом можно определить влажность, развитие сосудистой системы, скорость заживления внутренних повреждений, например, при прививке деревьев.

Для измерения импеданса мы разработали прибор на базе микросхемы АЦП AD5933 (Analog Devices) и контроллера АТМega328 (Microchip). Интерфейс с компьютером осуществляется с помощью модуля Bluetooth HC-05. Питание устройства осуществляется от двух последовательно соединенных литий-ионных аккумуляторов

типа 18650. Разработанное нами устройство также имеет функцию автокалибровки, защиты от электростатических разрядов и функцию температурной компенсации измерений.

Измерения проводились с целью получения зависимости электрического импеданса от частоты приложенного к образцу напряжения, т.е. спектра импеданса. Для этого был получен ряд комплексных данных для ряда частот от 2 кГц до 10 кГц с шагом 1 кГц и от 20 кГц до 100 кГц с шагом 10 кГц. Такая сетка частот позволяла, с одной стороны, максимально использовать автоматизацию процедуры измерения, заложенную в AD5933, а с другой стороны, сэкономила время измерения в диапазоне частот от 20 до 100 кГц.

Измерение импеданса образцов ветвей деревьев диаметром 6-30 мм и длиной 100-500 мм осуществляли путем подключения прибора к коре исследуемой ветки через электролитические мостики, в качестве которых использовались прямоугольные отрезки гигиенических ватных дисков размером 10x30 мм, толщиной 2 мм, которые смачивали 5% раствором бикарбоната натрия в дистиллированной воде. Качество контактов оценивали по стабильности показаний проводимости, для чего каждый образец измеряли не менее 5 раз подряд.

Мы обнаружили, что импеданс ветвей содержит как постоянные компоненты, так и компоненты, зависящие от длины ветви и их диаметра. Первые соответствуют подключению измерительной системы к биологическому объекту, вторые, собственно и представляют интерес. Для разделения этих компонент мы получили зависимость спектра импеданса от длины ветвей и их диаметра. Измерения с изменением длины ветвей проводили при длине 100мм, 200мм, 300мм, 400мм и 500мм при одинаковом диаметре ветви 23мм. Измерения с изменением диаметра проводили при постоянной длине 300мм и на ветках с диаметром 5, 8, 12, 22мм. Для всех измерений использовали ветви яблони сорта Мельба. Каждую точку промеряли минимум 3 раза на разных ветвях для исследования стабильности измерений. В результате были выявлены постоянные емкостные компоненты импеданса, за которые, вероятно, ответственны переходные емкости от электродов к внутренним тканям растения, сформированные плохо проводящими электрический ток слоями коры (корка, перидерма) в качестве изолятора. Дополнительно мы получили возможность оценить общую толщину этих компонентов, которая составила около 9мкм для относительно молодых ветвей диаметром 5-23мм. Вычтя из общего импеданса емкостную часть электродов, мы получили представление о импедансе тканей растения, и его зависимости от диаметра и длины ветвей. Это позволило построить структурную электротехническую модель участка ветви растения и оценить реальные параметры проводимости ксилемы и флоэмы. Модель удовлетворительно описывает экспериментально полученные данные.

Кроме того, были измерены и температурные зависимости импеданса при температурах 4, 23 и 36 градусов. Полученное относительное значение наклона характеристики составило 0.014–0.017 К⁻¹, что означает уменьшение значения модуля импеданса на 30% при увеличении температуры на 20 К. Это изменение совпадает с изменением сопротивления раствора электролита, содержащего относительно малые ионы (H⁺, K⁺, Na⁺, Cl⁻ и т.п.) и в целом соответствует нашим ожиданиям от измерения сопротивления жидкости в сосудах растения. Однако такая температурная зависимость требует введения схемы компенсации для измерения в полевых условиях, что и было сделано путем добавления в схему прибора датчика DS18B20.

Для оценки повреждения ветвей были измерены значения импеданса при высыхании веток, которые показали, что при высыхании сопротивление резистивных компонентов увеличивается в 12 раз за 15 дней высыхания.

В результате проделанной работы был выработан следующий алгоритм измерения: необходимо выбрать вервь диаметром 10-30мм. Необходимо провести 3 измерения с уменьшающейся длиной участка измерения, например 500мм, 300мм и 100мм. Для анализа необходимо указать средний диаметр, длину измеряемого участка и температуру измерения. В результате автоматической подгонки параметров модели, и исследователь получает: толщину изолирующего слоя коры, удельное сопротивление ксилемы, удельное сопротивление флоэмы. Данный подход планируется реализовать в виде программного продукта.

Исследование реакции организма лабораторных животных на пятикратное повышение концентрации дейтерия в питьевой воде

Козин С.В.^{1,2}, Кравцов А.А.^{1,2}, Дорохова А.А.^{1,2*}, Лясота О.М.¹, Моисеев А.В.³, Ивлев В.А.⁴, Дроздов А.В.⁵

¹ФГБУН ФИЦ «Южный научный центр РАН»;

²ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» ;

³ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет»;

⁴ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

⁵ФГБУН «Институт аналитического приборостроения РАН»;

013194@mail.ru

Известно, что изотопный состав атмосферы Марса значительно отличается от земного - в ней присутствует в 6 раз больше дейтерия (700-1000 ppm), на 70% больше азота-15 и на 5% - углерода-13 и кислорода-18. Прежде чем отправлять экспедицию на Марс с целью основания колонии, необходимо выяснить, как отличный от земного марсианский изотопный состав повлияет на жизнедеятельность млекопитающих. Известно, что снижение содержания дейтерия в питьевом рационе может оказывать стимулирующее влияние на функциональную активность живых систем, тогда как значительное увеличение концентрации дейтерия способно ингибировать жизненно важные процессы, а в ряде случаев отмечено, что умеренные колебания концентрации дейтерия (как при повышении, так и при уменьшении его содержания в воде) способны повышать функциональную активность живых систем [1, 2].

К настоящему времени опубликовано значительное количество работ, в которых описано как активирующее, так и ингибирующее влияние воды с пониженным относительно природного уровня содержанием дейтерия практически на все уровни организации живой материи (молекулярный, клеточный, тканевой, организменный) [3-5]. При этом особый интерес представляет исследование влияния воды, в которой содержание дейтерия сопоставимо с таковым в ледниковых шапках Марса, на функциональные системы неспецифической защиты организма. И, прежде всего, на ее прооксидантно-антиоксидантное звено, нарушения в котором играют существенную роль в развитии многих заболеваний.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования являлось изучение влияния воды с модифицированным изотопным составом (750 ppm) на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы печени и крови лабораторных животных.

Изотопный обмен протона на дейтрон в гидратационной воде или в функциональных группах аминокислотных остатков, находящихся на поверхности белковой структуры, способствует укреплению межмолекулярных связей между гидратационным слоем и макромолекулой, что в конечном счете может привести к изменению функциональной активности белка.

Ранее нами установлено, что среда с концентрацией дейтерия 50 ppm приводит к снижению скорости окисления о-дианизидина пероксидом водорода, катализируемое пероксидазой хрена [6].

Учитывая полученные результаты флуоресцентной и КД-спектроскопии, вероятнее всего, усиление водородных связей приводит к конформационным перестройкам в молекуле БСА (бычий сывороточный альбумин). Потеря процента альфа спиральности говорит об изменениях во вторичной структуре БСА. Известно, что у БСА имеется два триптофановых остатка, один из них находится на поверхности молекулы, а другой внутри нее. Основными тушителями триптофановой флуоресценции являются молекулы растворителя (воды), а также тирозиновые остатки за счет переноса энергии по диполь-дипольному механизму. Можно предположить, что снижение интенсивности триптофановой флуоресценции может быть следствием увеличения доступности растворителю остатков триптофана и возрастанию вероятности переноса энергии с триптофана на тирозиновые остатки. Таким образом, проведенные оптические исследования указывают на модификацию структуры БСА в среде с концентрацией дейтерия 487 ppm.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что у крыс при потреблении воды с повышенным содержанием дейтерия (750 ppm) наблюдается одновременно как снижение интенсивности свободнорадикальных процессов в крови и гепатоцитах, так и нарастание антиоксидантного потенциала в тканях печени, в том числе за счет увеличения содержания низкомолекулярных тиоловых антиоксидантов. Полученные в работе данные указывают на возрастание функциональной активности прооксидантно-антиоксидантного звена системы неспецифической защиты организма на фоне питьевого рациона с пятикратным увеличением дейтерия.

Таким образом, повышение содержания дейтерия до 750 ppm в питьевом рационе млекопитающих, т.е. уровня аналогичного марсианским ледникам, оказывает биологическое действие на тканевом и молекулярном уровне, активируя антиоксидантную систему млекопитающих. Приведенные в работе результаты не дают полных оснований утверждать, что марсианские ледники пригодны для осуществления жизни на этой планете. Данное исследование открывает предпосылки для дальнейшего изучения биологических эффектов относительно

высоких концентраций дейтерия, соответствующих его содержанию в ледниковых шапках на полюсах Марса (от 700 до 1000 ppm), и понимания возможности его колонизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке 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 2H/1H Isotope Fractionation and Deuterium Interactions with Other Biogenic Isotopes. *Molecules*. 2019; 24(22):4101. Doi: 10.3390/molecules24224101

2. Лобышев В.И., Калинин Л.П. Изотопные эффекты D₂O в биологических системах (Наука, М., 1978).

3. Kravtsov A., Kozin S., Basov A., et al. Reduction of Deuterium Level Supports Resistance of Neurons to Glucose Deprivation and Hypoxia: Study in Cultures of Neurons and on Animals. *Molecules*. 2022, 27(1):243. doi: 10.3390/molecules27010243.

4. Basov A.A., Kozin S.V., Bikov I.M., et al. Changes in prooxidant-antioxidant system indices in the blood and brain of rats with modelled acute hypoxia which consumed a deuterium-depleted drinking diet. *Biol. Bull.* 2019, 46, 531–535.

5. Kozin S., Skrebitsky V., Kondratenko R., et al. Electrophysiological activity and survival rate of rats nervous tissue cells depends on D/H isotopic composition of medium. *Molecules* 2021, 26, 2036. Doi: 10.3390/molecules26072036

6. Kozin S.V., Kravtsov A.A., Churkina A.V., Malyshko V.V., Turoverov K.K., Fonin A.V., Chikhirzhina E.V., Moiseev A.V. Changes in the functional activity of horseradish peroxidase and bovine serum albumin in media with different isotope 2H/1H compositions. *Biophysics*. 2020. Т. 65. № 2. С. 195-201. DOI: 10.1134/S0006350920020098

Исследование цитотоксичности нитрата серебра и серебряно-цистеиновых комплексов

Богданов А.А.^{1,2*}, Клименко В.В.¹, Богданов А.А.¹, Моисеенко В.М.¹

¹Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический);

²Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация;
vip.nasa@bk.ru

Введение.

В настоящее время большое количество исследований посвящено изучению противоопухолевой активности наночастиц и соединений серебра, одним из которых является нитрат серебра. Однако нитрат серебра обладает системным и местным токсическим эффектом. В данной работе был предложен метод синтеза неметаллических комплексов, не содержащих токсичных нитрат-ионов, а также исследована цитотоксичность нитрата серебра и серебряно-аминокислотных комплексов.

Материалы и методы

Для определения цитотоксической активности изучаемых веществ *in vitro* использовалась проточная цитофлуорометрия и колориметрический МТС-тест. Разработан химический метод синтеза новых нанок комплексов серебра с цистеином. Физические свойства нанок комплексов серебра с цистеином исследованы методом динамического светорассеяния.

Результаты

Ранее в работе по изучению цитотоксической и противоопухолевой активности нитрата серебра, нами было показано, что нитрат серебра обладает цитотоксическим действием, в результате исследования было получено значение IC₅₀ для опухолевых линий HeLa и K-562 которое в 20 раз выше, чем IC₅₀ для нормальных МНК человека. Также было показано, что нитрат серебра обладает противоопухолевым действием в отношении солидной опухоли Эрлиха, однако соединение также обладает системными и местными токсическими эффектами [6]. Предположительно, одним из механизмов местной токсичности, является выделение азотной кислоты при взаимодействии ионов серебра с сульфид-содержащими соединениями, такими как цистеин, концентрация в крови которого в норме составляет 166,6-249,9 мкМ, что, при введении нитрата серебра (без учета буферной емкости крови), может вызвать локальное уменьшение pH крови до 4 при нормальном значении 7.5. Нитрат-ион в свою очередь так же является токсичным соединением. Возможным путём уменьшения системной и местной токсичности, наблюдаемой при введении чистого нитрата серебра, является синтез неметаллических комплексов, не содержащих токсичных нитрат-ионов. Наиболее простым, доступным и физиологичным комплексообразующим веществом может выступать аминокислота цистеин, способная эффективно связывать ионы Ag⁺. В ходе работы была проведена разработка общей схемы синтеза, осуществлён подбор оптимальных условий синтеза и очистки таких комплексов.

При взаимодействии водного раствора цистеина с нитратом серебра при различных соотношениях $R = \text{Cys}:\text{Ag}$ образуются наноразмерные комплексы. Гидродинамический диаметр этих комплексов для различных R был измерен методом динамического светорассеивания, также были определены значения электрокинетического потенциала полученных комплексов. Исследуемые комплексы имеют характерный размер в несколько десятков нанометров вплоть до соотношения $R = 1:2$, при увеличении мольной доли нитрата серебра в исходной смеси до 2,5, гидродинамический диаметр увеличивается до $\sim 100\text{нм}$, и при достижении $R = 1:4$ достигает микронного размера. Электрокинетический потенциал исследуемых частиц равномерно возрастает с увеличением R , при соотношении $\text{Ag}:\text{Cys} = 1:1$ его величина составляет $35 \pm 3,78\text{мВ}$, при увеличении R до 1:4, значение электрокинетического потенциала возрастает до $52 \pm 4,4\text{мВ}$. При измерении спектров ультрафиолетового и оптического поглощения полученных комплексов было показано, что значения поглощения растут вместе с увеличением отношения R на всем исследуемом интервале длин волн. Отсутствие характерного для металлических наночастиц серебра широкого пика плазмонного резонанса на $\lambda = 410\text{нм}$, подтверждает неметаллическую природу синтезированных комплексов. Измеренное значение pH раствора после образования AgCys комплексов составило 1,5, что делает неочищенные комплексы непригодными как для *in vivo*, так и для *in vitro* исследований. После очистки полученных комплексов от азотной кислоты а так же остатков непрореагировавших исходных соединений значение pH полученного раствора составило 7, что говорит об отсутствии азотной кислоты и потенциальной применимости комплексов при исследовании *in vitro* и *in vivo*.

На основании результатов синтеза и очистки серебрно-цистеиновых комплексов нами была выполнена работа по исследованию противоопухолевой активности данных комплексов *in vitro* на различных опухолевых и нормальных, человеческих и мышинных клеточных культурах. IC_{50} для наноккомплексов AgCys были получены для различных культур клеток: K-562 - $\text{IC}_{50} = 22,2 \pm 1,61$ мкг/мл; HeLa - $\text{IC}_{50} = 22,2 \pm 1,61$ мкг/мл; 3T3b - $\text{IC}_{50} = 22,2 \pm 1,61$ мкг/мл; СТ-26 - $\text{IC}_{50} = 9 \pm 2,17$ мкг/мл, токсичности в отношении МНК периферической крови человека в диапазоне исследованных концентраций не наблюдалось, что может свидетельствовать об избирательном действии в отношении опухолевых клеток.

Заключение

В результате выполненной работы был предложен метод синтеза серебрно-цистеиновых неметаллических наноккомплексов, исследованы и подобраны оптимальные условия и концентрации. На различных нормальных и опухолевых клеточных культурах человека и мыши была показана противоопухолевая активность серебрно-цистеиновых комплексов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга для ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)»

Клеточное дыхание яичников мыши после 4-суточного антиортостатического вывешивания

Горбачева Е.Ю.¹, Свентицкая М.А.^{1*}, Бирюков Н.С.¹, Огнева И.В.¹

¹Лаборатория биофизики клетки, Институт медико-биологических проблем РАН;
ma_sventitskaya@mail.ru

Влияние факторов космического полета на женскую репродуктивную систему до сих остается практически неизученным, хотя все больше женщин участвуют в реализации космических программ. Однако исследования с участием человека и, тем более, в условиях реального полета, реализовать достаточно сложно. Поэтому общепринятой практикой является использование наземных моделей и проведение экспериментов на животных. Целью данной работы было определение клеточного дыхания яичников мышей после моделирования условий космического полета.

Проводили антиортостатическое вывешивание самок мышей по методу Ильина-Новикова в модификации Морей-Холтон в течение полного эстрального цикла – 96 часов. В эксперименте использовали 14 мышей, которые были случайным образом разделены на две группы: контроль (С) и антиортостатическое вывешивание (НС). Масса животных в группе С составила $27,9 \pm 0,6$ г, в группе НС – $27,1 \pm 0,9$ г. Эвтаназию животных проводили овердозой ингаляционного наркоза «Изофлуран» и немедленно выделяли яичники, один из которых замораживали для последующего определения содержания белков и мРНК, а второй использовали для оценки клеточного дыхания методом полярографии. Проводили субстрат-ингибиторный анализ в соответствии с протоколом Kuznetsov A.V. et al. (2008). После переноса пробы в полярографическую кювету записывали V_0 – скорость поглощения кислорода пермеабелизированными клетками. Затем добавляли 10 мМ глутамат и 5 мМ малат, субстраты первого комплекса дыхательной цепи и записывали скорость дыхания $V_{\text{glu+mal}}$. Далее добавляли 2 мМ АДФ и записывали максимальную скорость дыхания V_{max} . Затем, поочередно добавляли ингибиторы и субстраты следующих комплексов дыхательной цепи для анализа их функциональной активности:

0.5 мкМ ротенон (ингибитор комплекса I), 10 мМ сукцинат (субстрат комплекса II) – записывали скорость поглощения кислорода $V(II)$, 5мкМ антимицин А (ингибитор комплекса III), 0.5 мМ TMPD + 2 мМ аскорбат (искусственные субстраты комплекса IV) – записывали скорость поглощения кислорода $V(IV)$. После субстрат-ингибиторного анализа для каждой пробы проводили тест на интактность внешней мембраны митохондрий путем добавления 10 мкМ цитохрома с: если мембрана интактна, то скорость дыхания не меняется или увеличивается максимум на 15%. Скорость клеточного дыхания выражали в пкмоль O_2 / мл / мин / мг сухой массы яичника. Все эксперименты с животными были одобрены комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 622 от 12 октября 2022 года).

Полученные результаты свидетельствуют о достоверном повышении V_0 , $V_{glu+mal}$ и V_{max} на 81%, 169% и 133% ($p < 0,05$), соответственно, после вывешивания по сравнению с контролем. Проведенный субстрат-ингибиторный анализ показывает, что $V(II)$ и $V(IV)$ остались без изменений после моделирования эффектов невесомости. Это может свидетельствовать, в первую очередь, о том, что увеличение максимальной скорости дыхания яичников после вывешивания обусловлено первым комплексом дыхательной цепи.

Однако, содержание мРНК генов, кодирующих цитохром с и одну из субъединиц Н⁺-АТФ-синтазы увеличилось на 272 % и 182% ($p < 0,05$), соответственно, в группе антиортостатического вывешивания относительно контроля, хотя относительное содержание мРНК гена, кодирующего цитохром-с-оксидазу, оставалось неизменным.

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что через 96 часов антиортостатического вывешивания имеет место интенсификация клеточного дыхания яичников мыши. Следует отметить, что аналогичную ситуацию мы наблюдали при экспозиции *Drosophila melanogaster* в условиях моделируемой невесомости (Ogneva I.V., Usik M.A., 2021; Usik M.A. et al., 2021). Можно предположить, что увеличение клеточного дыхания может опосредовать формирование адаптационного паттерна экспрессии генов, кодирующих белки, формирующие комплексы дыхательной цепи.

Следует отметить, что первый комплекс дыхательной цепи является одним из наиболее значимых источников активных форм кислорода в клетке, накопление которых, в свою очередь, может иметь ряд негативных последствий. Однако пока нет данных, подтверждающих подобный сценарий в яичниках мышей после антиортостатического вывешивания, что требует проведения дальнейших исследований.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН 65.4.

Количественный анализ роста и гибели опухолевых клеток в коллагеновом гидрогеле в ответ на депривацию и терапевтическое воздействие с использованием флуоресцентной визуализации

Сенча Л.М.^{1*}, Добрынина О.Е.¹, Поспелов А.Д.¹, Гурьев Е.Л.¹, Черкасова Е.И.¹, Балалаева И.В.¹

¹ННГУ им. Н.И. Лобачевского;

luda-sencha@mail.ru

Микроокружение опухоли в настоящее время рассматривается как один из важнейших факторов формирования фенотипа клеток, обеспечивающего их существование и пролиферацию в условиях гипоксии и дефицита питательных веществ, а также резистентность клеток к воздействию цитотоксических соединений. Поэтому в настоящее время все большую популярность приобретают трехмерные модели *in vitro*, более релевантные в отношении сложной структуры опухоли *in vivo*. Переход от 2D к 3D клеточным культурам требует модификации методов оценки роста опухоли, при этом подавляющее большинство используемых методов требуют разрушения структуры геля, что делает исследование дорогостоящим и трудоемким. Целью данной работы являлась разработка метода количественной оценки роста опухолевых клеток в коллагеновом гидрогеле с использованием флуоресцентного подхода и его апробация в исследовании ответа клеток на неблагоприятные условия культивирования и цитотоксическое воздействие.

В работе были использованы клетки карциномы яичника человека SKOVip-kat с геном красного флуоресцентного белка TurboFP635 и клетки эпидермоидной карциномы человека A431-GFP с геном флуоресцентного белка GFP. При создании 3D-культуры клеток использовали раствор коллагена I типа. Клетки были заключены в гидрогели, обогащенные питательной средой, путем смешивания клеточной суспензии с ингредиентами геля. Полученные гели инкубировали в течение 8-10 суток при 37°C и 5% CO₂. Рост клеток контролировали путем прямого подсчета их количества после деструкции геля, а также путем анализа общего содержания ДНК в гелях. Помимо этого, нами предложен подход, основанный на регистрации интегральной флуоресценции гелей без их разрушения. Для этого ежедневно получали изображения гелей используя установку для поверхностного флуоресцентного имиджинга и производили обработку изображений с помощью программы ImageJ. Было проведено сравнение скорости роста культур опухолевых клеток в стандартных

условиях, в условиях питательной депривации (культуральная среда без FBS или глюкозы) и гипоксии (1% O₂). Кроме этого, был проанализирован ответ клеток на действие цисплатина и направленного противоопухолевого токсина DARPIn-LoPE. Проведено сравнение ответа клеток на действие перечисленных факторов при их культивировании в коллагеновом гидрогеле и в монослойной культуре.

Предложенный подход, основанный на регистрации флуоресценции в реальном времени, показал хорошую согласованность с прямым подсчетом выделенных из гидрогеля клеток и измерением содержания ДНК в гелях. Преимуществом предложенного подхода является мониторинг роста культуры клеток в гидрогелях без их разрушения, что значительно снижает ресурсозатратность и трудоемкость исследования. Анализ влияния факторов микроокружения на 3D-модели с использованием флуоресцентной визуализации позволил оценить различия в чувствительности опухолевых клеток линий A431-GFP и SKOV3.ip-kat к сывороточной, глюкозной и кислородной депривациям. При этом культура A431-GFP показала высокую устойчивость к недостатку сыворотки, однако продемонстрировала сильную чувствительность к глюкозной и кислородной депривациям. Линия клеток SKOV3.ip-kat, напротив, оказалась высоко чувствительна к действию сывороточной депривации, при этом показала относительную нечувствительность к глюкозной и кислородной депривациям. С использованием предложенного подхода показано также, что культивирование в коллагеновом гидрогеле приводило к повышению устойчивости клеточных линий SKOV3.ip-kat и A431-GFP к цисплатину. В случае SKOV3.ip-kat повышение устойчивости произошло в 4 раза, в то время как в случае A431-GFP – более чем в 40 раз. Сравнительное исследование действия различных факторов на 2D- и 3D-моделях показало, что нахождение опухолевых клеток в коллагеновом геле также существенно модифицирует их чувствительность и может привести как к снижению, так и к увеличению устойчивости.

Таким образом, предложенный метод флуоресцентной визуализации может быть использован для мониторинга роста опухолевых клеток в коллагеновом гидрогеле в реальном времени, а также для регистрации ответа на неблагоприятные условия культивирования и действие противоопухолевых агентов. При этом данный метод позволяет значительно снизить стоимость исследований клеточной токсичности на 3D-моделях опухолевого роста.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-20168).

Комбинированные эффекты лучевой и фотодинамической терапии в отношении клеток эпидермоидной карциномы человека A431

Сороко С.С.^{1*}, Молодцова Д.С.¹, Скамницкий Д.В.², Сериев И.Р.¹, Балалаева И.В.¹, Воденев В.А.¹,
Шилягина Н.Ю.¹

¹ФГАОУ ВО "ННГУ им. Н. И. Лобачевского";

²ГБОУЗ НО «Нижний Новгород областной онкологический диспансер»;

kastarashan@gmail.com

Радиотерапия является одним из основных методов лечения онкологических заболеваний в современной врачебной практике и используется в качестве адъювантного, неoadъювантного или паллиативного средства в определенные моменты клинического течения болезни. При этом для терапии применяются различные варианты ионизирующих излучений, отличающихся природой излучения и/или подводимой мощностью дозы. Наиболее распространенным и классическим вариантом является лучевая терапия, однако, на сегодняшний день всё большую популярность набирают бета-эмиттеры, входящие в состав таргетных радионуклидных препаратов, и характеризующихся низкой мощностью дозы. В свою очередь, большинство исследований проведено с использованием методов лучевой терапии с гамма и рентгеновскими источниками, а знания о механизмах действия корпускулярного бета-излучения разной интенсивности, отрывочны. Другим острым вопросом клинической радиобиологии является необходимость снижения общей дозовой нагрузки на организм и повышения чувствительности опухолевых клеток к проводимой радиотерапии. Одним из подходов к увеличению радиочувствительности опухолевых клеток является использование комбинированной терапии, с целью достижения аддитивных или синергических эффектов.

В целом, понимание механизмов действия ионизирующих излучений различной природы и мощности дозы, а также разработка подходов, направленных на увеличение эффективности терапии, являются значимыми задачами радиобиологии.

В работе использовали клеточную культуру эпидермоидной карциномы человека A431, поскольку в отношении карцином в клинической практике широко применяется метод радиотерапии.

Облучение проводили в двух режимах воздействия: высокой и низкой мощности дозы. Облучением в режиме высокой мощности дозы моделировали применяемую в клинике дистанционную лучевую или

электронно-лучевую терапию и проводили с использованием линейного ускорителя Novalis Tx путем облучения клеток электронами или фотонами высоких энергий.

Облучением в режиме низкой мощности дозы моделировали контактную или радионуклидную терапию и в качестве источника использовали бета-эмиссионные закрытые препараты Sr-Y-90.

Облучение осуществляли в диапазонах от 4 до 80 Гр. Оценку жизнеспособности клеток после воздействия проводили методом МТТ-теста. Для анализа вклада цитотоксических и цитостатических эффектов проводили исследование механизмов клеточной гибели и анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии. Оценку проводили каждые 24 часа после облучения в течение трех циклов деления.

Мониторинг продукции активных форм кислорода в клетках после облучения осуществляли с использованием дихлордигидрофлуоресцеина диацетата H2DCF-DA, исследование проводили методом конфокальной лазерной сканирующей флуоресцентной микроскопии.

В качестве радиосенсибилизирующих агентов были выбраны фотосенсибилизаторы хлориновой и порфириновой природы. Для комбинированной терапии использовали концентрации фотосенсибилизаторов и дозы облучения не превышающие IC50 и LD50. Облучение ионизирующим излучением проводили после обработки фотосенсибилизатором. Выраженность комбинированных эффектов определяли с использованием коэффициента синергии.

Показано, что процент жизнеспособных клеток зависит от времени прошедшего после облучения, что говорит о наличии цитостатических эффектов. Так процент жизнеспособных клеток значительно ниже при оценке через 72 часа после облучения. Через 24 часа снижение жизнеспособности клеток не превышает 20%. Процент жизнеспособных клеток после облучения в дозе 5 Гр высокой мощности дозы составил 50%. При облучении низкой мощности дозы 50% жизнеспособных клеток наблюдали после облучения в дозе 18 Гр. Таким образом, в обоих вариантах воздействия имеют место отсроченные эффекты действия радиации.

Одним из основных механизмов действия радиации является образование активных форм кислорода (АФК). При исследовании динамики образования АФК в опухолевых клетках после облучения нами было зарегистрировано увеличение концентрации АФК в клетках в 4 раза после воздействия дозами, близкими к полулетальным для каждого из режимов воздействия.

Анализ механизмов цитостатического действия радиации показал увеличение количества клеток, претерпевающих арест или радиационный блок митозов в фазе G2/M после облучения высокой мощностью дозы. В случае бета-излучения низкой мощности дозы подобной закономерности выявлено не было. При этом через 72 часа после воздействия регистрировали дозозависимое увеличение числа мёртвых клеток. Через 24 и 48 часов после воздействия количество мёртвых клеток было заметно ниже, что может быть связано с тем, что клеточная гибель наступает в процессе одного из первых четырёх пострадиационных митозов.

При проведении комбинированной терапии ионизирующим излучением и фотосенсибилизаторами хлориновой и порфириновой природы наблюдали значительное уменьшение количества жизнеспособных клеток в сравнении с монотерапиями. Нами были зарегистрированы аддитивные и синергические эффекты при комбинации фотодинамической и радиотерапии.

Таким образом, мы предполагаем, что проведенный сравнительный анализ механизмов действия ионизирующих излучений разной природы и мощности дозы, а также присутствие аддитивных и синергических эффектов при комбинации радиотерапии с фотосенсибилизаторами потенциально открывают путь к разработке новых, усовершенствованных протоколов проведения радиотерапии онкологических заболеваний.

Работа выполнена при поддержке Центра передового опыта «Центр фотоники» Министерства науки и высшего образования РФ No 075-15-2022-293.

Коменат калия повышает устойчивость нейронов мозжечка крыс к эксайтотоксическому воздействию глутамата in vitro

Кравцов А.А.^{1,2,3*}, Козин С.В.^{1,2,3}

¹ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет;

²ФГБОУ ВО Кубанский государственный технологический университет;

³ФГБУН ФИЦ Южный научный центр РАН;

aakravtsov@mail.ru

Задача профилактики и терапии патологических состояний нервной системы, связанными с эксайтотоксическим и окислительным повреждением, будет оставаться актуальной в ближайшие десятилетия. Это обуславливает актуальность поиска эффективных средств фармакологической коррекции и предупреждения данных патологий. Целью настоящей работы являлось исследование нейропротекторной активности комената калия (КК) при эксайтотоксическом воздействии глутамата (Глу) в культурах нейронов мозжечка крыс.

Соединение коенат калия отличается тем, что входящие в его состав катион калия и анион коеновой кислоты сами по себе биологически активны. Основными функциями калия в организме являются: поддержание постоянства состава клеточной и межклеточной жидкости, кислотно-щелочного равновесия, обеспечение межклеточных контактов, биоэлектрической активности клеток, поддержание нервномышечной возбудимости [3]. Коеновая кислота (5-гидрокси-γ-пирон-2-карбоновая), имеет широкий спектр биологической активности: обладает антиоксидантным свойством, мягким седативным действием, антиабстинентным, анксиолитическим и антидепрессантным свойствами [4, 5]. Вышеназванные свойства катиона калия и аниона коеновой кислоты и послужили основанием для изучения нейропротекторных свойств КК.

В работе использован КК, синтезированный в отделе биологически активных веществ им. проф. А.Я. Шурыгина ФГБОУ ВПО «КубГУ» [1].

Культуры зернистых клеток мозжечка получали из мозга 7–9-дневных крысят линии Wistar методом ферментно-механической диссоциации как описано ранее [2]. Эксперименты проводили после 7 дней культивирования. Культуры обрабатывали 100 мкМ Глу в течение 10 минут. КК в концентрациях от 1 мМ до 0,001 мМ вносили в культуры после воздействия Глу. Через 4,5–5 часов культуры фиксировали ФУСом, окрашивали трипановым синим и учитывали число живых и погибших нейронов на микроскопе Invertoscopes ID 03.

Внутриклеточный уровень кальция оценивали с использованием Fluo4-AM на многофункциональном ридере FilterMax F5. Fluo4-AM вносили в культуры перед воздействием Глу на 30 минут. Регистрацию флуоресценции проводили при длине волны возбуждения 485 нм, эмиссии 535 нм. Результаты представлены в %, за 100% принят уровень флуоресценции контрольных культур, не подвергавшихся воздействию Глу и КК.

Антиокислительные свойства КК оценивали *in vitro*, в модельной системе ЦФЛ (цитратно-фосфатный буфер с люминолом). Образование активных форм кислорода (АФК) инициировали введением 35 мМ раствора сернокислого железа. Регистрацию хемилюминесценции осуществляли прибором SmartLum 5773 в течение 5 минут, оценивали светосумму. Влияние КК на генерацию АФК оценивали в сравнении с коеновой кислотой. Результаты рассчитывали в % от контроля, который принимали за 100%.

Для оценки достоверности различий выборок применяли t-критерий Стьюдента.

КК в отсутствие Глу независимо от концентрации не влиял на выживаемость нейронов. Воздействие Глу приводило к резкому снижению неповреждённых клеток до 29,6%. Внесение в культуры, обработанные Глу, КК приводило к повышению выживаемости при всех исследованных концентрациях ($p < 0,05$). Наиболее высокая выживаемость нейронов в сравнении с Глу (на 35,9% больше) отмечалась при концентрации 0,1 мМ – доля неповреждённых нейронов составила 65%.

В экспериментах с Fluo4-AM воздействие Глу привело к возрастанию уровня кальция в нейронах до $187,3 \pm 3,7\%$. Добавление КК в концентрациях 1,0, 0,1 и 0,01 мМ в культуры, подвергнутые воздействию глутамата, существенно снизило уровень кальция: до $158,3 \pm 9,6\%$, $162,3 \pm 7,2\%$ и $153,1 \pm 7,3\%$, соответственно. Воздействие КК на культуры, не подвергавшиеся действию глутамата, не оказало существенного влияния на уровень кальция в нейронах.

Результаты сравнительного исследования антиокислительных свойств КК и коеновой кислоты *in vitro* показали, что КК значительно снижает содержание свободных радикалов в модельной системе ЦФЛ. Уровень снижения свободных радикалов КК имеет дозозависимый эффект и практически не отличается от уровня гашения свободных радикалов коеновой кислотой: при 0,1 мг/мл – снижение на 65% и 69%, при 0,01 мг/мл – снижение на 34% и 33%, соответственно для КК и коеновой кислоты.

Таким образом, установлено, что применение КК на фоне глутаматной цитотоксичности способствует значительному снижению гибели нейронов мозжечка в культуре. Полагаем, что данный эффект опосредован антиоксидантной активностью КК, а также влиянием на ионный гомеостаз.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания ЮНЦ РАН № 122020100351-9.

Литература:

1. Антиоксидантное, стресс- и нейропротекторное фармакологическое средство-коенат калия Шурыгина Л.В., Злищева Э.И., Кравцов А.А. и др. Патент на изобретение RU 2514632 С1, 27.04.2014.
2. Козин С.В., Кравцов А.А., Елкина А.А. и др. Изотопное замещение дейтерия на протий в тканях головного мозга крыс изменяет его резистентность к гипоксии // Биофизика. 2019. Т. 64. № 2. С. 362-370.
3. Скальный А.В., Рудаков И.А. Биоэлементы в медицине. М. 2004. 272 с.
4. Шурыгин А.Я. Препарат бализ. Краснодар. 2002. 416 с.
5. Крылов Б.В., Щеголев Б.Ф. Патент РФ на изобретение № 2209062, МПК (7) А61К31/351, А61Р25/20.

Криопротективные эффекты дипептида карнозина при длительном криосохранении эксплантов мозга теплокровных негибернирующих животных

Мокрушин А.А.^{1*}

¹Институт физиологии им И.П. Павлова РАН;
mok@inbox.ru

Дипептид L-карнозин (β -аланил-L-гистидин), эндогенный дипептид, синтезируемый ферментом карнозинсинтаза 1 (CARNS1) из аминокислот, β -аланина (синтезируется в печени) и L-гистидина (получаемый из пищи). Содержание этого дипептида наиболее высокие (миллимолярный порядок концентраций) в сердечных и скелетных мышцах, а также в головном мозге млекопитающих особенно в обонятельной луковице и обонятельной коре (1–2 мМ).

Обнаружено что L-карнозин вызывает плеiotропные позитивные эффекты в организме. L-карнозин проявляет свойства антиоксиданта, нейтрализует активные формы кислорода, а также предотвращает перекисное окисление липидов, сохраняя структуру клеточных мембран. Дипептид препятствует процессу гликелирования, т.е. окисления белков глюкозой и связывает образующиеся при гликолизе протоны. Он выполняет роль внутриклеточного pH-буфера.

Продемонстрирован протективный потенциал L-карнозина. В условиях развития ишемического и геморрагического поражений мозговых структур дипептид проявил себя эффективным протектором нервных клеток. Положительные эффекты карнозина наблюдались при лечении нейродегенеративных заболеваниях (болезнь Альцгеймера, Паркинсона и др.).

Основываясь на представленных данных, что L-карнозин является мультипотентным протектором в структурах нервной системы, мы исследовали его криопротекторные свойства в процессе длительного криосохранения (КС). Для того чтобы проверить эту гипотезу, были изучены эффекты аппликации L-карнозина на экспериментальной модели – переживающие срезы обонятельной коры мозга крыс. Анализировали изменения активности NMDAR при регистрации NMDA-потенциалов, вызываемых электрической стимуляцией латерального обонятельного тракта. NMDAR являются наиболее уязвимыми механизмами при действии длительного КС.

Протокол КС срезов с L-карнозином проводился в следующей последовательности. Срезы в течение 20 мин перфузировали искусственной цереброспинальным раствором (ИЦР) (мМ: 124.0 NaCl; 5.0 KCl; 2.6 CaCl₂; 1.24 KH₂PO₄; 1.2 MgSO₄; 3.0 NaHCO₃; 10.0 глюкозы; pH 7.3) в проточной камере электрофизиологической установки и регистрировали амплитуды NMDA-потенциалов (мкВ). Полученные значения амплитуд NMDA-потенциалов рассматривали как контрольные перед замораживанием и принимали за 100%. Затем срезы перфузировали ИЦР с добавлением L-карнозина в концентрации 20 мМ в течение 20 мин и регистрировали NMDA-потенциалы. Далее срезы замораживали в растворе ИЦР с L-карнозином при медленной скорости (0.1°C/мин) до -10°C и хранили в морозильнике термостата. Через 30 сут КС срезы отогревали до 37°C с такой же скоростью (0.1°C/мин), при этом солевой состав среды и концентрация L-карнозина не менялись. Вновь регистрировали NMDA-потенциалы и выражали в % по отношению к значениям до КС.

В отдельной серии опытов изучали изменения pH ИЦР со срезом мозга до и после КС с L-карнозином с помощью pH-метра. В специальной серии опытов изучали влияние L-карнозина на гидратацию/дегидратацию срезов мозга, используя измерения их веса до и после КС.

Результаты проведенных исследований показали, что дипептид L-карнозин оптимизировал pH раствора до pH 7.4 после КС (-10°C, 30 сут) и сохранял активность NMDAR, определяемых по амплитуде NMDA-потенциалов. Отметим, что без использования L-карнозина pH среды со срезами после КС сильно закислялся до pH 6.5 вместо нормальных значений pH 7.2-7.7. В этих условиях активность NMDAR необратимо блокировалась. Эти данные свидетельствуют, что L-карнозин является «ловушкой» протонов и таким образом действует как криопротектор.

Процесс дегидратации/гидратации нервных клеток и межклеточного пространства имеет существенное значение в сохранении жизнеспособности структур нервной ткани в процессе КС. L-карнозин после КС вызывал уменьшение свободной воды в срезах. Такой эффект дипептида способствовал сохранению активности NMDAR после КС равной до КС. Полагаем, что L-карнозин способствует переходу свободной воды из нервных клеток в межклеточное пространство и таким образом становится нуклеатором льда, предохраняя клетки от разрушения в процессе замораживания/КС/отогревания. Следовательно, экзогенный L-карнозин проявляет свойства криопротектора.

Регистрация активности NMDAR, определяемых по амплитуде NMDA-потенциалов, в процессе отогревания после КС показала, что L-карнозин двукратно снижал уровень гипервозбудимости этих рецепторов. Этот факт указывает, что дипептид ингибирует развитие глутаматной эксайтотоксичности, развивающейся при отогревании срезов после КС и способствует сохранению нормального функционирования NMDA механизмов как наиболее уязвимых механизмов к замораживанию/отогреванию.

Таким образом, полученные результаты доказывают, что дипептид L-карнозин проявляет свойства эндогенного (нетоксичного) криопротектора в эксплантах мозга теплокровных негибернирующих животных.

Лигнинный препарат как потенциальное противолучевое средство

Раскоша О.В.^{1*}, Ермакова А.В.¹, Башлыкова Л.А.¹, Старобор Н.Н.¹, Боднарь И.С.¹, Карманов А.П.¹, Кочева Л.С.²

¹Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук;

²Институт геологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук;
raskosha@ib.komisc.ru

Поиски путей модификации радиочувствительности органов и тканей является важнейшей фундаментальной задачей, как с позиции снижения последствий воздействия ионизирующих излучений на организм, так и с позиции повышения эффективности радиотерапии опухолей. Лигнины – уникальные биополимеры растительного происхождения, структурная организация которых мультивариантна и в значительной степени зависит от биологического вида растения. Целью данной работы явилось изучение радиозащитных свойств природного лигнина, полученного из стеблей овса, на мелких млекопитающих. Эксперименты проводили на половозрелых самцах мышей линии СВА, содержащихся в УНУ «Научная коллекция экспериментальных животных Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (<http://www.ckrf.ru/usu/471933/>) с учетом санитарно-гигиенических и биоэтических аспектов. Мышей облучали на гамма-установке (Исследователь «Россия») в дозе 6 Гр (137Cs, 0,75 Гр/мин). Для тестирования использовали водорастворимую форму препарата органосольвентного лигнина Пеппера, выделенного из стеблей овса *Avena sativa*. Растительный полимер животные получали перорально в течении 8 суток в кумулятивной дозе 150 мг/кг массы тела. Для изучения противолучевых свойств тестируемого препарата животных поили лигнином 8 суток до (профилактический режим) или после (терапевтический режим) острого гамма-облучения. По окончании эксперимента мышей декапитировали и сразу брали материал для молекулярно-клеточного анализа (нейтральная версия метода ДНК-комет и микроядерный тест) органов и тканей с разной пролиферативной активностью, анализа клеточного состава периферической крови и определения содержания малонового диальдегида в эритроцитах.

Полученные результаты свидетельствуют о проявлении противолучевых свойств природного лигнина, что выражалось в статистически значимом снижении двунитевых разрывов ДНК и уровня микроядер в клетках костного мозга, а также в уменьшении содержания малонового диальдегида в эритроцитах периферической крови мышей при обоих режимах введения лигнинного препарата. В пользу радиозащитных свойств природного лигнина свидетельствуют и результаты микроядерного теста, проведенного на клетках щитовидной железы, а также данные, полученные при анализе периферической крови, в частности, отмечена нормализация концентрации гемоглобина при терапевтическом приеме тестируемого препарата и размеров эритроцитов при обоих режимах введения лигнина. Употребление животными лигнина до облучения вызывало выраженную тенденцию к снижению уровня аномальных головок эпидидимальных сперматозоидов и статистически значимое уменьшение дефектов их хвостовой части по сравнению с облученными животными. Таким образом, способность лигнинного препарата, полученного из стеблей овса, модифицировать радиационные эффекты делает его перспективным для дальнейшего изучения в качестве противолучевого средства.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 22-13-00196, <https://rscf.ru/project/22-13-00196/>.

Липидные детерминанты в регуляции порообразующей активности антимикробных липопептидов

Захарова А.А.^{1*}, Ефимова С.С.¹, Остроумова О.С.¹

¹ИИЦ РАН;
zaza2187@bk.ru

Циклические липопептиды (ЦЛП) представляют собой микробные поверхностно-активные соединения, продуцируемые широким спектром микроорганизмов. Считается, что в некоторых случаях антимикробная активность ЦЛП связана с нарушением целостности мембран клеток-мишеней вследствие формирования ион-

проводящих пор или мицелл. Ввиду распространяющейся резистентности патогенных микроорганизмов к используемым в клинической практике антибиотикам, ЦПП выступают наиболее перспективным классом новых антимикробных агентов. В этой связи актуальной задачей фармакохимии является установление липидных детерминант регуляции порообразующей активности этих соединений. В качестве модели использовали плоские липидные бислои, сформированные по методу Монтала и Мюллера.

В ходе исследований было установлено, что уменьшение электрического потенциала внутри мембраны приводит к росту числа каналов, сформированных липопептидом *Pseudomonas syringae* сирингомицином E (СМЕ). В то же время, рост латерального давления в бислое вызывает противоположный эффект. В свою очередь, местные анестетики способны стерически блокировать СМЕ-канал.

Показано, что обязательным условием возникновения пор, образуемых фенгицином, выделенным из *Bacillus subtilis*, является присутствие отрицательно заряженных липидов в составе мембраны. Введение в систему модификаторов, обладающих разобщающим действием на мембранные липиды, приводит к росту порообразующей активности этого липопептида.

Обнаружено, что липопептид *Bacillus polymyxa* полимиксин Б (ПМБ) преимущественно взаимодействует с отрицательно заряженными липидами мембран. Присутствие липидов, индуцирующих отрицательную спонтанную кривизну липидных монослоев, вызывает, в свою очередь, снижение порообразующей активности ПМБ. Обнаружена высокая кооперативность связывания ПМБ с липидными бислоями, содержащими Кдо2-липид А. Ингибирование активности липопептида в присутствии дегликозилированного аналога липида А может свидетельствовать о значительной роли сахарных остатков липополисахаридов наружной мембраны грамотрицательных бактерий в олигомеризации ПМБ.

Таким образом, показана возможность регуляции порообразующей активности ЦПП за счёт изменений эластических и электрических свойств мембраны. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 22-15-00417.

Локальное действие комбинации нагрева и освещения вызывает распространение гиперполяризационных электрических сигналов и влияет на физиологические процессы у пшеницы

Попова А.Ю.^{1*}, Юдина Л.М.¹, Золин Ю.А.¹, Сухова Е.М.¹, Гребнева К.В.¹, Абашева К.Р.¹, Сухов В.С.¹

¹*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И.*

Лобачевского;

SilverKumiho@mail.ru

Локальное воздействие стрессоров на растения вызывает генерацию электрических сигналов, которые обеспечивают их адаптацию к неблагоприятным условиям, влияют на фотосинтез и изменяют продуктивность. У высших растений есть три основных типа электрических сигналов. Потенциал действия – кратковременный импульсный электрический сигнал деполяризационного типа, генерирующийся в ответ на неповреждающие воздействия (охлаждение, освещение). Варибельный потенциал – длительный электрический сигнал деполяризационного типа, который генерируется в ответ на повреждающие воздействия (ожог, нагрев до высоких температур, раздавливание). Системный потенциал – электрический гиперполяризационный сигнал, который возникает в ответ на действие различных стрессоров, в том числе тех, которые вызывают генерацию варибельного потенциала. В связи с тем, что в естественных условиях воздействие стрессоров повреждающего характера на растения встречается довольно редко, становится актуальным вопрос: генерируются ли электрические сигналы при действии умеренных стрессоров (например яркий свет, умеренный нагрев) или их комбинаций. Целью данной работы стал анализ возможности генерации электрических сигналов при действии комбинации умеренных неповреждающих стрессоров – локального освещения и нагрева, и исследование параметров электрических сигналов в условиях полива, умеренной и сильной почвенной засухи.

В исследовании использовались 14-и дневные проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Дарья». Растения выращивались в горшках с универсальной почвой, в вегетационной комнате при 24°C и 16-часовом световом дне. Для создания водного дефицита растения делили на две группы: с поливом каждые два дня (контроль) и без полива (засуха). Для измерения поверхностных электрических потенциалов использовались внеклеточные Ag⁺/AgCl электроды, усилитель и персональный компьютер (сдвиг потенциала в более положительную сторону соответствует гиперполяризации, а в более отрицательную сторону – деполяризации). Измерительные электроды располагались на разных расстояниях от зоны воздействия света и нагрева, электрод сравнения располагался у основания побега растения на границе с землёй. Для индукции электрических сигналов производили одновременное воздействие на лист растения света (540 мкмоль м⁻²с⁻¹, синий свет) в течение 10 минут и нагревания (до конечной температуры 40°C при помощи элемента Пельтье) в течение 30

минут. Измерения фотосинтетических параметров осуществляли с использованием Open FluorCam FC 800-O/1010, расчет индекса проводимости устьиц осуществляли на основании тепловизионных измерений с использованием тепловизора testo 885-2.

В ходе исследования электрических сигналов было показано, что при комбинированном действии стрессоров вблизи стимулированной зоны возникала деполяризация, сменяющаяся гиперполяризацией по мере удаления от этой зоны. В условиях воздействия на растения только светом наблюдался слабый гиперполяризационный сигнал, напротив, сигнал, вызванный только умеренным нагревом, был близок к сигналам, индуцированным комбинацией освещения и нагрева. Было предположено, что комбинация стрессоров вызывает сигнал деполяризации, который распространяясь по растению, вызывает гиперполяризацию. Эти сигналы, были идентифицированы как системный потенциал.

При умеренной почвенной засухе было показано, что форма сигнала гиперполяризации была аналогична форме такого сигнала в контрольных условиях, значительное изменение амплитуды сигнала отсутствовало при умеренной засухе. Сигналы, генерирующиеся по типу деполяризации выявлены не были. Сильная почвенная засуха приводила к изменению формы и уменьшению амплитуды электрических сигналов. Сигналы по типу деполяризации также не были выявлены. Таким образом, умеренная почвенная засуха существенно не влияла на генерацию сигнала гиперполяризации, вызванного комбинацией света и нагрева, сильная почвенная засуха подавляла такие сигналы.

На следующем этапе исследования оценивалось влияние выявленных сигналов на фотосинтез и транспирацию. Комбинация стрессоров и распространяющиеся сигналы приводили к снижению квантового выхода фотосистемы II ($Y(PSII)$) и к увеличению нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (NPQ) у пшеницы. На больших расстояниях от места воздействия ответы фотосинтеза не наблюдались. Комбинированное воздействие света и нагрева приводило к снижению устьичной проводимости (I_g), при этом эффект уменьшался с увеличением расстояния до зоны воздействия. Исследование ответов фотосинтеза и транспирации в условиях одиночного воздействия освещением показало, что существенных изменений $Y(PSII)$, NPQ и I_g не было. Однако, одиночное действие нагрева вызывало снижение $Y(PSII)$ и возрастание NPQ. Эти изменения были сходны по форме и амплитуде с ответами фотосинтеза, возникающими при комбинированном действии стрессоров. Таким образом, полученные результаты подтверждают участие выявленных электрических сигналов в формировании фотосинтетических ответов растения, поскольку локальное освещение, вызывает лишь электрические сигналы с низкой амплитудой, что не приводит к возникновению фотосинтетических ответов. Наоборот, локальный нагрев или комбинация стрессоров, которые вызывают более выраженные электрические ответы, влияют на фотосинтез.

Генерация системных потенциалов при воздействии умеренного нагрева и освещения демонстрирует, что распространение электрических сигналов по растению может быть вызвано стрессорами, широко распространенными в окружающей среде и такие потенциалы могут играть важную роль в возникновении адаптивного ответа у высших растений. Такая гипотеза требует дальнейшего изучения, поскольку влияние гиперполяризационных сигналов на физиологические процессы недостаточно изучено.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-74-10088.

Медленные флуктуации магнитного поля и циркадные биологические ритмы

Крылов В.В.^{1*}
¹ИБВВ РАН;
kryloff@ibiw.ru

Влияние геомагнитной активности на биологические объекты показано в корреляционных исследованиях. Однако в естественных условиях крайне затруднительно выделить отдельные составляющие сложного сигнала геомагнитной бури и связать их с биологическими показателями в достаточно объемной для статистического анализа выборке. Применение экспериментальных подходов впервые позволило выделить отдельные временные промежутки и частотные составляющие сложного естественного сигнала геомагнитной бури и исследовать влияние этих факторов на гидробионтов.

Для всесторонней оценки влияния имитации геомагнитных бурь на гидробионтов были использованы представители разных экологических и таксономических групп, показавшие ранее свою чувствительность к магнитным воздействиям. В опытах имитировали типичную сильную геомагнитную бурю, записанную вблизи места проведения экспериментов. В качестве контрольных условий использовали немодифицированное невозмущенное геомагнитное поле (51.7 мкТл, наклонение 75.05°). Воспроизведение геомагнитных возмущений осуществляли при помощи специально разработанной экспериментальной установки (патент RU 108640 U1).

В серии экспериментов с разными видами гидробионтов значимые отличия от контроля наблюдали, в основном, после экспозиции гидробионтов в тех геомагнитных флуктуациях, которые соответствовали главной фазе и начальным этапам фазы восстановления бури. Для исследования частотных составляющих геомагнитной бури был использован широкополосный сигнал, соответствующий главной фазе, а также две его составляющие: в диапазоне 0-0.001 Гц и 0.001-5 Гц. Результаты указали на то, что в составе исследованного сигнала геомагнитной бури наибольшей биологической эффективностью обладали медленные флуктуации в диапазоне 0-0.001 Гц, соответствующие главной фазе и начальным этапам фазы восстановления. Т.е. биологически эффективными в наших экспериментах были медленные флуктуации в том же диапазоне, в котором происходит регистрация суточной геомагнитной вариации.

По мнению некоторых исследователей, суточная геомагнитная вариация может выступать в роли внешнего водителя для циркадных биологических ритмов. Геомагнитные бури в таком случае могут восприниматься гидробионтами как один из пиков суточной вариации геомагнитного поля в ряду регулярных суточных флуктуаций, который не согласуется с естественным циклом освещенности – другим синхронизатором циркадных биологических ритмов. Можно предположить, что десинхронизация биологических процессов, модулируемых разными экзогенными водителями ритма, является основой влияния геомагнитных бурь на гидробионтов.

В соответствии с этим предположением, эффекты, подобные влиянию геомагнитных бурь, должны проявляться при смещении суточной геомагнитной вариации относительно смены дня и ночи. Кроме этого, эффекты геомагнитных бурь должны зависеть от того, на какое время суток приходится главная фаза и начальные этапы фазы восстановления бури. Эксперименты со смещением суточной геомагнитной вариации на 6 и 12 часов относительно смены дня и ночи (ночные геомагнитные события происходили утром или днём), а также с воспроизведением имитации главной фазы геомагнитной бури в разное время суток подтвердили эту гипотезу.

Закономерным продолжением этого направления исследований стало изучение увлечения биологических циркадных ритмов медленными магнитными флуктуациями при отсутствии первичного водителя – цикла свет-темнота. В экспериментах с данио рерио при постоянном освещении ритмы двигательной активности рыб следовали за медленными изменениями индукции внешнего магнитного поля, приводя к смещению периода относительно исходного ритма. Однако при анализе околосуточных ритмов предпочтения разных горизонтов в вертикальном столбе воды для этих рыб не удалось получить такую же четкую картину. В настоящее время эксперименты продолжаются на слепых пещерных рыбах *Astyanax mexicanus*, которые, предположительно, могут обладать большей магниточувствительностью.

Обсуждается роль белков криптохромов в процессах, отвечающих за восприятие медленных магнитных флуктуаций и модуляцию биологических циркадных ритмов.

Механизм действия низкочастотного электромагнитного поля на водные растворы биополимеров

Текуцкая Е.Е.^{1*}, Барышев М.Г.², Ильченко Г.П.¹

¹ФГБОУ ВО "Кубанский государственный университет";

²Кубанский государственный технологический университет;

tekytska@mail.ru

Разработан физико-химический механизм воздействия низкочастотного электромагнитного поля (НЧ ЭМП), имеющего крайне низкую энергию, на водные растворы биополимеров на основе нуклеиновых кислот и белков, связанный с изменением количества наиболее долгоживущей формы - перекиси водорода в химическом осцилляторе взаимопревращений АФК [1].

Начальной стадией цикла является инициация процесса – присоединение электрона e- с ридберовски возбужденных уровней макромолекул (например, ДНК) [2] к свободным протонам воды с образованием радикала водорода и последующего образования гидроперекисного радикала, синглетного кислорода, супероксид-иона, перекиси водорода.

Из полученного кинетического уравнения следует, что в разбавленных растворах биополимеров скорость накопления перекиси водорода зависит от рН раствора, концентрации электронов e-Rg с ридберовски возбужденных уровней макромолекул и концентрации растворенного кислорода. Периодическое накопление и разложение перекиси водорода и определяют периодичность всего цикла взаимопревращений в химическом осцилляторе АФК.

Если считать потери в химическом осцилляторе малыми и частота вынуждающей силы незначительно отличается от собственной частоты взаимопревращений перекиси водорода в химическом осцилляторе, то после

соответствующих допущений и преобразований получаем решение исходного уравнения, в котором начальная фаза, которая при сделанных допущениях одинакова как для затухающих, так и для незатухающих колебаний, показатель затухания колебаний концентраций перекиси водорода в химическом осцилляторе и отношение частоты вынуждающей силы к собственной частоте системы. Из анализа выражения (1) следует, что результирующее колебание содержания перекиси водорода является суммой двух колебаний, имеющих разные частоты, причем численное соотношение между частотами колебаний в системе химического осциллятора и внешнего поля в целом определяет характер переходного процесса.

Экспериментально установлено, что в основе окислительных повреждений ДНК и конформационных переходов белков лежит универсальный механизм, обусловленный образованием АФК в водных растворах под действием низкоинтенсивного ЭМП, при этом количественное содержание перекиси водорода резонансоподобно зависит от частоты воздействующего ЭМП [2].

В рамках разработанной модели возможно накопление окислительных сайтов ДНК, обусловленное образованием АФК под действием НЧ ЭМП. Количественное содержание 8-OHdG в ДНК также резонансоподобно зависит от частоты воздействующего ЭМП и усиливает уже имеющийся окислительный стресс у больных генетически обусловленным заболеванием. Конформационные изменения белков сопровождаются увеличением доступности и активности нуклеофильных центров, являющихся потенциальными мишенями для АФК, полное разворачивание и денатурация аминокислотной цепи белка под действием НЧ ЭМП не происходит. Образующиеся в ходе резонансного взаимодействия повышенные количества АФК атакуют нуклеофильные центры белков и молекулы ДНК, повреждая их. Но если воздействие НЧ ЭМП, опосредованное генерацией АФК в водной среде, на ДНК носит в основном повреждающий характер: либо окислительный, либо структурный, то белки под действием НЧ ЭМП претерпевают в основном конформационные изменения. При этом могут происходить окислительно-восстановительные модификации сульфгидрильных и гидроксильных групп белков. Являясь регуляторными для сохранности структуры белков эти группы предотвращают дальнейшую денатурацию белка. Одновременно с этим изменяется конформация аминокислотных спиралей. Деформация белков и молекул ДНК под действием НЧ ЭМП может приводить к появлению резонансных частот, зависящих от частоты и амплитуды НЧ ЭМП.

1. Гудков С.В., Карп О.Э., Гармаш С.А. и др. Образование активных форм кислорода в воде под воздействием видимого и инфракрасного излучения в полосах поглощения молекулярного кислорода // Биофизика. – 2012. – Т. 57, № 1. – С.5–13.

2. Авакян С.В., Баранова Л.А. Влияние электромагнитного излучения окружающей среды на ассоциатообразование в водных растворах // Биофизика. – 2019. – Т. 64, вып. 1. – С. 12-20.

3. Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Гусарук Л.Р., Ильченко Г.П. Окислительные повреждения ДНК при действии переменного магнитного поля // Биофизика, 2020. Т.65, №.4, С.664-669 DOI: 10.31857/S0006302920040055

Механизмы УФ-индуцированной клеточной гибели лимфоцитов человека

Наквасина М.А.^{1,2*}, Артюхов В.Г.^{1,2}, Радченко М.С.^{1,2}

¹Воронежский государственный университет;

²Воронежский государственный университет;

nakvasina_ma@mail.ru

Одной из ключевых проблем биофизики клетки является выявление закономерностей клеточной гибели как фундаментального общебиологического явления. Изучение механизмов гибели клеток, выявление маркеров (показателей) ее типов, поиск способов их регулирования – ключ к пониманию закономерностей процессов морфо- и эмбриогенеза, поддержания клеточного гомеостаза, биологического действия физико-химических агентов, патогенеза различных заболеваний человека и разработке эффективных методов их лечения.

Исследованы механизмы и последовательность развития и реализации этапов программированной клеточной гибели лимфоцитов периферической крови доноров в условиях воздействия УФ-света (240–390 нм) в дозах 151, 1510 и 3020 Дж/м².

Обнаружено повышение по отношению к контролю уровня экспрессии мембранных рецепторов апоптотических сигналов CD95 лимфоцитов, суспендированных в питательной среде RPMI-1640 и растворе Хенкса, в течение 1-5 ч после УФ-облучения клеток в использованных дозах. Увеличение экспрессии Fas-рецепторов лимфоцитов, модифицированных воздействием УФ-света, в растворе Хенкса связано не только с демаскированием ранее недоступных (скрытых) молекул CD95, но и с синтезом их новых молекул через 4 и 5 ч после облучения иммуноцитов.

Выявлено повышение по сравнению с контролем уровня функциональной активности иницирующих каспаз-8 и -12 соответственно через 3 ч после УФ-облучения лимфоцитов в дозе 1510 Дж/м² и сразу после их

фотомодификации. Полученные данные указывают на возможность участия этих каспаз в осуществлении рецепторного каспазного пути (каспаза-8) и сигнальных путей, связанных с нарушением кальциевого гомеостаза и изменением уровня вторичных мессенджеров — Ca^{2+} и цАМФ (каспаза-12).

Обнаружено повышение уровня функциональной активности эффекторной каспазы-3 лимфоцитов человека по отношению к таковому для интактных образцов через 8 и 24 ч и 6 и 8 ч соответственно после облучения клеток в дозах 151 и 1510 Дж/м². УФ-модификация лимфоцитов в дозе 3020 Дж/м² индуцирует инактивацию каспазы-3.

Установлено, что после 20 ч инкубации лимфоцитов, УФ-облученных в дозах 151, 1510, 3020 Дж/м², происходит фрагментация ДНК, на что указывает совокупность полос («апоптотическая лестница») на электрофореграмме, соответствующая фрагментам ДНК меньшего размера по сравнению с контролем.

Повреждения ДНК (однонитевые разрывы) обнаруживаются сразу после УФ-облучения лимфоцитов в дозах 1510 и 3020 Дж/м² (ДНК-кометы типа С1) и достигают максимума через 6 ч после модификации клеток (кометы типов С2 и С3). Вероятно, накопление однонитевых разрывов ДНК приводит в итоге к формированию двунитевых разрывов. Двунитевые разрывы ДНК являются сигналом к запуску апоптоза, осуществляющегося с участием транскрипционного фактора p53, проапоптотического белка Вах и других митохондриальных факторов апоптоза. Изменения структурного состояния митохондриальных мембран были выявлены после воздействия на лимфоциты УФ-света в дозах 151 и 1510 Дж/м².

Через 20 ч после облучения лимфоцитов в дозе 151 Дж/м² обнаружены фрагменты ДНК с размерами 6000 п.н. и менее 1500 п.н. Использование метода ДНК-комет в этих условиях позволило выявить кометы класса С2, характерные для предапоптотических клеток (фрагменты ДНК ≤ 50 т.п.н.).

Через 20 ч после воздействия на лимфоциты УФ-света в дозе 1510 Дж/м² зарегистрировано образование фрагментов ДНК менее 1500 п.н. и ДНК-комет С3-класса, что указывает на межнуклеосомную фрагментацию ДНК, характерную для погибающих клеток.

Через 20 ч после воздействия на лимфоциты УФ-света в дозе 3020 Дж/м² обнаружены фрагменты ДНК размером примерно 5000 п.н. и менее 1500 п.н., кометы С3- и С4-классов. В этих же условиях наблюдалась инактивация каспазы-3. По-видимому, эти результаты указывают на возможность реализации p53-зависимого пути апоптоза, сопровождающегося выходом из митохондрий АИФ (фактора, индуцирующего апоптоз), и индукцией каспазонезависимого пути программированной клеточной смерти.

Предположение о возможности участия p53 в осуществлении апоптоза лимфоцитов было подтверждено после обнаружения (по сравнению с интактными иммунocyтaми) более высокого уровня этого белка через 6 ч после облучения клеток в дозах 1510 и 3020 Дж/м².

В пользу представлений о запуске митохондриального механизма апоптоза свидетельствуют данные по определению уровня активных форм кислорода в УФ-облученных лимфоцитах. Выявлено, что УФ-облучение иммунocyтa и последующая инкубация в течение 1 и 2 ч индуцировали повышение внутриклеточного уровня активных форм кислорода по сравнению с контрольными образцами.

На основании результатов определения уровня цитохрома с в цитозоле лимфоцитов через 1,5 и 4 ч после УФ-облучения клеток предполагается возможность участия цитохрома с в осуществлении программированной клеточной смерти лимфоцитов человека, индуцированной воздействием УФ-света в минимальной из использованных доз (151 Дж/м²).

В ходе проведения проточно-цитометрического анализа лимфоцитов после их УФ-облучения в дозе 1510 Дж/м² выявлены временные характеристики реализации апоптотической гибели клеток. Время – 2-4 ч после фотомодификации клеток, достаточно для осуществления основных событий программированной клеточной смерти, сопровождающихся транслокацией фосфатидилсерина во внешний монослой плазматической мембраны лимфоцитов (большая часть клеток в суспензии находится на ранней стадии апоптоза).

Следовательно, гибель лимфоцитов крови человека, индуцированная воздействием УФ-света, реализуется с участием рецепторного, ядерного (p53-зависимого пути) и митохондриального механизмов апоптоза.

Микроносители на полимерной основе, содержащие селен и золото, для комбинированной фототермической терапии, опосредованной АФК

Митусова К.А.^{1*}, Рогова А.^{1,2,3}, Тимин А.С.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ);

²Национальный исследовательский университет ИТМО;

³Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет;
mitusova.kseniya@mail.ru

В последнее время мультимодальная комбинированная фототермическая терапия (ФТТ) с использованием фотоактивных материалов привлекла значительное внимание к лечению рака. Однако носители лекарств, обеспечивающие эффективный нагрев в месте опухоли, еще предстоит разработать: это фундаментальное требование для широкого внедрения ФТТ в клиниках. В этой работе мы проектируем и разрабатываем гибридные носители на основе многослойных капсул, интегрированных с наночастицами селена (НЧ Se) и золотыми наностержнями (НС Au), для реализации комбинированной ФТТ, опосредованной активными формами кислорода (АФК).

Методом послойного нанесения слоев были синтезированы полимерные капсулы, в ядре которых находились НС Au и НЧ Se. Для этого, были синтезированы НЧ Se диаметром 30 ± 5 нм, диспергированные в воде и НС Au со средней длиной $114,8 \pm 13,9$ нм и шириной $20,3 \pm 2,0$ нм. НЧ Se были стабилизированы сульфонатом полистирола (PSS), придающим отрицательный дзета-потенциал, $\zeta = -42,5$ мВ, а НС Au стабилизировали СТАВ в качестве поверхностно-активного вещества, обеспечивая положительный дзета-потенциал в водном растворе $\zeta = +21,2$ мВ.

Мы исследовали фототермические характеристики полимерных капсул со встроенными в ядро НЧ Se и НС Au, диспергированных в воде при облучении лазером с длиной волны 1064 нм, используя инфракрасную тепловизионную камеру. Основываясь на полученных данных, эффективность фототермического преобразования составила 36,15%. Таким образом, комбинация НЧ Se и НС Au внутри полимерных капсул повышает эффективность фототермического преобразования.

Чтобы изучить противоопухолевую активность полученных полимерных капсул *in vitro*, мы варьировали количество НЧ внутри полимерных капсул: НЧ Se (5, 20, 50 и 100 мкг) и НС Au (5, 10, 50 и 60 мкг). Для оценки цитотоксичности и фототермического эффекта всех протестированных образцов мы использовали три метода: кальцеин АМ/ пропиций йодид, анализ на резазурин и проточную цитометрию с детекцией 7-AAD. Для всех трех методов клетки меланомы (B16-F10) инкубировали с капсулами в соотношении 1:10 в течение 12 ч. Затем несколько образцов облучали лазером с длиной волны 1064 нм ($2,4$ Вт/см²) в течение 5 мин. Параллельно контрольные образцы не облучались лазером. После 24 ч инкубации к образцам добавляли кальцеин АМ и пропиций йодид для выявления живых и мертвых клеток. Изображения КЛСМ показали, что НЧ Se, иммобилизованные в полимерных капсулах, индуцировали гибель клеток в зависимости от концентрации НЧ Se и проявляли сходные противоопухолевые свойства как при лазерном облучении, так и без него. Из литературных данных НЧ Se могут индуцировать апоптоз в раковых клетках за счет образования АФК. Чтобы подтвердить это, мы измерили активность АФК в клетках B16-F10, инкубированных с НЧ Se (5, 20, 50 и 100 мкг), используя H2DCFDA (2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат). H2DCFDA проникает в клетки, и в присутствии АФК он окисляется до дихлорфлуоресцеина: таким образом, можно обнаружить внутриклеточное образование гидроксила, пероксила и других форм АФК. [10.1038/Nprot200823]. Действительно, инкубация клеток с НЧ Se в ядре полимерных капсул приводила к увеличению интенсивности клеточной флуоресценции, т.е. уровня АФК, дозозависимым образом, а контрольные клетки без НЧ Se не проявляли выраженной флуоресценции. Кроме того, для образцов, обработанных лазером, НС Au проявляли незначительную токсичность для клеток B16-F10 в широком диапазоне концентраций. Однако при лазерном облучении НС Au продемонстрировали противоопухолевые способности благодаря фототермическому эффекту. Также, комбинация НЧ Se и НС Au в одной капсуле вызывала более выраженный противоопухолевый эффект, что подтверждают данные анализа на резазурин и проточной цитометрии-процент жизнеспособности клеток меланомы был менее 10% при воздействии лазерного излучения.

Для изучения противоопухолевой эффективности разработанных капсул с НЧ Se и НС Au использовали мышей-носителей опухоли B16-F10 (размер опухоли составлял около 100 мм³ или 0,1 см³). После внутриопухолевой инъекции тестируемых капсул (50 мкл со 100 мкг Se и 60 мкг Au) опухоли облучали лазером с длиной волны 1064 нм в течение 5 мин на животное. Изменения средних объемов опухоли оценивали каждые 3-4 дня. Анализируя полученные экспериментальные данные, мы можем заключить, что комбинированный эффект от НЧ Se и НС Au заключенных в ядро капсул и подверженных лазерному облучению (1064 нм), был намного выше по сравнению с капсулами, содержащими только один из видов НЧ (НС Au или НЧ Se). Эта комбинация приводит к повышению противоопухолевой эффективности против меланомы B16-F10, что можно объяснить двумя различными механизмами действия на раковые клетки во время такой комбинированной

терапии. Во-первых, НЧ Se в полимерных капсулах индуцируют внутриклеточную генерацию АФК, что приводит к апоптозу опухолевых клеток. Во-вторых, НС Au запускают фототермический эффект, который подавляет опухоль. Кроме того, НЧ Se усиливают нагрев НС Au, что позволяет говорить о том, что наш комбинированный метод лечения позволяет достичь синергической терапевтической эффективности.

Таким образом, в данной работе мы доказали, что комбинация НЧ Se и НС Au в ядре полимерных капсул позволяет нам получить гибридные носители с многообещающими АФК-опосредованными и фототермическими свойствами для усиленной комбинированной ФТТ против роста опухоли меланомы. Этот метод обладает высокой терапевтической эффективностью против опухолей меланомы B16-F10 без каких-либо существенных побочных эффектов на здоровые органы (сердце, легкие, почки, печень и селезенку). Это исследование расширяет область применения комплекса Se/Au в качестве высокоэффективного фототермического агента для разработки и синтеза многофункциональных платформ доставки лекарств (т.е. полимерных многослойных капсул) и их дальнейшего использования в комбинированной АФК-опосредованной и фототермической терапии злокачественных новообразований.

Работа была выполнена при поддержке государственного задания (FSEG-2022-0012).

Модификация биотехнологии аквакультуры рыб с помощью модификации окислительно-восстановительного потенциала воды. Биофизические аспекты

Коржов А.Н.^{1*}, Лоза С.А.¹, Коржова М.А.²

¹ФГБОУ ВО "Кубанский государственный университет";

²ФГБОУ ВО "Кубанский государственный технологический университет" (КубГТУ);

shtrih_ooo@mail.ru

Вода – самое распространенное вещество на планете Земля, около 71 % поверхности земного шара покрыто водой. Она является важнейшим веществом для всех живых существ на Земле. Её основная роль в возникновении и поддержании жизни на Земле, в глобальном кругообороте веществ и энергии, в химическом строении живых организмов, в формировании климата и погоды. В среднем в организме растений и животных содержится более 50 % воды. С каждым годом проблема нехватки водных ресурсов становится все острее. Для успешного применения в хозяйственной деятельности нужно изменять её физико-химические свойства, применять различные способы модификации и очистки. Мембранные методы и технологии успешно решают эту задачу. В статье [1] описан метод коррекции и регулирования pH воды с помощью биполярного электродиализа для нужд теплоэнергетики. Работа [2] посвящена исследованию технологии безреагентной электромембранной декарбонизации природной воды. Также с помощью электромембранной технологии возможно провести коррекцию окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) водных растворов.

Биологическая обратная связь с модификациями окислительно-восстановительного потенциала воды описана в работе [3]. Нами описаны исследования влияния воды с высоким отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом на аквакультуру. Биологическая обратная связь, оказываемая водой на физиологию живых систем, совершенно недостаточно изучена. Тонкое регулирование и незаметные изменения физиологических процессов, происходящих в водных растворах, подвергавшихся различным физико-химическим воздействиям требуют проведения комплексного изучения.

Нашим коллективом были проведены исследования влияния воды с высоким отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом (ОВП) на молодь африканского клариевого сома (*Clarias gariepinus*). Установлено, что снижение ОВП воды от +150..250 мВ до -600.. -500 мВ с помощью электромембранного генератора без изменения солевого состава при незначительном изменении pH с экспозицией 30 и 60 мин раз в сутки положительно сказывается на основных рыбоводно-биологических показателях выращивания молоди африканского клариевого сома. Для модификации ОВП водных растворов использовали электромембранную установку с ионообменной биполярной мембраной.

В настоящее время ведутся исследования на молоди осетровых пород рыб – стерляди (*Acipenser ruthenus*) и молоди австралийского красноклещевого рака (*Cherax quadricarinatus*). Предварительный анализ результатов влияния воды с высоким отрицательным ОВП на биологические процессы в исследуемых организмах показал значительные положительные эффекты процесса стимулирования роста и продуктивности аквакультуры. Дальнейшие исследования имеют большой потенциал для создания новых технологий подращивания аквакультуры в установках замкнутого водоснабжения (УЗВ).

Таким образом, наблюдаемое увеличение продуктивности выращивания аквакультуры является результатом воздействия воды с высоким отрицательным ОВП на стимулирование биологических процессов в организме, однако механизм действия данного эффекта влияния требует более детального и тщательного изучения. Возможно, резкое изменение ОВП среды обитания аквакультуры приводит к возникновению стресса,

что оказывает выраженное влияние на динамику биохимических, клеточных, тканевых и системных регуляторных процессов. Кроме того, попадание молекулярного водорода в организм приводит к изменению в экспрессии генов в системных органах, что также может отражаться на физиологических показателях.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания: проект Минобрнауки РФ FZEN-2023-0006 23/20Т.

[1] D. Davydov, E. Nosova, S. Loza, A. Achoh, A. Korzhov, M. Sharafan, S. Melnikov, Use of the microheterogeneous model to assess the applicability of ion-exchange membranes in the process of generating electricity from a concentration gradient Membranes. Vol. 11, № 6, 2021.

[2] V.I. Zabolotsky, A.N. Korzhov, A.Y. But, S.S. Melnikov, Reagent-free electromembrane process for decarbonization of natural water, Membranes and Membrane Technologies, Vol. 1, P. 341-346, 2019.

[3] D.V. Shumeiko, S.A. Loza, A.N. Korzhov, V.K. Romashov, A.A. Elkina, V.V. Malyshko, A.V. Moiseev, Stimulation of the growth of juvenile north african catfish clarias gariepinus by modification of the water oxidation-reduction potential, Biology Bulletin, Vol. 49, P. 192-202, 2022.

О возможной внешней обусловленности спектра околочасовых периодов

Панчелюга В.А.^{1*}, Панчелюга М.С.¹

¹*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино, Россия;*
victor.panchelyuga@gmail.com

В работе [1] был впервые представлен локальный фрактальный анализ шумоподобных временных рядов методом всех сочетаний (МВС). Одним из первых результатов МВС-анализа является исследование 329-суточного массива флуктуаций скорости α -распада, обнаружившее устойчивый набор периодов в диапазоне 1-120 мин [2]. Для указанного диапазона была показана не только тесная связь найденного спектра со спектром собственных колебаний Земли, но также его универсальный характер: спектры периодов, найденные для флуктуационных процессов в системах различной природы (физической, химической, биологической) всегда совпадали с соответствующей частью спектра, найденного для временных рядов флуктуаций скорости α -распада [2]. В силу указанного свойства найденного спектра [2] он, в дальнейшем, был назван универсальным спектром периодов (УСП).

Свойство универсальности, впервые отмеченное в [2], было подтверждено дальнейшими исследованиями, в частности, в ходе изучения спектров во временных рядах флуктуаций хемилюминесценции планарий [3], а также флуктуаций температуры мелких млекопитающих и птиц [4-5] в т.ч., с разным уровнем основного обмена [5]. Было показано, что спектры периодов, найденные в [3] (с использованием МВС-метода [1]), а также в [4-5] (с использованием спектрального анализа, а также кросскорреляционного анализа различных масштабов во временных рядах пространственно-разнесенных измерений), совпадают с УСП.

При этом, УСП в флуктуациях температуры тем лучше выражен, чем больше изолированы друг от друга изучаемые группы животных. Условие изолированности (и, соответственно, выраженности УСП) лучше всего выполняется в случае пространственно-разнесенных измерений, когда исследуемые группы разнесены на расстояния от сотен метров до единиц километров и более. Данный результат, на наш взгляд, говорит о внешней природе агента, обуславливающего УСП в флуктуациях температуры экспериментальных животных [4-5], а также о его биотропной природе. Очевидно, что на внешнюю природу предполагаемого агента указывает также универсальность УСП: одни и те же периоды наблюдаются как в случае флуктуаций в физической системе [2] так и в биологических системах [3-5].

Околочасовые ритмы (ОР) – набор периодов в диапазоне 20–120 мин, были выявлены в динамике многих биологических систем: размерах клеточного ядра, интенсивности синтеза белка, активности ферментов, концентрации гормонов и АТФ, потребления кислорода, рН цитоплазмы и др. [6-8]. Они обнаружены у бактерий, дрожжей, некоторых других одноклеточных, моллюсков, в клетках млекопитающих. Эти ритмы выявляются как *in vivo* так и *in vitro* [6-7]. Несмотря на то, что большинство авторов рассматривают ОР только как результат внутренних регуляторных процессов организма или межклеточных взаимодействий, вопрос о природе ОР и возможном ОР-синхронизаторе остается открытым.

Исследование многочисленных литературных источников (в качестве примера можно привести сборник обзорных работ [8]) позволило выявить максимально полный набор периодов, которые различные авторы относят к ОР. Сравнение данного набора с УСП показало их хорошее совпадение. Этот результат позволяет рассматривать ОР, по аналогии с УСП, не как набор независимых периодов, а как проявления некоторого единого спектра. При этом, внешний биотропный агент, обуславливающий наличие УСП в динамике флуктуаций параметров биосистем [2-5], может рассматриваться как внешний синхронизатор ОР-спектра.

Необходимо отметить, что представление о внешнем ОР-синхронизаторе, в действительности, не противоречит бытующим представлениям о «внутренней» природе ОР, т.к., перечисленные выше биологические системы в динамике которых выявлены ОР [6-8], могут рассматриваться как автоколебательные с частотами, близкими к частотам УСП. Как известно, именно автоколебательный характер систем является необходимым условием их синхронизации.

Ряд биологически значимых периодов лежит за пределами спектра 1-120 мин, рассмотренного в [2-5]. По этой причине будут рассмотрены результаты дальнейших исследований УСП в диапазоне >120мин, а также некоторые теоретические подходы к его описанию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Панчелюга В.А., Панчелюга М.С. Фрактальная размерность и гистограммный метод: методика и некоторые предварительные результаты анализа шумоподобных временных рядов // Биофизика, 2013, том. 58, вып. 2, с. 377-384
2. Панчелюга В.А., Панчелюга М.С. Локальный фрактальный анализ шумоподобных временных рядов методом всех сочетаний в диапазоне периодов 1-115 мин // Биофизика, 2015, том. 60, вып. 2, с. 395-410.
3. V.A. Panchelyuga, Kh.P. Tiras, K.N. Novikov, M.S. Panchelyuga, S.E. Nefedova, O.Yu. Seraya On universal nature of periods spectrum in time series of planaria chemiluminescence // CEUR Workshop Proceedings, 2020, Vol.2763, pp. 61-63.
4. М.Е.Диатроптов, В.А.Панчелюга, М.С.Панчелюга Динамика температуры тела у мелких млекопитающих и птиц в 10-120-минутном диапазоне периодов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2020, т.169, №6, с.706-711.
5. Диатроптов М.Е., Панчелюга В.А., Панчелюга М.С., Сузов А.В. Околочасовые ритмы температуры тела у млекопитающих и птиц с разным уровнем обмена веществ // Доклады российской академии наук. Науки о жизни, 2020, том 494, №1, с.472–476.
6. Бродский В.Я. О природе околочасовых (ультрадианных) внутриклеточных ритмов. Сходство с фракталами // Известия АН, Сер. биологическая, 1998, №3, с.316-329.
7. Бродский В.Я. Околочасовые метаболические ритмы // Биохимия, 2014, т.79, вып.6, с.619-632.
8. Ultradian rhythms in life processes / D. Lloyd, E.L. Rossi (Eds.) Springer-Verlag, 1992, 419p.
9. Пиковский А., Розенблюм М., Куртс Ю. Синхронизация. М., Техносфера, 2003 - 508с.

Определение длительностей криосохранения срезов мозга при использовании замораживающего раствора на основе агара

Мокрушин А.А.^{1*}

¹Институт физиологии им И.П. Павлова РАН;

mok@inbox.ru

В регенеративной медицине, трансплантации органов и разработке лекарств используются протективные эффекты влияния низкой температуры на биологические объекты и их криосохранение (КС). В клинике для восстановления больших участков ткани мозга реципиента требуется применение интегрированной нервной ткани соответствующих структур мозга. Именно эти эксплантаты мозга необходимы для трансплантации при таких невропатологиях, как инсульт, эпилепсия и травма. Очевидно, переживающие срезы головного мозга являются оптимальными экспериментальными объектами для разработки протоколов КС и создании криобанка нервной ткани.

Длительность КС нейронных и синаптических механизмов в нервной ткани, при которых сохраняются значения активности, равные величинам до КС является важным критерием для криобанка. Цель настоящих исследований – определить длительность сохранения активностей глутаматергических ионотропных АМПА– и НМДА–зависимых механизмов при длительном (1–3 года) КС срезов мозга негипернотропных животных – крысы линии Вистар.

В работе были исследованы протективные эффекты КС срезов обонятельной коры в специально разработанном замораживающем растворе, состоящем из искусственного цереброспинального раствора (ИЦР) (мМ: 124.0 NaCl; 5.0 KCl; 2.6 CaCl₂; 1.24 KH₂PO₄; 1.2 MgSO₄; 3.0 NaHCO₃; 10.0 глюкозы; pH 7.3) и агара. Замораживающий раствор для криосохранения срезов готовили в следующей последовательности. Агар Difco Vastor (США) (3 г) заливали 100 мл 1 М NaCl и выдерживали 10 дней в термостате при +32 – +35°C. Полученный гелевый раствор центрифугировали при скорости 2000 об/мин в течение 10 мин. Легкую фракцию отсасывали из раствора и использовали для приготовления среды для криосохранения срезов: – 1.0 мл легкой фракции агара и 1.0 мл ИЦР (конечная концентрация агара 50%). Срезы головного мозга помещали в стеклянные флаконы с этой средой. Затем флаконы со срезами постепенно замораживали до –10 °С при медленной скорости

(0.1°C/мин) в морозильной камере с термостатом и хранили в течение: 52 сут, 1год, 2 года, 3 года. Спустя указанные интервалы времени флаконы со срезами отогревали до +37°C с медленной скоростью 0.1°C/мин извлекали срезы, помещали их в перфузионную камеру электрофизиологической установки и регистрировали амплитуды АМПА- и НМДА-потенциалов. Полученные значения соотносили к величинам до КС и выражали в процентах.

Проведенные исследования по криосохранению активности АМПА и НМДА механизмов в замораживающем растворе показали, что оптимальной концентрацией агара в гелевом растворе была 50%. Сохранение активности АМПА и НМДА механизмов составляло 87 и 99 %, соответственно, к значениям до КС. Затем, используя этот гелевый раствор (50% + ИЦР) были исследованы сохранения амплитуд АМПА и НМДА потенциалов в различные интервалы времени после начала КС.

Было обнаружено, что АМПА и НМДА механизмы проявляют различную криостабильность к длительности КС. АМПА механизмы были наиболее устойчивы и сохраняли свою активность в течение 3 лет (в среднем 97 % по сравнению к значениям до КС). НМДА оказались менее устойчивы, и их активность сохранялась в течение 1 года (в среднем 95 % по отношению к значениям до КС).

Снижение активности АМПА и НМДА механизмов при длительном КС срезов мозга после обнаруженных временных интервалов свидетельствуют о том, что агаровый гелевый раствор подвергается старению – процесс синерезиса. Это связано с нарушением структуры агарового геля и потерей воды из самого геля и, соответственно, из срезов мозга.

Для укрепления структуры геля и пролонгации временных интервалов КС срезов мозга были испытаны различные вещества эндогенного происхождения: мистиксин (синтетический КРФ подобный пептид), белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа, дипептид L-карнозин. Наиболее эффективным оказался дипептид L-карнозин.

Добавление L-карнозина (20 мМ) в раствор со срезом и последующая процедура замораживания-оттаивания приводила к пролонгации времени КС НМДА механизмов до 3 лет, АМПА- более 4 лет.

Разработанный и исследованный протокол КС эксплантатов головного мозга (срезов) теплокровных в замораживающем растворе ИЦР с агаром будет использован для создания криобанка, для длительного хранения эксплантов нервной ткани.

Особенности распределения пространственной частоты изменения электростатического потенциала вокруг геномной ДНК бактериофага Т7 в области промоторов, специфичных для нативной фаговой и хозяйской РНК полимеразы E.coli

Глытов И.В.^{1,3}, Осипов А.А.^{1,2*}

¹ИТЭБ РАН;

²ИВНДуНФ РАН;

³РНИМУ;

aosypov@gmail.com

ДНК - сильно отрицательно заряженная молекула, и ее электростатические взаимодействия с белками играют важнейшую роль в реализации генетической информации, в частности - регуляции транскрипции. Заряд вдоль молекулы ДНК распределен неравномерно и коррелирует с ее биологическими функциональными элементами, обеспечивая регуляцию биологических процессов.

Целью данной работы было проведение анализа неравномерности распределения электростатического потенциала вдоль молекулы ДНК в части выявления распределения пространственных частот изменения потенциала, в частности - выявление различий между частотными характеристиками распределения электростатического потенциала вокруг молекулы ДНК фага Т7 в области его нативных и хозяйских (E.coli) промоторов. В качестве инструмента для анализа было выбрано вейвлет-преобразование с использованием вейвлета Морле. Частотный анализ проводился с помощью специально написанных программ на языке Python. Данные были взяты из базы данных DEPPDB [1, 2].

Автокорреляционный анализ генома фага Т7 показал корреляцию выше 0.8 для фрагментов меньше 100 ангстрем с последующим плавным падением до незначимых величин и не выявил каких-либо масштабных периодичностей в распределении потенциала.

Сравнение вейвлет-спектров показало, что в промоторных областях, по сравнению со средним по геному, значительно выше мощность волн длиной 50-70 Ангстрем, т.е. около 14-20 п.о., что примерно соответствует масштабу сайтов связывания субъединиц РНК-полимеразы / целого белка. В области хозяйских промоторов и в среднем по геному мощность волн длиной 20-30 Ангстрем (6-9 п.о.) оказалась одинакова, но при сравнении промоторных спектров оказалась выше в области хозяйских промоторов, по сравнению с фаговыми. Размер

сайта посадки фаговой полимеразы соответствует полученным значениям длин волн в области фаговых промоторов.

Выявленные особенности нативных промоторов *E. coli* требуют дальнейшего изучения в связи с малостью их выборки на геноме бактериофага T7 по сравнению с хозяйской хромосомой в свете значительного различия соответствующих РНК полимераз.

Литература:

1. Osypov, A. A., Krutinin, G. G., & Kamzolova, S. G. (2010). DEPPDB—DNA electrostatic potential properties database: electrostatic properties of genome DNA. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 8(03), 413-425.

2. Osypov, A. A., Krutinin, G. G., Krutinina, E. A., & Kamzolova, S. G. (2012). DEPPDB—DNA ELECTROSTATIC POTENTIAL PROPERTIES DATABASE: ELECTROSTATIC PROPERTIES OF GENOME DNA ELEMENTS. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 10(02), 1241004.

3. A Practical Guide to Wavelet Analysis Christopher Torrence and Gilbert P. Compo Program in Atmospheric and Oceanic Sciences, University of Colorado, Boulder, Colorado

Оценка эффективности антибиотикотерапии при моделировании эшерихиоза у беспородных мышей в результате использования бензилпенициллина натриевой соли после обработки импульсным магнитным полем

Роденко Н.А.^{1,2*}, Савинков А.В.³, Глушечков В.А.^{1,2}, Васильева Т.И.², Ермаков В.В.³, Беляева И.А.^{1,2}, Дмитриева Ю.В.³, Цай А.А.²

¹Самарский федеральный исследовательский центр Российской академии наук;

²Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева;

³Самарский государственный аграрный университет;

t.rodenko@mail.ru

Введение. Приспосабливаемость живых организмов к существующим видам антибиотиков требует разработки новых или активизации уже существующих препаратов. Один из способов повышения антибактериальной активности – воздействие на антибиотик импульсным магнитным полем (ИМП) высокой напряженности [1]. В результате проведенных исследований зафиксировано достоверное увеличение антибактериальной активности бензилпенициллина натриевой соли на 12-24% в отношении бактерий *Escherichia coli* M17 (*E.coli* M17) после обработки препарата ИМП [2].

Целью данной работы – оценка эффективности антибиотикотерапии при моделировании эшерихиоза у беспородных мышей в результате использования бензилпенициллина натриевой соли, обработанной ИМП.

Материалы и методы. Опыты проведены на шестидесяти беспородных мышках средней массой тела 18-22 г. Экспериментальная модель эшерихиоза была получена введением мышам штамма *E.coli* M17 (НПО Микроген, Россия) внутрибрюшинным способом по 0,1 мл суспензии микроорганизмов в количестве $2 \cdot 10^9$ клеток/мл. В ходе проведения эксперимента использовались, разделенные на следующие группы: не зараженные ($n=10$); зараженные штаммом *E.coli* M17 ($n=10$); контрольная группа, которая получала инъекции антибиотика без обработки ИМП ($n=20$) и опытная группа мышей, которая получала инъекции антибиотика после обработки ИМП ($n=20$). Обработку бензилпенициллина натриевой соли осуществляли однократно при напряженности магнитного поля $H=0,09 \cdot 10^6$ А/м с частотой $f=40$ кГц. Введение антибиотика (100 000 ЕД) осуществляли подкожно по 0,2 мл три раза в сутки [3]. Лечение мышей антибиотиком обработанным и необработанным ИМП осуществлялось в течении нескольких дней. У всех животных были исследованы гематологические и биохимические показатели крови [4], а также производилась оценка микробной обсеменённости печени мышей.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований установлено достоверное повышение количества лейкоцитов в опытной группе через трое суток по отношению к значениям лейкоцитов у мышей через три часа после заражения на 34%. Спустя трое суток лечения на фоне увеличения доли лимфоцитов у животных наблюдалось снижение доли нейтрофилов в лейкограмме.

В результате после заражения мышей происходит повышение уровня общего белка, глюкозы, увеличивается активность аланинаминотрансферазы (АЛАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови в пределах физиологических значений, уровень гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ) превышал максимальные значения нормы. При использовании антибиотика, обработанного ИМП, у мышей опытной группы на третьи сутки лечения уровень АсАТ и ГГТ были достоверно выше по сравнению с исходными показателями у мышей (до заражения) на 34% и 73% соответственно.

При оценке действия антибиотика обработанного ИМП на количественный состав культуры *E.coli* в печени было установлено, что за первые сутки лечения количество микроорганизмов сократилось в 13 раз по отношению к группе мышей, лечение которых проводили необработанным ИМП антибиотиком. На третьи сутки исследований, не смотря на количественный рост культуры *E.coli* в печени обеих групп, у животных опытной группы отмечалось снижение роста микроорганизмов *E.coli* по сравнению с контрольной группой.

Выводы. После введения животным бензилпенициллина натриевой соли, обработанной ИМП, отмечается угнетение бактериальной обсемененности печени и более высокий реактивный уровень лейкоцитарной защиты организма. Снижение уровня основных параметров красной крови, а также увеличение значений ферментных маркеров состояния печени в сыворотке крови требует дополнительной проверки в рамках оценки субхронической токсичности обработанного антибиотика на функционирующие системы организма.

Список литературы

1. Пат. 2704317 Российская Федерация МПК А61N 2/04, А61К 31/43, А61Р 31/04. Способ увеличения антибактериальной активности антибиотиков [Текст] / Глушечков В.А. [и др.]; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королёва. – 2019113191; опубл. 28.10.2019, Бюл. №31 – 8с.

2. Исследование антимикробной активности бета-лактамовых антибиотиков после воздействия на них импульсным магнитным полем / Н.А. Роденко [и др.] // II Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики». – 2022. – С. 341-345.

3. Существующие требования и подходы к дозированию лекарственных средств лабораторным животным / А. В. Рыбакова [и др.] // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2018. – Т. 8, № 4. – С.207-217.

4. Волкова, С.А. Основы клинической гематологии / С.А. Волкова, Н.Н. Боровков. – Нижний Новгород: Издательство Нижегородской государственной медицинской академии, 2013. – 400 с.

Подходы к изучению фунгистатического действия растительного пептида нигеллина из *Nigella sativa* на клеточном и молекулярном уровнях

Барашкова А.С.¹, Бочаров Э.В.¹, Рогожин Е.А.^{1*}

¹ГНЦ РФ ФГБУН Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; rea21@list.ru

Растения представляют собой неисчерпаемый источник разнообразных биологически активных соединений, в том числе белков и пептидов. Последние как компоненты врожденного иммунитета растений реализуют многообразие функций, направленных на противодействие поражающим факторам внешней среды, в частности, микроорганизмам – возбудителям болезней, а также насекомым-вредителям. Несмотря на то, что за последние три десятилетия был накоплен внушительный объем данных по структурному разнообразию таких молекул, спектру их биологической активности, а также выяснению конкретной роли в растительном иммунитете, крайне мало информации получено в аспекте выяснения механизмов их действия на молекулярном уровне. Наиболее детально исследованы мембрано-активные способы антимикробной активности пептидов растений, как правило, приводящие к клеточному лизису или апоптозу патогенных микроорганизмов. При этом целая группа биологически активных пептидов, проникающих в клетку и осуществляющих свою функцию через ассоциацию с внутриклеточной мишенью, пока остается практически неизученной.

В рамках настоящей работы было исследовано взаимодействие харпино-подобного антимикробного пептида – нигеллина из семян нигеллы посевной (*Nigella sativa*) с конидиями и мицелием модельного мицелиального гриба – *Aspergillus niger* на клеточном и молекулярном уровне. Ранее было показано, что основное антифунгальное действие данной молекулы заключается в задержке физиологического роста и развития грибов, что является приоритетной функцией для многих представителей семейства харпино-подобных защитных пептидов растений (альфа-харпининов). В дальнейшем методом лазерной сканирующей конфокальной флуоресцентной микроскопии установлено, что данный пептид является типичным представителем так называемых «молекул, проникающих в клетку» (cell-penetrating molecules), при этом аналогичный эффект наблюдается в широком диапазоне действующих концентраций (0,5-32 мкМ). По соотношению сигналов зеленого (SYTO GREEN) и красного (йодид пропидия) флуоресцентных красителей выявлено, что при действии исследуемого пептида не приводит к пермеабилзации цитоплазматической мембраны. Данный эффект был зафиксирован во временной динамике (8-24 ч) на фоне наблюдения фунгистатического эффекта по сравнению с контрольным вариантом. С целью понимания вероятной молекулярной детерминанты, ассоциированной с клеточной мембраной и являющейся вероятным «сайтом» первичного связывания пептида, было изучено

взаимодействие молекулы с искусственными липидными бислоями методом калориметрического титрования. Для этой цели была использована пара для сравнения – на основе фосфатидилхолина (100%) и фосфатидилхолин/фосфатидилсерина (70/30%), которая обуславливает различия по суммарному заряду мембран. Полученные результаты также говорят о том, что адсорбция нигеллина на более отрицательно заряженных мембранах (фосфатидилхолин/фосфатидилсерин) сильнее, что, по всей видимости, определяет отличия в действии данного пептида на прокариотические и эукариотические клетки.

Работа поддержана проектом Российского научного фонда (№18-74-10073-П).

Поиск новых анти-воспалительных агентов среди тимусных гормонов

Парфенюк С.Б.^{1*}, Глушкова О.В.¹, Хренов М.О.¹, Шарапов М.Г.¹, Мубаракшина Э.К.¹, Кузеева А.А.¹, Новоселова Т.В.¹, Новоселова Е.Г.¹, Лунин С.М.¹

¹ИБК РАН - ФИЦ ПНЦБИ РАН;

lana_kras2@rambler.ru

Тимозин $\alpha 1$ – иммуномодуляторный пептид, принадлежащий к группе тимусных гормонов. Известен как агент, усиливающий опосредованные Т-клетками иммунные ответы несколькими механизмами, включая стимуляцию дифференцировки и/или созревания Т-клеток, активацию естественных клеток-киллеров и дендритных клеток и стимуляцию высвобождения про-воспалительных цитокинов. В работе использовали альвеолярные макрофаги RAW264.7, которые культивировали в присутствии липополисахарида (ЛПС), который является самым известным стимулятором про-воспалительного ответа клеток. В своей работе мы показали, что тимозин $\alpha 1$ проявляет ряд анти-воспалительных свойств. Тимозин $\alpha 1$ способен контролировать выработку активных форм кислорода (АФК) клетками альвеолярных макрофагов RAW264.7 в условиях стимуляции последним ЛПС из грамотрицательных бактерий. Действительно, добавление тимозина $\alpha 1$ к активированным макрофагам снижает повышение уровня АФК и таким образом предотвращает каскад патологических реакций. Показана способность тимозина $\alpha 1$ снижать продукцию ряда про-воспалительных цитокинов при инкубации клеток с эндотоксином. В частности, показано снижение продукции ИЛ-6, ИЛ-1 α , а также небольшое увеличение продукции анти-воспалительного цитокина ИЛ-10. Влияние тимозина $\alpha 1$ на пролиферативную активность альвеолярных макрофагов RAW264.7 выражается в увеличении количества клеток в присутствии как самого тимозина $\alpha 1$ в клетках без воздействия ЛПС, так и в активированных клетках. Исследование некоторых механизмов внутриклеточной сигнализации в условиях стимуляции альвеолярных макрофагов эндотоксином показало, что хотя тимозин $\alpha 1$ способен снижать экспрессию мРНК гена Tlr4, практически до контрольных значений, нами не было показано его влияние на сигнальный каскад NF- κ B. Что касается сигнального пути SAPK/JNK и в частности транскрипционного фактора AP-1, то тимозин $\alpha 1$ показал ранее неизвестные анти-воспалительные свойства, ингибируя гиперэкспрессию гена AP-1 в клетках RAW264.7, стимулированных эндотоксином. Кроме того, было показано снижение продукции двух изоформ JNK (p54 и p46) до контрольных значений, хотя эффект присутствия в среде культивирования клеток эндотоксина ожидаемо приводил к значительному повышению продукции обеих изоформ в отсутствие тимозина $\alpha 1$. Стабилизирующее влияние тимозина $\alpha 1$ на редокс-статус клеток RAW264.7 было подтверждено резким увеличением экспрессии гена Nrf-2, редокс-чувствительного транскрипционного фактора, регулирующего антиоксидантную защиту. Генами-мишенями NRF-2, в частности, являются ферменты-антиоксиданты, такие как пероксиредоксины и каталаза. Было установлено, что в присутствии тимозина $\alpha 1$ стимулированные эндотоксином макрофаги показывают более высокий уровень экспрессии гена каталазы, чем просто стимулированные ЛПС клетки, а уровень экспрессии пероксиредоксинов 1 и 6 остаются на высоком уровне, приблизительно равном уровню экспрессии данных генов в клетках, культивируемых с ЛПС. Отдельно хочется отметить тот факт, что в присутствии тимозина $\alpha 1$ наблюдается снижение экспрессии гена p53, из чего следует, что тимозин $\alpha 1$ способен снижать уровень апоптоза в клетках, стимулированных эндотоксином. Таким образом, в настоящей работе показаны новые, ранее неизвестные анти-воспалительные свойства тимусного гормона тимозина $\alpha 1$. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №22-24-00076.

Получение модели радиорезистентного рака прямой кишки методом последовательного фракционированного облучения клеток линии СТ26-WT

Бурдаков В.С.^{1,2*}, Верлов Н.А.¹

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»;

²ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)»;

burdakov_vs@pnpi.nrcki.ru

Лучевая терапия (ЛТ) является широко используемым методом адъювантной терапии для различных видов рака, до 80% онкобольных получают лучевую терапию либо с лечебной, либо с паллиативной целью. Тем не менее, несмотря на успешное применение ЛТ при раке, у некоторых пациентов после завершения курса ЛТ все еще развиваются рецидивы. Хотя рецидив опухоли после ЛТ может быть связан с остаточным заболеванием или агрессивной биологией опухоли, он также может быть связан с выживанием популяции клеток, которые либо обладают большей внутренней устойчивостью к ЛТ (например, гипоксические или раковые стволовые клетки), либо развиваются *de novo*. Эти радиорезистентные клетки могут затем повторно заселить участок опухоли, что приведет к рецидиву и неэффективности лечения. Предыдущие исследования показали, что в развитии радиорезистентности участвуют многочисленные факторы, в том числе нарушение регуляции сигнальных путей, гиперпродукция онкогенных мРНК, реакции на повреждение ДНК, наличие раковых стволовых клеток и изменения метаболизма рака, а также влияние самого микроокружения опухоли (включая гипоксию). Многие исследования сосредоточены на изолированных путях при изучении радиорезистентности, но вполне вероятно, что эти пути взаимосвязаны, например, гипоксия может вызывать более недифференцированный клеточный фенотип, характеризующийся повышенной экспрессией маркеров стволовых клеток, что также может влиять на экспрессию генов и путей, контролирующих стволоподобность, таких как, например, факторы Яманаки. По сравнению с исследованием химиорезистентности, механизмы, лежащие в основе развития радиорезистентности, плохо изучены, отчасти из-за отсутствия модельных систем радиорезистентности. Требуется более глубокое понимание этих молекулярных механизмов, лежащих в основе приобретенной радиорезистентности, а главное, разработка стратегий, позволяющих обойти эту клиническую проблему. Использование глобальных подходов для изучения механизмов резистентности вызывает все больший интерес, поскольку это позволит одновременно изучать несколько путей и дает представление о сложных биологических системах и реакции на лечение.

В этом исследовании, мы разработали новые радиорезистентные клеточные линии, полученные путем фракционированного облучения из клеточной линии рака прямой кишки СТ26-WT(ATCC-CRL2638). Родительская клеточная линия была выбрана исходя из того, что это простая и широко используемая животная модель колоректального рака. Существование доступной животной модели дает перспективы не только на генотипическую и фенотипическую характеристику полученных линий с целью поиска основных молекулярных путей, обуславливающих радиорезистентность, но и проведение функциональных исследований *In vivo*, которые могут позволить разработать более успешные терапевтические подходы для лечения пациентов с рецидивами, после предыдущего лечения с применением ЛТ. Для получения радиорезистентных линий нами были выбраны два режима фракционированного облучения с суммарной финальной поглощенной дозой 40 Грей(Гр), облучение проводилось на Гамма-установке для радиационных исследований РХ-γ-30. Первый включал в себя 20 фракций по 2Гр с мощностью дозы 0,95Гр/мин, облучение проводилось ежедневно, затем отбирался устойчивый клон(СТ26-WT-RR2). Второй режим состоял из 4 раундов облучения дозой 10Гр и мощностью дозы 8,5Гр/мин, после чего отбирался выживший клон, который облучался в следующем раунде(СТ26-WT-RR10). Во втором режиме, доза 10Гр за фракцию была выбрана исходя из того, что при облучении большими дозами, получить выживший клон из материнской линии у нас не получилось. Два подхода были выбраны с целью установить, приводит ли один из них к большей радиорезистентности, чем второй и является ли механизм приобретения резистентности универсальным.

Сравнительный анализ чувствительности полученных клеточных линий к воздействию ионизирующего излучения по отношению к материнской клеточной линии мы проводили методом оценки выживаемости и пролиферативной активности клеток всех трех линий после единоразового облучения линейкой доз от 2 до 10 Гр с шагом в 2Гр. Кривые роста клеток строили с помощью данных МТТ-теста и прямого измерения индекса роста клеток xCELLigence Real-Time Cell Analysis (Agilent Technologies, США). Полулетальная доза(ЛД50) оценивалась как доза, при которой через 10 дней после облучения, количество живых клеток в два раза меньше количества клеток той же линии, не подвергшихся облучению. ЛД50 для клеток линий СТ26-WT, СТ26-WT-RR2 и СТ26-WT-RR10, составили, соответственно 2.4±0.4, 3.2±0.5 и 4.5±0.6 Грей. В результате применения обоих подходов, мы получили клеточные линии, которые отличаются повышенной радиорезистентностью по сравнению с материнской клеточной линией. Разные протоколы облучения, а именно варьирование количества

фракций, дозы за фракцию и мощности дозы при сохранении суммарной поглощенной дозы неизменной, позволяют получить различающиеся по характеристикам клеточные линии.

Потенциал гидрогелей на основе модифицированных пектинов и настройки их свойств для терапии опухолей головного мозга

Патлай А.А.^{1*}, Белоусов А.С.¹, Шмелев М.Е.¹, Силантьев В.Е.^{1,2}

¹Институт наук о жизни и биомедицины, Дальневосточный Федеральный Университет;

²Институт химии ДВО РАН;

patlai.aa@dvfu.ru

Механические сигналы внеклеточного окружения играют важную роль в дифференцировке, метаболической активности, миграции клеток, адгезии и др [1, 2]. Поэтому при проектировании биоматериалов для биомедицины необходимо иметь полное представление не только о химических, но и о структурных и механических свойствах изучаемого полимера. Гидрогели являются перспективными материалами для воссоздания клеточного окружения и могут быть применены как в форме объёмных трёхмерных конструкций, так и в виде функционализируемых покрытий [3, 4].

Растительный полисахарид пектин образует биосовместимые и биоразлагаемые нетоксичные гидрогели благодаря механизму ионного желирования. Кроме того, по своей структуре пектин напоминает гиалуроновую кислоту – основной компонент ВКМ взрослого мозга [5].

Поэтому целью данной работы стало изучение структурных и вязкоупругих свойств гидрогелей и покрытий на основе модифицированных пектинов и их влияния на нейральные клетки *in vitro*.

Мы разработали варианты гелей с различной структурой и вязкоупругими свойствами, меняя концентрацию пектина и количество свободных карбоксильных групп (степень этерификации, СЭ). Модуль накопления гидрогелей экспоненциально возрастал с увеличением концентрации пектинового порошка и варьировался в диапазоне от 3 до 900 Па. Мы подобрали пары материалов со СЭ 0% и 50% с аналогичной реологией свыше 100 Па для ремоделирования внеклеточного матрикса центральной нервной системы. Особенности набухания гидрогелей и их стабильность *in vitro*, а также структура, изученная с помощью СЭМ и FTIR, отличались, что может быть важно для биомедицинского применения. Механические и морфологические характеристики гидрогелей были изучены также в формате покрытий с помощью АСМ. Биоанализы на культурах глиобластомы С6 и U87MG показали антиглиомный потенциал применения гидрогелей за счет снижения пролиферативной и метаболической активностей клеток и модулирования их миграции, и поддержания при этом высокой жизнеспособности нервных клеток. При этом материалы со СЭ 50% вне зависимости от концентрации оказали более сильный ингибирующий эффект на метаболизм опухолевых клеток, чем материалы со СЭ 0%.

1. Petrov P. B., Ivanov I. I., et al., J. Mag. Mag. Mater. 311, 6 (2007).

2. Mahumane, G.D.; Kumar, P.; et al. 3D Scaffolds for Brain Tissue Regeneration: Architectural Challenges. Biomater. Sci. 6 (2018).

3. Hrapko, M.; van Dommelen, J.A.W. et al. Characterisation of the Mechanical Behaviour of Brain Tissue in Compression and Shear. Biorheology 45 (2008).

4. Gomez-Florit, M.; Pardo, A.; et al. Natural-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications. Mol. Basel Switz. 25 (2020).

5. Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; et al. Biopolymer-Based Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. Biomacromolecules 12 (2011).

6. Munarin, F.; Tanzi, M.C.; et al. Advances in Biomedical Applications of Pectin Gels. Int. J. Biol. Macromol. 51 (2012).

Преимущество фотодинамического воздействия в импульсном режиме облучения для подавления роста опухолевых сфероидов

Богданов А.А.^{1*}, Клименко В.В.¹, Богданов Ан.А.¹, Князев Н.А.¹, Моисеенко В.М.¹
¹Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов
медицинской помощи (онкологический);
aleks_aa@mail.ru

Введение. Фотодинамическая терапия (ФДТ) оказывает цитотоксическое действие на опухолевые клетки за счет выработки синглетного кислорода. Истощение молекулярного кислорода в опухолевой ткани является ограничивающим фактором для противоопухолевого эффекта ФДТ по всей толщине ткани. Трехмерные опухолевые сфероиды являются хорошей моделью опухолевой ткани с ограниченным поступлением кислорода. Целью данной работы было определить влияние параметров лазерного облучения во время ФДТ на эффективность ингибирования роста опухолевых сфероидов.

Методы

Использовали клеточную линию аденокарциномы толстой кишки мыши СТ26. Клетки культивировали в инкубаторе с 5% CO₂ в культуральной среде RPMI-1640, дополненной 10 % FBS и пенициллином/стрептомицином. 3D-сфероиды были получены путем посева 1000 клеток в 100 мкл полной среды и культивирования в течение 5 дней в 96-луночных круглодонных планшетах (96-луночный ULA plate, Corning, США). Опухолевые сфероиды диаметром 450-600 мкм инкубировали с фотосенсибилизатором на основе хлорина е6 в концентрации 5 мкг/мл в 200 мкл полной среды. ФДТ проводили 24 часа спустя с использованием лазера с длиной волны 662 нм в режиме непрерывного облучения (CW) и импульсного облучения (Pulse) при скорости потока 50 мВт/см² с дозой облучения 5, 10, 15, 60 Дж/см².

Результаты

Было показано, что снижение средней плотности мощности с 50 мВт/см² до 12,5 мВт/см² в случае CW ФДТ с дозой облучения 15 Дж/см² приводит к увеличению повреждения СТ26 опухолевых сфероидов в глубину с 50-60 мкм до 160 мкм. Экспериментальное сравнение CW и Pulse режимов ФДТ показало, что максимальная скорость торможения роста опухолевых сфероидов наблюдалась при оптимизированных параметрах импульсного облучения с плотностью потока излучения 50 мВт/см², длительностью импульса 200 мс и периодом повторения 800 мс, соотношением 1/4. Дальнейшее увеличение рабочего цикла до 1/16 не увеличивало цитотоксичность клеток *in vitro*. Было проведено сравнение фотодинамического цитотоксического эффекта на жизнеспособность клеток в клеточном монослое и сфероидах. IC₅₀ (PDT) для монослоя клеток СТ26 составляло около 2,5 Дж/см² как в CW, так и в Pulse режимах. IC₅₀ (PDT) для опухолевых сфероидов составил около 7,5 Дж/см² в импульсном режиме и 20 Дж/см² в непрерывном режиме. Данные проточной цитометрии, полученные для одноклеточной суспензии из сфероидов СТ26 через 24 часа после ФДТ в непрерывном и импульсном режимах с использованием набора для обнаружения Аннексина V (маркер апоптоза), продемонстрировали увеличение доли Аннексин V-позитивных клеток с 43,1 % в непрерывном режиме до 93,4 % в импульсном режиме и значительное снижение доли живых клеток с 56,2 % в непрерывном режиме до 5,5% в импульсном режиме при 50 мВт/см² и дозе облучения 15 Дж/см².

Вывод

Использование оптимизированного импульсного режима ФДТ снизило среднюю скорость потока до 12,5 мВт/см² и продемонстрировало большее подавление роста опухолевых сфероидов по сравнению с использованием непрерывного режима за счет повторной оксигенации и нормализованной эффективности ФДТ в области пролиферации клеток опухолевых сфероидов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга для ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)».

Проводимость монослоя кардиомиоцитов при влиянии кардиотоксичных веществ

Подгурская А.Д.^{1,2*}, Агладзе К.И.^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет);

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт;

Alisapodgurskaya@mail.ru

Целью исследования явилось изучить характеристики проводимости *in vitro* под воздействием гептанола, этанола, эритромицина, дифенгидрамина, циклофосамида методом оптического картирования, а также

установить связь с их влиянием на потенциал-зависимые ионные каналы и щелевые контакты. Методы исследования: оптическое картирование монослоя кардиомиоцитов с флуоресцентным кальций-зависимым красителем, иммуноцитохимия, конфокальная микроскопия. Результаты: 1. Гептанол (0,1–0,9 мМ) и этанол (17–614 мМ) дозозависимо уменьшают скорость проводимости и различно действуют на величину критического радиуса кривизны фронта волны возбуждения в монослое неонатальных крысиных кардиомиоцитов. 2. Эритромицин (15–45 мкМ) уменьшает скорость проводимости незначительно, максимально на $12\pm 9\%$, уменьшает максимальную усваиваемую частоту максимально на $28\pm 12\%$ и вызывает ре-ентри на остром конце линейного препятствия в 33% случаев в монослое человеческих кардиомиоцитов, полученных из ИПСК здорового донора линии m34Sk3. Обнаружено отсутствие перечисленных эффектов эритромицина при воздействии на монослой неонатальных крысиных кардиомиоцитов. 3. Дифенгидрамин (0,3–16 мкМ) уменьшает скорость проводимости максимально на $47\pm 18\%$, уменьшает максимальную усваиваемую частоту максимально на $48\pm 12\%$ и вызывает ре-ентри на остром конце линейного препятствия в 50% случаев в монослое человеческих кардиомиоцитов, полученных из ИПСК здорового донора линии m34Sk3. 4. Циклофосфамид (213–852 мкМ) не влияет на скорость проводимости в пределах погрешности, уменьшает максимальную усваиваемую частоту максимально на $25\pm 7\%$, не вызывает ре-ентри на остром конце линейного препятствия в монослое человеческих кардиомиоцитов, полученных из ИПСК здорового донора линии m34Sk3. Циклофосфамид не влияет на скорость проводимости в пределах погрешности, уменьшает максимальную усваиваемую частоту максимально на $33\pm 9\%$ на модели неонатальных крысиных кардиомиоцитов. Обнаружено дозозависимое уменьшение площади проводимости монослоя кардиомиоцитов при влиянии (213–852 мкМ) циклофосфамида и разрушение α -актинина при воздействии 213 мкМ циклофосфамида на изолированные ИПСК-КМ линии m34Sk3 и НККМ до 30 минут. Новизна и применение результатов: впервые получены зависимости скорости проводимости и критического радиуса кривизны фронта волны возбуждения от концентраций гептанола и этанола и значения характеристик проводимости (скорость, максимальная усваиваемая частота, вероятность формирования ре-ентри на остром конце линейного препятствия) под влиянием эритромицина, дифенгидрамина и циклофосфамида. Монослой кардиомиоцитов, полученных из ИПСК здорового донора, приближена к реальной сердечной ткани пациента, что позволило дополнить известные данные о кардиотоксичности данных лекарственных средств и раскрыть механизм образования аритмий под их воздействием *in vitro*. Данному исследованию можно найти применение в медицине и разработке лекарственных средств.

Работа поддержана Государственным заданием по разделу наука №55, тема: «Разработка персонализированных методов клеточных технологий в кардиохирургии» Правительства Московской области.

1. A.D. Podgurskaya, M.M. Slotvitsky., V.A. Tsvelaya, K.I. Agladze Current Topics in iPSCs Technology, Volume 17, Chapter 15: iPSCs for erythromycin arrhythmogenicity testing. 1st Edition, Editor: Alexander Birbrair, Paperback ISBN: 9780323998925 Imprint: Academic Press Published Date: 7th January 2022 Page Count: 300

2. Podgurskaya A.D., Slotvitsky, M. M., Tsvelaya, V. A., Agladze, K. I. Diphenhydramine Arrhythmogenicity Testing Using Monolayers of Human iPSC-derived Cardiomyocytes //2021 IEEE Ural-Siberian Conference on Computational Technologies in Cognitive Science, Genomics and Biomedicine (CSGB). – IEEE, 2021. – С. 300-303.

3. Podgurskaya, A. D., Slotvitsky, M. M., Tsvelaya, V. A., Frolova, S. R., Romanova, S. G., Balashov, V. A., Agladze, K. I. Cyclophosphamide arrhythmogenicitytesting using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes //Scientific reports. – 2021. – Т. 11. – №. 1. – С. 1-13.

4. Podgurskaya, A. D., Tsvelaya, V. A., Slotvitsky, M. M., Dementyeva, E. V., Valetdinova, K. R., Agladze, K. I. The use of iPSC-derived cardiomyocytes and optical mapping for erythromycin arrhythmogenicity testing //Cardiovascular toxicology. – 2019. – Т. 19. – №. 6. – С. 518-528.

5. Podgurskaya, A. D., Tsvelaya, V. A., Frolova, S. R., Kalita, I. Y., Kudryashova, N. N., Agladze, K. I. Effect of heptanol and ethanol on excitation wave propagation in a neonatal rat ventricular myocyte monolayer //Toxicology in Vitro. – 2018. – Т. 51. – С. 136-144.

Процесс формирования кристаллов льда в криопротекторных средах для криоконсервации клеток

Иванова А.А.^{1*}, Яковенко С.А.¹, Миронова А.Г.², Симоненко Е.Ю.¹

¹Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия;

²Клиника ЭКО "АльтраВита", Москва, Россия;

annetkurella@yandex.ru

Эффективная заморозка и хранение сперматозоидов человека является крайне актуальной задачей для вспомогательных репродуктивных технологий. Несмотря на то, что криоконсервация сперматозоидов проводится с 1960-ых годов, до сих пор подвижность и оплодотворяющая способность клеток после криоконсервации уменьшается в среднем на 30–70% [1]. В настоящий момент составы криопротекторных сред

подбираются эмпирически, основываясь на наблюдениях за показателями клеток без глубокого понимания физико-химических процессов, происходящих в конкретных растворах при низких температурах и влияния на эти процессы скоростей и режимов заморозки.

Поэтому целью работы является изучение влияния различных компонент криопротекторных сред и условий заморозки на процесс кристаллообразования в криопротекторных средах, а также подбор оптимального состава криопротекторной среды и режима заморозки, повышающего выживаемость клеток.

Для получения зависимости теплоемкости от температуры был использован калориметр PPMS (Physical Property Measurement System, Quantum Design, Inc., USA) [2]. Оценка влияния на кристаллообразование добавления отдельных компонент, а также различных режимов заморозки была проведена с помощью рентгеноструктурного анализа (DESY, Германия).

В результате проведенных экспериментов были получены зависимости теплоемкости от температуры для буферного раствора глицерина (12%об.) с поэтапным добавлением альбумина (4 мг/мл) и сахарозы (0,5 М). Основным результатом калориметрических измерений стал вывод о том, что добавление сахарозы к водному раствору глицерина уменьшает температурный промежуток между температурой плавления и температурой стеклования, что может способствовать лучшей выживаемости клеток.

Первые эксперименты с помощью рентгеноструктурного анализа были проведены для базовых растворов малых объемов (20-30 мкл), чтобы продемонстрировать возможность использования данного метода для изучения процесса кристаллообразования. Были получены дифракционные картины для водно-глицеринового раствора (50% об.), воды (100%) и исследуемого раствора (12% об. глицерина). Однако, в настоящее время в клиниках при работе со сперматозоидами чаще всего используется метод медленной заморозки больших объемов образцов. Поэтому дальнейшее изучение процесса образования кристаллов льда в криопротекторных растворах было проведено для образцов объемом 1,7 мл. Для оценки средних размеров кристаллов, формирующихся в растворе при криоконсервации, было написано программное обеспечение, позволяющее численно оценить средние размеры кристаллов. С помощью данной программы были получены размеры средних кристаллов для базовых растворов при замораживании в больших объемах. Показано, что средний размер кристаллов в растворе со всеми компонентами составляет 8 ± 1 мкм, а для водного раствора сахарозы (0,5М) без глицерина 20 ± 2 мкм. Также было обнаружено, что добавление сахарозы приводит к увеличению числа кристаллов в растворе, но их размеры значительно меньше. Данное наблюдение коррелирует с предполагаемой функцией непроникающих компонент, а также подтверждает результаты, полученные ранее методом калориметрии.

В ходе проведенных экспериментов было обнаружено, что кристаллообразование в образцах объемом 1,7 мл происходит неоднородно при классической вертикальной заморозке. В связи с этим был предложен альтернативный метод заморозки сперматозоидов с горизонтальным расположением пробирки. Для этого на 3D-принтере был изготовлен держатель, позволяющий адаптировать метод заморозки, используемый в клиниках. Было показано, что средние размеры кристаллов для коммерческого криопротектора SpermFreeze при вертикальном расположении в верхней и нижней части пробирки составляют соответственно 13 и 8 мкм. При горизонтальном положении процесс формирования кристаллов происходит более однородно и средний размер формирующихся кристаллов меньше, а именно 10 и 8 мкм в верхней и нижней части пробирки. Вывод об однородности формирования кристаллов при горизонтальном расположении пробирки был также подтвержден статистически для всех изучаемых растворов.

Таким образом, методами адиабатической калориметрии и рентгеноструктурного анализа показано, что добавление сахарозы к водному раствору глицерина при замораживании в малых объемах уменьшает температурный промежуток между температурой плавления и температурой стеклования, а также уменьшает размер формирующихся кристаллов. В работе с помощью предложенного нового метода анализа дифракционных картин для криопротекторных сред были численно оценены размеры кристаллов для всех изучаемых криопротекторных сред. Также было продемонстрировано, что формирование кристаллов при вертикальном размещении образцов во время заморозки происходит неравномерно, разброс их величины может достигать 20 мкм и более, в то время как горизонтальное расположение статистически значимо приводит к более однородному формированию кристаллов внутри образца. На основании полученных результатов был разработан и предложен новый метод заморозки сперматозоидов в криопробирках с горизонтальным расположением образцов при криоконсервации.

1. Libo S. P., Picton H. M., and Godson R. G., In Current Practices and Controversis in Assisted Reproduction, World Health Organization, Geneva, 2001, p. 152–165

2. E. Yu. Simonenko, V.V.Pryadun, A.A.Ivanova, E.V. Burmistrova, A.N. Vasiliev, S.A. Yakovenko, An Adiabatic Calorimetry Method to Determine the Thermodynamic Characteristics of Cryoprotectants, 2019, Vol.64, No. 1, p.1-6

Радиомитигаторные свойства α -липоевой кислоты и совместное её применение с метформином и этилметилгидроксипиридина сукцинатом при рентгеновском облучении мышей

Карманова Е.Е.^{1,2*}, Черников А.В.², Усачева А.М.², Брусков В.И.²

¹Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пуцзино, Россия;

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцзино, Россия;
silisti@bk.ru

Введение. А-липоевая кислота (ЛК, тиоктовая кислота) – эффективный антиоксидант, используемый в терапии заболеваний, ассоциированных с окислительным стрессом, и потенциально может выступать в качестве радиомитигатора – радиозащитного средства, применяемого вскоре после облучения [1,2]. Целью данной работы было исследование радиомитигаторных свойств ЛК и совместное использование её с метформином (МФ) и этилметилгидроксипиридина сукцинатом (ЭМГПС, мексидол) при остром облучении животных.

Методы. Исследование проводили 30-тидневным тестом на выживаемость мышей на модели острого облучения животных в летальной дозе (LD). Тотальное облучение животных проводили в ЦКП ИБК РАН на рентгеновской установке РУТ-15 (МосРентген, Россия) при мощности дозы 1 Гр/мин (фокусное расстояние 0,375 м, 20 мА, 200 кВ). Для экспериментов были использованы самцы аутбредных мышей Кв: SHK в возрасте 6-8 недель и весом 29±4 г (питомник Крюково, РАМН). Животные содержались в стандартных условиях вивария. Животных подразделяли на группы от 10 до 20 особей. Препараты для инъекций готовили в растворе для инъекций - МФ (1,1-диметилбигуанид гидрохлорида (Sigma-Aldrich, США)) или разбавляли аптечные препараты - ЭМГПС («Мексидол») раствор для внутримышечного и внутривенного введения (Фармасофт, Россия) и ЛК («Берлитион 600» концентрат для приготовления раствора для инфузий (Berlin-Chemie, Германия)). Растворы вводили через 15 мин после облучения внутривенно в объеме 0,3 мл/мышь и перорально 10 мкл/мышь. Предварительно для исследуемых мышей Кв:SHK была получена кривая доза-эффект в диапазоне от 5 до 7 Гр. В диапазоне от 5 до 6,5 Гр зависимость имела форму, близкую к линейной. При дозе 5 Гр смертность была на уровне 35 %, при 6,5 95 %, LD50 ~ 5,4 Гр. В промежутке с 6,5 до 7 Гр смертность достигает максимума – 100 %. В дальнейшем для экспериментов была взята LD95 - 6,5 Гр, а 7 Гр – избыточная LD.

Результаты. В работе проведено три теста: №1 – первичное исследование радиомитигаторных свойств, №2 – комбинирование ЛК с другими возможными радиомитигаторами, №3 – подбор «терапевтического окна».

В тесте №1 Мышей облучали в дозе 6,5 Гр, ЛК вводилась в дозе 40 мг/кг однократно [2] в 2 группах, одну из которых дополнительно лечили курсом перорально 1 раз в сутки по 7 мг/кг ЛК на протяжении 10 дней. Для сравнения вводили препарат-перехватчик свободных радикалов - витамин С 100 мг/кг. В группе контрольных облученных мышей средняя продолжительность жизни (СПЖ) составила 11,8 сут, а выжило 10 %. ЛК при однократном введении увеличивала выживаемость 40 %, что на 10 % ниже витамина С, и СПЖ до 18,1 сут. При курсовом применении ЛК наблюдался радиосенсибилизирующий эффект: СПЖ составила 9,6 суток, а 100 % смертность наступила на 23 сутки.

В тесте №2 ЛК комбинировали с ЭМГПС[3] и МФ[4]. Предполагалась гипотеза об усилении ими радиомитигаторных свойств ЛК или синергизме их радиомитигаторных свойств, то выбрали избыточную LD 7 Гр, дополнительный контроль – 6,5 Гр. В группе 6,5 Гр выжило 5 % животных, 7 Гр – 0 %, но СПЖ значительно не различалась: 8,5 и 8,9 сут соответственно. Группы, облученные в дозе 7 Гр, составляли: 1 - ЛК 40 мг/кг + МФ 30 мг/кг, 2 - ЛК 40 мг/кг + ЭМГПС 10 мг/кг п/о 10 суток после облучения и 3 - ЛК 40 мг/кг + МФ 30 мг/кг + ЭМГПС 10 мг/кг п/о 10 суток после облучения. Полученные результаты: выживаемость в группах 1-3 была 0, 10 и 0 % соответственно. СПЖ в группах 1-3 так же была низкой: 8,3, 11,3 и 10,7 сут. Таким образом, синергизма между препаратами не наблюдалось.

Поэтому в тесте №3, целью которого был подбор «терапевтического окна» ЛК и повторная проверка сочетаемости её с МФ и ЭМГПС, использовали дозу 6,5 Гр. Для облученного контроля выживаемость была на уровне 10 %, а СПЖ 16,8. Опытные группы были следующими: 1 - ЛК 40 мг/кг, 2 - ЛК 100 мг/кг, 3 - ЛК 5 мг/кг, 4 - ЛК 40 мг/кг + ЛК 10 суток по 0,4 мг/кг/сут, 5 - ЛК 40 мг/кг + ЛК 10 суток по 4 мг/кг/сут, 6 - ЛК 40 мг/кг + ЭМГПС 100 мг/кг, 7 - ЛК 40 мг/кг + ЭМГПС 10 суток по 10 мг/кг/сут, 8 - ЛК 40 мг/кг + МФ 30 мг/кг, 9 - ЛК 40 мг/кг + МФ 10 суток по 3 мг/кг/сут. При этом выживаемость была следующей: 1 – 30%, 2 – 50%, 3 – 60%, 4 – 60%, 5 – 40%, 6 – 20%, 7 – 10%, 8 – 10% и 9 – 0%. СПЖ распределилась несколько другим образом: 1 - 19,2 сут, 2 - 22,6 сут, 3 - 24,2 сут, 4 - 23,2 сут, 5 - 22,6 сут, 6 - 12,3 сут, 7 - 14,1 сут, 8 - 13,8 сут, 9 - 14,7 сут. Наилучшими по обоим показателям были группы 3 и 4, где ЛК применяли в низких дозировках, увеличение дозировки на порядок в группах 1,2 и 5 привело к снижению радиомитигаторного эффекта. Комбинирование ЛК с ЭМГПС и МФ повторно не только не дало значимого положительного результата, но и снизило радиозащитные свойства ЛК (группы 6, 7 и 8) и даже вызвало радиосенсибилизацию (группа 9).

Выводы. ЛК обладает радиомитигаторными свойствами при облучении рентгеновским излучением мышей в летальной дозе. Данный эффект чувствителен к дозировке ЛК, при этом предпочтительны низкие дозы

препарата. Радиомитигаторные свойства ЛК ослабляются при её комбинировании с ЭМГПС и МФ. Поскольку все три препарата влияют на функционирование митохондрий, происходит нарушение выработки энергии и усугубление окислительного стресса.

1. Усачева АМ, Черников АВ, Карманова ЕЕ, Брусков ВИ, Хим.-фарм. ж., 55 (11), 9-17 (2021).
2. Карманова ЕЕ, Черников АВ, Усачева АМ, Брусков ВИ, Хим.-фарм. ж., 56(3) 3-7 (2022).
3. Карманова ЕЕ, Черников АВ, Усачева АМ, Брусков ВИ, Хим.-фарм. ж., 54 (7) 10–14 (2020).
4. Karmanova EE, Abdullaev SA, Ivanov VE, et al., IOP conference series. Mat. Sci. and Eng., 487, 012023 (2019).

Реакция клеток HeLa с аденовирусом на частотно - резонансные воздействия, выявляемая с помощью потенциал – чувствительного флуоресцентного зонда

Морозова Г.М.^{2*}, Лопатина О.А.¹, Аскарлова К.З.², Гринкевич О.М.¹, Фирсова Е.Л.¹

¹ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалея;

²Российский университет дружбы народов, г. Москва, РФ;

gimorozova@mail.ru

Важной целью частотно-резонансных воздействий (ЧРВ) на живой организм является усиление его адаптационных механизмов при патологических процессах. Ранее показано, что изменение электрических трансмембранных потенциалов (ТМП) в клетках адекватно отражают изменения их физиологического и энергетического статусов [1- 4]. В модельных медико-биологических исследованиях для выявления физико-химических особенностей жизнедеятельности раковых клеток при разных воздействиях широко используется культура клеток карциномы шейки матки линии HeLa. С другой стороны, в последние годы возрастает интерес к микробиологическим способам борьбы с онкологией. В связи с этим целью данной работы является исследование сопряженных реакций онкоклеток культуры HeLa, инфицированной аденовирусом (АВ), на разные ЧРВ по флуоресценции потенциал-чувствительного зонда.

Для оценки биофизических показателей в клетках использовали витальный полихроматический флуоресцентный зонд-катион 4-п-диметиламиностирил-1-метилпиридиний (ДСМ) [1]. Окрашивание клеток осуществляли путем добавления физиологического раствора зонда ДСМ к суспензиям клеток HeLa в эппендорфах до конечных рабочих концентраций с последующей инкубацией этих клеток в термостате (37°C). Витальные препараты с монослоем окрашенных клеток на покровных стёклах исследовали в свете флуоресценции ДСМ на микроскопе – флуориметре «ЛЮАМ» аналогично [2]. Воздействие на клетки осуществляли индуктором аппарата Мини-эксперт-ДТ фирмы «Имедис» путем облучения клеточных препаратов с экспозицией 3 мин. частотами F86 (режим 1) и F87 (режим 2) [2]. Контролем служили необлученные препараты. Значения суммы отрицательных ТМП на плазматической и митохондриальной мембранах и положительного ТМП на ядерной мембране оценивали по интенсивности и цвету флуоресценции ДСМ в разных компартаментах клеток в монослое согласно [2,3]. Гистограммы распределения клеток по диапазонам ТМП-ов при разных экспериментальных условиях получали аналогично [3]. Установлено, что ТМП \geq |- 200 мВ], сопряженный с энергизацией митохондрий, достигается через 24 ч культивирования клеток. Сравнительный анализ наших результатов показал, что в онкоклетках чистой культуры обе частоты оказывают достоверный эффект деполяризации клеточных мембран, но в разной степени. Облучение в режиме 1 вызывает уменьшение пула клеток с высокими ТМП на 28 %, а также деэнергизацию митохондрий и снижение положительного ТМП на ядерной мембране у 12 % клеток, при этом катионы ДСМ проникают внутрь ядра. В режиме 2 только 11 % клеток сохраняют высокий ТМП, а пул деэнергизированных клеток возрастает на 20%. Следовательно, воздействие частотой F87 более эффективно для деактивации онкоклеток.

В эксперименте с препаратами клеток, зараженных АВ, выявлено уменьшение пула клеток с высокими ТМП на 35% и возрастание пула клеток с деэнергизированными митохондриями на 38%. При этом в цитоплазме и ядрах таких клеток появляются области с диффузной жёлто-зеленой флуоресценцией ДСМ связанного с активными вирусными скоплениями, нарушаются межмембранные контакты клеток в монослое. Можно заключить, что размножение АВ в культуре клеток приводит к значительному изменению электрических свойств клеточных мембран и хроматина в ядрах, и как следствие к нарушению жизнеспособности онкоклеток. Однако, этот эффект АВ может ослабевать на фоне ЧРВ. Реакция клеток культуры с АВ на ЧРВ имеет особенности, а именно: в режиме 1 растёт пул деполяризованных клеток в монослое на 25 %, в такой же степени уменьшается площадь скоплений АВ; в режиме 2 уже 60 % площади монослоя не содержат активных АВ. При этом у части клеток (13%) происходит реполяризация мембран и энергизация митохондрий. Следовательно, усиление эффекта деактивации АВ в клетках под влиянием облучения в режиме 2 может способствовать частичной реанимации клеток карциномы. С другой стороны, это указывает на возможный антивирусный эффект при облучении частотой F87 других инфицированных клеток.

1. Morozova G.I., Parkhomenko T.V., Klitsenko O.E., Tomson V.V. Stimulating Effect of Erythropoietin on Thymocyte Energetics Established in vitro with Potential sensitive Fluorescent Probe. //Biochemistry Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. Moscow: 2007. Vol.1. No 4. P. 325 -330.

2. Добрецов Г.Е., Косников В.В., Морозова Г.И. и др. Измерение градиента концентрации флуоресцентного зонда-катиона ДСМ на плазматической и митохондриальной мембранах лимфоцита. //Биологические мембраны. 1986. Том 8. № 3. С. 266-273.

3. Морозова Г.И., Лопатина О.А., Михайлова Г.Р., Данлыбаева Г.А., Подчерняева Р.Я., Егорочкин Ю.В. Сравнительное исследование эффектов частотно-резонансных воздействий и голографической информационной копии на модели клеток мозга хорька с применением потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда //Биомедицинская радиоэлектроника. 2013. № 5. С. 25-36.

4. Тарнопольская О. В., Непомнящая Е. М., Бирбраер В. М., Тюрбеева М. Л., Макарова Е. И. Средний мембранный потенциал клеток опухолей пяти гистотипов. //Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. № 10. С.108-109.

Реологические особенности крови сусликов в негибернационный период

Никитина Е.Р.^{1*}, Катюхин Л.Н.¹, Забелинский С.А.¹, Чеботарева М.А.¹, Похмельнова М.С.¹,
Шуколюкова Е.П.¹, Кличханов Н.К.²

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им.И.М.Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия ;

elena.nikitina@bk.ru

Суслики являются гибернарующими животными, которые весь период от весны до осени готовятся к зимовке, увеличивая свои жировые запасы. Сезонные изменения физиологического состояния животных существенно влияют на гематологические, биохимические и реологические свойства крови. В активный период, начиная с весны, происходит смена популяции эритроцитов за счет поступления в кровь ретикулоцитов из костного мозга и выведения из кровотока старых клеток. В летний период потребление пищи богатой полиненасыщенными жирными кислотами способствует изменению состава депонированных липидов, а также состава липидов плазмы и мембран форменных элементов крови (Dark, 2005; Otis, 2011). В целом это приводит к изменению механической резистентности эритроцитов сусликов (Гулевский, Щенявский, 2014). Это означает, что деформируемость эритроцитов может зависеть от сезона года. Однако систематических исследований по изучению реологических и деформационных характеристик эритроцитов крови у периодически впадающих в спячку сусликов в современной литературе не обнаружено. В связи с этим целью нашей работы явился анализ параметров деформируемости эритроцитов и его связь с эритроцитарными индексами сусликов в разные сезоны года в активный период их жизни. В работе исследованы сезонные изменения реологических свойств эритроцитов сусликов методом эктацитометрии.

Установлено, что весной, после пробуждения сусликов, эритроциты имеют наибольшую деформируемость, наименьшую жесткость мембраны и высокую степень их водной проницаемости. Летом, по сравнению с весной, происходит снижение деформируемости, гидратированности и диапазона осмотической устойчивости эритроцитов, а также повышается жесткость мембран эритроцитов и снижается их водная проницаемость. Летом достоверно снижается средний объем эритроцитов. Осенью, перед погружением в зимнюю спячку, интегральная деформируемость эритроцитов возрастает относительно летнего периода, но водная проницаемость мембран остается сниженной, а микровязкость мембран остается значительно повышенной. Методом осмоскании при низком напряжении сдвига выявлены сезонные изменения анизотропии красных клеток крови в виде полимодальной формы их распределения в широком диапазоне осмоляльности среды.

Число эритроцитов в крови весной самое низкое. С весны до осени количество эритроцитов в крови имеет тенденцию к росту, а также увеличение объемной доли эритроцитов (гематокрита) в крови. Содержание Hb в крови весной самое низкое, а осенью достоверно возрастает (на 17,8%). Объем одного эритроцита (MCV), сниженный уже летом, остается пониженным осенью (на 5,8%). С весны до осени среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH) остается постоянным. Значение MCHC (среднее количество гемоглобина в эритроците) летом незначительно возрастает (4,2%) и остается повышенным осенью (3,7%). Показатель RDV-CV (процент распределения клеток по размеру) летом существенно не отличается весенних значений, но осенью достоверно возрастает относительно лета (5,9%). RDV-SD (разница между минимальным и максимальным объемом клеток) летом снижен (8,5%) по сравнению с весной, а осенью повышается до весенних значений. Обнаружена положительная корреляция между RBC и Hb, RBC и Hct, Hb и Hct. MCHC отрицательно коррелирует с MCV и RDW-SD. Также обнаружена положительная корреляция между MCV и RDW-SD, RDW-CV и RDW-SD.

Между параметрами деформируемости эритроцитов и их гематологическими показателями также обнаружены корреляционные связи. Важным является обнаруженная отрицательная корреляция между степенью гидратации клеток (O_{hyper}) и средней концентрацией гемоглобина в эритроците (МСНС).

Таким образом, нами впервые была обнаружена сезонная изменчивость деформируемости эритроцитов сусликов, согласующаяся с летней активностью животных и подготовкой к зимней спячке. Используемый в данной работе подход по анализу индекса деформируемости клеток при низких скоростях сдвига расширяет возможности лазерной эктацитометрии по оценке микровязкости клеточных мембран, поскольку именно изменение деформируемости мембран наиболее часто связано с физиологическими и патофизиологическими изменениями реологических свойств эритроцитов. Предлагаемые показатели существенно расширяют диагностический потенциал метода градиентной эктацитометрии.

Литература:

1. Dark, J. (2005). Annual lipid cycles in hibernators: integration of physiology and behavior. *Ann. Rev. Nutr.*, 25, 469-497.

2. Otis, J. P., Sahoo, D., Drover, V. A., Yen, C.-L. E., Carey, H. V. (2011). Cholesterol and lipoprotein dynamics in a hibernating mammal. *PLoS ONE*, 2011, 6(12), e2911115.

3. Gulevsky, A. K., Shchenyavsky, I. I. (2014). Seasonal changes in mechanical resistance of erythrocytes of the long-tailed ground squirrel (*Citellus undulates*). *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.*, 50(5), 364-368.

Работа поддержана Госзаданием № 075-152-22-00

Рецепция гравитационного поля клеткой: экспериментальные данные и возможный механизм

Огнева И.В.^{1*}

¹*Институт медико-биологических проблем РАН;*

iogneva@yandex.ru

Сила тяжести являлась одним из физических факторов, в условиях действия которого появилась и развивалась жизнь на Земле. Оставаясь постояннодействующей, эта сила оказывает существенное влияние на онтогенез всех видов и на некоторые аспекты жизнедеятельности человека. Поэтому покидание привычной среды обитания и пребывание длительное время, например, в условиях невесомости может приводить к негативным последствиям для здоровья и работоспособности человека, что существенно снижает возможности освоения дальнего космоса.

Клетка формируется в поле постояннодействующей силы тяжести. Соответственно, все внутриклеточные структуры должны иметь такие механические характеристики, чтобы именно в этом поле обеспечить поддержание формы и объема клетки. Также, скорость и направление метаболических процессов должны приводить к продукции достаточного количества макроэргов для осуществления всех процессов жизнедеятельности клетки в этом поле. Иными словами, структурно-функциональные возможности клетки «настроены» именно на то внешнее механическое поле, в котором эта клетка формировалась.

Однако, остается ключевой вопрос, каким образом одна и та же клетка воспринимает противоположные изменения внешнего поля, микрогравитацию и гипергравитацию. Иными словами, условный сенсор внешнего гравитационного поля должен иметь три модальности в зависимости от действующей силы тяжести: «E» состояние – та гравитация, в которой эта клетка сформировалась; «E+» состояние – гипергравитация относительно исходного состояния (если клетка была сформирована, например, в условиях невесомости, то сила тяжести Земли будет в этом случае гипергравитацией); «E-» состояние – состояние невесомости или микрогравитации относительно исходного состояния (для клетки, появившейся в условиях силы тяжести Земли, невесомость будет микрогравитацией; для клетки, сформированной, например, при вращении на центрифуге в условиях больше 1g, остановка центрифуги будет означать переход в «микрогравитационные» условия) (Ogneva I.V., 2022).

Такие условия, накладываемые на сенсор, ограничивают его выбор. Любое изменение поля внешней силы, в частности, силы тяжести, действующей на клетку, приведет к возникновению механической деформации. И действительно, при суборбитальном полете TEXUS-54 экспериментально было получено прямое свидетельство возникновения деформации – практически сразу было зафиксировано изменение формы клеток (Thiel CS et al., 2019).

Величина деформации объекта зависит от приложенной к нему силы и собственных механических характеристик объекта. Собственные механические свойства клеток определяются, в первую очередь, цитоскелетными структурами. Для клеток высших животных, имеющих развитую цитоскелетную сеть, большой интерес представляет концепция «tensegrity» (Ingber D.E. et al., 2014). Однако, в эволюционном ряду не все

клетки имеют развитый цитоскелет, пронизывающий всю клетку, но все клетки имеют мембрану и связанный с ней кортикальный цитоскелет. Именно этот барьер отделяет внутриклеточное содержимое от внешней среды и позволяет поддерживать гомеостаз объема и формы клетки. Проведенный систематический анализ возможных гравирецепторов у эукариот свидетельствует о различных путях ответа на изменение гравитационного стимула, но, практически всегда опосредованного цитоскелетом. Следует отметить, что в эволюционном ряду ортологи могут принадлежать к разным цитоскелетным структурам, что, соответственно, может обуславливать широкий спектр возможных гравирецепторов у разных видов.

Поэтому, можно предложить рассмотреть в качестве первичного механосенсора кортикальный цитоскелет и связанную с ним мембрану (Огнева I.V., 2022). Такой механосенсор может находиться в трех состояниях: недеформированное состояние, деформация растяжения или деформация сжатия при увеличении или уменьшении внешнего механического напряжения, например, при изменении силы тяжести. Следует отметить, что речь идет только о самых первых моментах изменения внешнего механического напряжения. Результаты математического моделирования и сопоставления с экспериментальными данными свидетельствуют о достаточной энергии деформации для диссоциации, например, от филаментов актина актин-связывающих белков.

Поскольку кортикальный цитоскелет неоднороден, то деформации растяжения и сжатия могут приводить к диссоциации различных белков. Например, при растяжении, могут диссоциировать белки, формирующие продольные структуры кортикального цитоскелета; при деформации сжатия – белки, заякоривающие цитоскелет к мембране. Эти белки могут сами играть сигнальную роль, могут взаимодействовать с участниками других сигнальных путей, приводя к изменению экспрессии генов-мишеней, регуляции трансляции и посттрансляционных модификаций, метаболических процессов в клетке. Кроме того, возможное изменение структуры цитоскелета может приводить к изменению проводимости ионных каналов, аффинности связывания сигнальных молекул, изменению локализации внутриклеточных структур (например, ядер или митохондрий). Все это вместе взятое приведет к формированию соответствующего адаптационного структурно-функционального паттерна клеток.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН 65.4.

Роль двунитевых разрывов ДНК в радиационно-индуцированном клеточном старении

Осипов А.А.^{1*}, Чигасова А.К.^{1,2}, Яшкина Е.И.^{1,3}, Игнатов М.А.^{1,3}, Федотов Ю.А.^{1,3}, Молодцова Д.В.³,
Воробьева Н.Ю.^{1,3}, Осипов А.Н.^{1,3}

¹Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва, РФ;

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, РФ;

³ФГБУ ГНЦ РФ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России,
Москва, РФ;

a-2-osipov@yandex.ru

Среди повреждений ДНК, наиболее критичными для дальнейшей судьбы клетки являются двунитевые разрывы ДНК (ДР ДНК). В результате некорректной репарации ДР ДНК возникают микроструктурные aberrации хромосом, а также различные цитогенетические нарушения. При этом невозможность репарации ведет к активации механизмов клеточной гибели или старению клеток.

Образующиеся во время репарации ДР ДНК сложные динамические микроструктуры, состоящие из сотен и тысяч копий белков участвующих/ассоциированных с процессом репарации, визуализируются после иммуноцитохимического окрашивания в виде ярких точек, и называются фокусами белков репарации.

Фокусы репарации ДНК, наблюдаемые как через 24 часа, так и через большее время после облучения получили в литературе название остаточных. Полагают, что они представляют из себя сайты репарации сложных, потенциально летальных ДР ДНК. Известно, что увеличение количества остаточных фокусов связано со снижением колониеобразующей способности. Причиной снижения клоногенного роста и выживаемости является не только гибель клеток, но главным образом потеря способности клеток к размножению, в том числе из-за клеточного старения (сенесценции). Однако особенности их пострадиационных количественных изменений и роль в процессах клеточной гибели и старения, до сих пор изучены недостаточно.

Целью данной работы было изучение взаимосвязи между изменениями количества остаточных фокусов репарации ДНК ключевых белков, участвующих в клеточном ответе на возникновение ДР ДНК (γ H2AX (сенсор), pATM (трансдуктор), 53BP1 (медиатор), p-p53 (эффектор)) и долей сенесцентных клеток в фибробластах человека через 24, 48 и 72 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 1-10 Гр.

Результаты исследований показали, что по количественному выходу остаточных фокусов исследованные белки можно расположить в порядке убывания $\gamma\text{H2AX} > 53\text{BP1} > \text{pATM} \geq \text{p-p53}$. С увеличением времени после облучения с 24 до 72 ч количество остаточных фокусов всех исследованных белков снижается. Это снижение можно объяснить несколькими параллельно идущими процессами: элиминацией высокоповрежденных клеток по механизмам апоптоза, аутофагии и т.д.; завершением процесса репарации ДНК и наконец снижением пролиферативной активности клеток, сопровождающееся уменьшением количества репликативных повреждений ДНК.

Воздействие рентгеновского излучения также приводило к дозозависимому увеличению доли стареющих SA- β -gal позитивных и покоящихся/стареющих Ki-67 негативных фибробластов. Облученные клетки в ответ на образование ДР ДНК активируют точки контроля клеточного цикла по ATM/ATR-сигнальному пути, обуславливая задержку или остановку клеточного цикла в определенных фазах клеточного цикла. При этом за повреждением ДНК и замедлением (остановкой) клеточного цикла не обязательно следует клеточное старение, так как не исключаются полная репарация или клеточная гибель. Между количеством остаточных фокусов и долей сенесцентных фибробластов в тот или иной исследованный интервал времени (24, 48 или 72 ч) после облучения отмечается положительная корреляционная зависимость. Однако если количество фокусов со временем после облучения уменьшается, то доля сенесцентных клеток, напротив увеличивается. По всей видимости сложные, трудные для процессов репарации ДНК повреждения запускают процесс радиационно-индуцированного старения, тогда как в сенесцентных клетках процесс репарации может продолжаться, что и ведет к снижению количества остаточных фокусов с увеличением количества времени после облучения, но увеличению доли сенесцентных клеток.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ №22-2400490.

Свойства композитных материалов на основе матриц полимеров боросилоксана, поли(лактид-ко-гликолида), фторопласта, функционализированных наночастицами оксидов металлов (цинка, железа, алюминия)

Бурмистров Д.Е.^{1*}, Симакин А.В.¹, Баймлер И.В.¹, Уваров О.В.¹, Иванов В.Е.¹, Чаусов Д.Н.¹, Гудков С.В.¹

¹*Институт общей физики имени А. М. Прохорова РАН, Москва, Россия ;
dmitriiburmistroff@gmail.com*

На сегодняшний день рассматривается возможность использования наночастиц (НЧ) металлов и оксидов металлов в качестве антибактериальных агентов, ввиду стремительно развивающейся бактериальной антибиотикорезистентности. Одним из многообещающих подходов является создание композитных материалов, в том числе, на основе полимеров, обеспечивающих возможность использования таких материалов в биомедицинских приложениях, пищевой промышленности, а также в бытовом использовании.

В ходе работы методом лазерной абляции были синтезированы наночастицы оксидов металлов (цинка, железа и алюминия). Максимумы распределений ζ -потенциала полученных коллоидных растворов НЧ составляли 20, 20, 50 мВ для НЧ оксида цинка, железа и алюминия, соответственно, что характеризовало коллоидные растворы НЧ как стабильные. Состав наночастиц был установлен при помощи энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDX), морфологию оценивали с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Наночастицы обладали необходимой химической чистотой. Было установлено, что наночастицы оксида цинка имеют стержнеобразную морфологию, а оксидов железа и алюминия сферическую. Средний гидродинамический диаметр НЧ оценивался с помощью динамического светорассеяния (DLS) и составлял около 55, 50 и 45 нм для НЧ оксида цинка, железа и алюминия, соответственно. Полученные НЧ были добавлены в полимеры поли(лактид-ко-гликолида) (ПЛГА) и боросилоксана (БС), а также политетрафторэтилена (ПТФЭ) с конечными концентрациями НЧ в образцах материалов 0,001, 0,01 и 0,1%. Для дальнейших исследований материалы были сформированы в пленки толщиной 700–900 мкм (для БС и ПЛГА) и 200 мкм для ПТФЭ. Морфологию поверхности материалов оценивалась с помощью атомно-силовой микроскопии. Было установлено, что поверхность образцов композитных материалов была бездефектной. С помощью модуляционно-интерференционной микроскопии было установлено, что наночастицы распределены в объеме полимеров в виде кластеров, размер которых увеличивался с ростом концентрации НЧ. Было показано, что все полученные наноконкомпозиты проявляли бактериостатические свойства в отношении *E. coli*. Важно отметить, что данный эффект был обнаружен даже при использовании композитов с минимальной концентрацией НЧ оксида цинка и железа в составе (0,001%), однако значимые различия при культивировании в контакте с композитами, содержащими НЧ оксида алюминия, наблюдались при концентрации данных НЧ в полимере 0,01 и 0,1%.

Композитные материалы способствовали формированию АФК в водных растворах (перекиси водорода и гидроксильных радикалов). Было также установлено, что полученные материалы способствовали образованию долгоживущих реактивных форм белков и 8-оксогуанина в ДНК. Композитные материалы на основе НЧ оксида алюминия проявляли активность слабее по сравнению с материалами, содержащими наноразмерные оксиды железа и цинка. В свою очередь, проведенные исследования цитотоксичности материалов в отношении эукариотических клеток показали, что поверхность пленок композитных материалов как на основе ПТФЭ, БС и ПЛГА, содержащих НЧ, подходила для роста и развития данных клеток. Ввиду низкой цитотоксичности и бактериостатическим свойствам полученные композитные материалы представляют большой интерес в качестве упаковки и создания покрытий для пищевой промышленности, сухого дезинфицирующего средства, а также в качестве компонентов и покрытий для биомедицинского применения.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации на крупных научных проектах по приоритетным направлениям научно-технического развития (грант № 075-15-2020-775).

Сопряжение обесцвечивания красителей и экзоэлектрогенной активности *Shewanella oneidensis* MR-1 при электростимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы

Самков А.А.^{1*}, Чугунова Ю.А.¹, Круглова М.Н.¹, Волченко Н.Н.¹, Худокормов А.А.¹, Карасёва Э.В.¹
¹ФГБОУ ВО "Кубанский государственный университет";
andreysamkov@mail.ru

Обнаружено влияние полярности электрической стимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы, а также иммобилизации на аноде клеток *Shewanella oneidensis* MR-1, содержащих ген пероксидаз класса Дур, на скорость обесцвечивания красителей разных типов. Экспериментальная модель представляла собой микробный топливный элемент (МТЭ) мембранного двухкамерного воздушнокатодного типа, к электродам которого подключали внешний источник тока и напряжения, в различной полярности, либо резистор. В анодную камеру вносили в разных концентрациях красители, отслеживая динамику снижения поглощения, а также бактериальные клетки. Для красителя трифенилметанового кристаллического фиолетового максимальная скорость обесцвечивания суспендированными клетками *S. oneidensis* MR-1 составила $2,05 \pm 0,07$ мкМ/ч и наблюдалась при подключении источника постоянного напряжения 1,2 В прямой полярности, то есть положительный полюс ионистора был подключен к катоду МТЭ, имеющему аналогичный знак заряда. Минимальные скорости наблюдались в случае обратной полярности подключения. При иммобилизации клеток *S. oneidensis* MR-1 на аноде удельная скорость обесцвечивания была выше, достигая $2,91 \pm 0,09$ мкМ/ч и не снижалась при повышении концентрации субстрата. Наименьшие показатели также были отмечены для обратного подключения источника напряжения. При обесцвечивании азокрасителя конго красного, максимальные значения скорости отмечены для источника с прямым подключением ионистора и при разомкнутой цепи ($0,26 \pm 0,01$ и $0,29 \pm 0,02$ мкМ/ч соответственно), минимальное значение $0,11 \pm 0,02$ мкМ/ч наблюдали для обратного подключения. Для продуктов биоэлектрокаталитического обесцвечивания кристаллического фиолетового было обнаружено значительное снижение интенсивности главного пика поглощения, соответствующего полосе 590 нм, практически без гипсохромного сдвига. О качественных изменениях состава продуктов обесцвечивания говорит появление, для варианта с прямой полярностью подключения ионистора, нового максимума поглощения в районе 360 нм.

Таким образом, при обесцвечивании трифенилметанового красителя кристаллического фиолетового и азокрасителя конго красного культурой *S. oneidensis* MR-1 в анаэробных условиях анодной камеры биоэлектрохимической системы было обнаружено влияние полярности подключения к электродам внешнего источника тока и напряжения. Увеличение удельной скорости реакции при ступенчатом повышении концентрации субстрата было отмечено для вариантов опыта, где происходила поляризация электродов, как естественная, до 0,59 В, за счёт электрогенеза *S. oneidensis* MR-1, так и более выраженная искусственная – в условиях положительной стимуляции источником постоянного тока и напряжения (ионистора) 1,2 В прямого подключения (отрицательный полюс к аноду, положительный – к воздушному катоду). При обратном подключении источника напряжения положительным полюсом к аноду во всех случаях наблюдалось снижение удельной скорости обесцвечивания, как для кристаллического фиолетового, так и для конго красного, что сопровождалось характерным повышенным расходом электрического заряда используемого в качестве источника тока и напряжения ионистора. Иммобилизация клеток на поверхности анода значительно усиливала скорость обесцвечивания кристаллического фиолетового, по сравнению с суспендированными клетками, при этом негативный эффект обратного подключения ионистора сохранялся. Таким образом, искусственная внешняя поляризация электродов биоэлектрохимической системы позволяла как положительно, так и отрицательно

влиять на осуществляемые электрогенной культурой реакции, приводящие к обесцвечиванию красителей разных типов в анаэробной среде анодной камеры. Эффект стимулирования или ингибирования обесцвечивания проявлялся в условиях низкого окислительно-восстановительного потенциала анодной камеры биоэлектрохимической системы. За счёт естественной поляризации поверхности электродов (разомкнутая цепь и резистор 1 КОм) или, что более выражено, при положительной стимуляции ионистором прямого подключения, могло происходить ускорение процесса N-деметилования, расщепления одного из ароматических колец и иных ключевых реакций обесцвечивания.

Спектральные свойства сывороточного альбумина под действием электрического поля высокой напряженности 50 Гц

Дадашов М.З.^{1*}

¹Институт Биофизики, НАН Азербайджана;
mursald@mail.ru

Эффекты воздействия на здоровье человека низкочастотных ЭМП, в том числе промышленной частоты 50 Гц, исследуются уже много лет. И настоящее время в научной литературе накоплены многочисленные эпидемиологические, экспериментальные и клинические данные, свидетельствующие, как о негативном, так и стимулирующем влиянии на здоровье человека. Указаны, что нервные, иммунные, сердечно-сосудистые и репродуктивные системы более уязвимы к их воздействию. Известны также многочисленные работы, в которых показаны изменения физико-химических свойств различных типов биосистем при воздействии низкочастотных электромагнитных полей. По мнению ВОЗ, в настоящем времени, на фоне факта безусловной реакции организма человека на воздействие низкочастотных ЭМП, в полной мере нет ясности ни по возможным последствиям, ни по общепринятым критериям безопасности в условиях долговременного воздействия современных ЭМ источников.

Сывороточный альбумин составляет основную часть сыворотки крови, выполняет важные функции, поддерживает осмотическое давление крови, осуществляет транспорт эндогенных и экзогенных веществ, а также является белковым резервом организма.

Целью данной работы было исследование спектров ультрафиолетового поглощения бычьего сывороточного альбумина после воздействия электрического поля высокого напряжения 20 кВ/м. Образцы белка с концентрацией 30 мг/мл в дистиллированной воде, подвергали воздействию ЭП в течении 2 часов. Электрическое поле формировалась с помощью лабораторного трансформатора И-50 (Россия). Спектры оптической плотности альбумина регистрировали на двухлучевом спектрофотометре SpeKord 250 (Германия), с 10 кратным разбавлением образцов, в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см в диапазонах длин волн 200–370 нм, со спектральной шириной щели 1 нм, шагом сканирования 1 нм. Скорость сканирования 10 нм/сек. Измерения проводили с 3 кратным повторением. Спектры были обработаны с использованием программы OriginPro 8.5.

УФ-спектры поглощения белков существенно зависят от ближнего и внешнего окружения поглощающей молекулы и позволяют получать информацию о свойствах макромолекул и их взаимодействиях с другими молекулами. В зависимости от непосредственного окружения одной и той же хромофорной группировки положение максимума поглощения в УФ-спектрах может меняться.

После сглаживания спектров на контрольных образцах найдены пять максимумов с определенными сдвигами в положениях 207, 222, 232, 279 и 315 нм. Опытные образцы показали примерно близкие максимумы, однако во всех положениях наблюдалось ~ на 34, 28, 18, 13 и 75 % уменьшения соответственно. Из литературных источников известно, что плечо в спектре молекулы белка при 200–210 нм соответствует слабоинтенсивному электронному переходу $n \rightarrow \pi^*$, слабовыраженные полосы поглощения при 220 нм ($n \rightarrow \pi^*$) относят к пептидным группам, смещающиеся при увеличении полярности растворителя в коротковолновую область. Вторичная структура, создаваемая посредством водородных связей, определяет спектральные свойства макромолекул белков в зависимости от типа укладки цепи, протяженности и доли этой укладки, а также физико-химических параметров среды. Пептидные связи интервале от 230 до 320 нм практически не поглощают волны, что дает возможность исследовать взаимосвязь структурных и спектральных свойств белков, в том числе альбумина, анализируя спектров поглощения хромофорных радикалов фенилаланина, тирозина, триптофана, гистидина, цистеина, метионина и цистина.

Получения вторичных производных спектров добавило еще 4 максимума к имеющимся, однако интенсивность максимумов в опытных образцах была ниже по сравнению с контрольными образцами.

Интерпретируя полученные данные, можно констатировать, что ЭП с интенсивностью 20 кВ/м частотой 50 Гц определенным образом влияет на структурную организацию, наблюдаемую в виде изменения

спектральные свойств белковых макромолекул. Другими словами, одними из первичных мишеней низкочастотных ЭМП могут быть белковые структуры живых организмов. Данное исследование может быть полезным при изучении структурных консервативностей белковых молекул в нативном состоянии а также при оценке границ variability влияния.

Спиновая подсистема молекул воды отвечает за динамику изменения ее физико-химические свойств

Дроздов А.В.^{1*}
¹ИАП РАН;
da@biophys.ru

Ранее в работе [1] при исследовании физико-химических свойств воды было выявлено, что физические характеристики воды подчиняются определенным закономерностям. Во всех экспериментах, независимо от используемого метода молекулярно-структурного анализа (ИК-спектроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния, кондуктометрия, СВЧ-радиометрия, ЯМР в магнитном поле Земли и др.), наблюдались близкие по значению периоды колебаний измеряемых величин (в наших экспериментах анализировались периоды от 1 до 60 мин).

С одной стороны, для того чтобы в молекулярной системе наблюдался колебательный суммарный эффект межмолекулярных преобразований, необходима синхронизация переходов между различными состояниями молекул. Прежде всего, необходимо добиться, чтобы эти переходы совершались во всех молекулах среды (или большей ее части) одновременно, синфазно.

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

В нелинейных колебательных системах внешнее периодическое воздействие в общем случае может приводить не только к возбуждению вынужденных или параметрических колебаний, но и к динамической стабилизации состояний равновесия, которые в отсутствие внешнего воздействия либо были абсолютно неустойчивыми, либо вообще отсутствовали.

Широко известным и изученным примером таких систем является физический маятник с вибрирующей точкой подвеса, который может стабилизироваться в состоянии равновесия с центром тяжести выше точки подвеса. Из публикаций в отечественной литературе следует выделить работу П.Л.Капицы [2], в которой при использовании метода приближенного решения был использован способ осреднения, имеющий простой физический смысл, а именно: действие механической вибраций приводит к возникновению дополнительного («виброгенного») момента и, следовательно, к изменению потенциальной энергии маятника. Механические системы с возможностью виброгенной стабилизации в неустойчивом состоянии равновесия в отечественной научно-технической литературе получили название маятников Капицы.

Явления, родственные динамической стабилизации состояний равновесия механических систем под действием вибраций, в настоящее время привлекают к себе пристальное внимание как экспериментаторов, так и теоретиков, работающих в различных областях современной науки и техники (физика твердого тела, гидродинамика, химия, биология, генетика, ускорители элементарных частиц и др.).

В работе [3] было установлено, что в аморфном магнетике со слабым случайным анизотропным беспорядком за счет последнего может появляться выделенное направление вектора ферромагнетизма, то есть влияние беспорядка оказывается аналогичным влиянию вибраций точки подвеса в маятнике Капицы. Весьма интересный результат был получен в работе [4]. Анализ состояния равновесия в колебательных системах из одной и двух магнитных стрелок в присутствии осциллирующего поля показал, что в определенном интервале изменения амплитуды и направления осциллирующего поля система из двух магнитных стрелок обладает двумя динамически стабилизируемыми состояниями равновесия.

В своих ЯМР экспериментах по изучению динамики протонной плотности водных образцов [1], мы получили результаты, которые могут быть соотнесены с описанными выше явлениями динамической стабилизации состояний равновесия. Наблюдаемое квазигармоническое изменение интенсивности ЯМР сигнала (интенсивность=протонная плотность) указывает именно на изменение соотношения орто- и пара-молекулы в образце. Спины протонов воды являются теми самыми магнитными стрелками в постоянно осциллирующем магнитном поле Земли, действие которого и приводит к наблюдаемой динамике протонной плотности. В пользу последнего как раз говорят факты «частичной корреляции» между напряженностью магнитного поля Земли и протонной плотностью.

На наш взгляд, динамика спиновой подсистемы воды весьма неплохо согласуется с двухкомпонентной моделью воды, нашедшей широкое распространение в различных биофизических моделях. Роль спиновых изомеров воды была предложена С.М.Першиным [5] и заключается в том, что механизм, отвечающий за изменения межмолекулярного взаимодействия в воде, связан с орто- и пара-молекулами воды. Различие во вращательных степенях свободы этих молекул приводит к различному характеру их взаимодействия как друг с другом, так и в кластерах. Эта идея становится своего рода физической основой двухструктурной модели воды и связанной с ней структурной динамикой.

[1] Дроздов А.В., Нагорская Т.П. Квазипериодический характер межмолекулярных взаимодействий в воде – Биофизика, 2014, т.59, №6, с.1195 (www.biophys.ru/archive/h2o-00034.pdf)

[2] Капица П.Л. Маятник с вибрирующим подвесом. – УФН, 1951, т. 44, №1, с. 7.

[3] Фомин И.А. Эффект маятника Капицы в аморфном магнетике со слабым беспорядком. – Письма в ЖЭТФ, 2007, т 85, в. 9, с. 533.

[4] Лисовский Ф.В., Мансветова Е.Г. Виброгенные состояния равновесия в системах магнитных стрелок. - Нелинейный мир, № 2, Т.7, 2009, с.118.

[5] Pershin S.M. Two-liquid water. – Physics of Wave Phenomena, 2005, Vol. 13. №4, 2005, p. 192

Транскраниальная электротерапия как метод коррекции нарушений ритма сердца у пациентов с инфарктом миокарда

Сорокина Е.А.^{1,3}, Каде А.Х.¹, Трофименко А.И.^{1,2,3*}

¹Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия;

²Кубанский государственный технологический университет, Краснодар, Россия;

³Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В.

Очаповского, Краснодар, Россия;

artemtrofimenko@mail.ru

Разработка новых, безопасных и патогенетически обоснованных, немедикаментозных методов профилактики и лечения нарушений ритма сердца (НРС) развившихся после проведения чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (ЧТКА) со стентированием в ходе лечения пациентов с инфарктом миокарда (ИМ) является актуальной задачей современной кардиологии.

Одним из перспективных способов решения вышеуказанной проблемы является транскраниальная электротерапия импульсным током (ТЭС-терапия), так как в ряде исследований на моделях ишемии миокарда метод корригировал неспецифическое воспаление и оксидативный стресс, предупреждал негативное влияние катехоламинов на сердце.

ТЭС-терапия – метод неинвазивной электростимуляции биполярным импульсным током с частотой 77,5 Гц и плотностью протекания тока через структуры антиноцицептивной и стресс-лимитирующей системы ствола головного мозга 0,01-0,05 мА / см².

Цель: изучить эффективность ТЭС-терапии при коррекции НРС, развившихся после проведения ЧТКА со стентированием, в ходе лечения пациентов с ИМ.

Материалы и методы:

Критерии включения: мужчины и женщины в возрасте от 35 до 75 лет с Q-позитивным и Q-негативным ИМ; проведение ЧТКА со стентированием; развитие НРС после ЧТКА со стентированием; подписание добровольного информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии исключения: дебют острого инфекционного заболевания в период госпитализации; фракция выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) ≤ 28%; кома; проведение системной тромболитической терапии; отказ от участия в исследовании на любом этапе.

Характеристика групп пациентов: группа 1 (n = 17, сравнения) – пациенты с ИМ после ЧТКА со стентированием, стандартное лечение; группа 2 (n = 21, основная) – пациенты с ИМ после ЧТКА со стентированием, стандартное лечение и применение ТЭС-терапии.

Контрольные точки исследования: 1-е сутки – ЭКГ, ЭхоКГ, КФК, КФК-МВ, Тропонин I, калий, β-эндорфин; 5-е сутки – то же, но без ЭхоКГ; 10-е сутки – то же и ЭКГ с определением гармоничности и кванта электромагнитного потока кардиоцикла.

ЧТКА выполняли с использованием стентов Promus Premier (Boston Scientific, Ирландия).

ТЭС-терапия проводилась с помощью двухпрограммного электростимулятора «ТРАНСАИР-03» (ООО «Центр транскраниальной электростимуляции», Санкт-Петербург). Использованы следующие параметры электростимуляции: импульсный биполярный режим, фронто-мастоидальное наложение электродов, сила тока 2

мА, частота тока 77,5 Гц, продолжительность сеанса 45 мин. Всего пациентам из основной группы, начиная с 1-го дня госпитализации, проведено 10 процедур, с частотой 1 сеанс в сутки.

Результаты:

На начало исследования в группах наблюдалось примерно равное количество пациентов с фибрилляцией предсердий (ФП) и желудочковой экстрасистолией (ЖЭ) ($p = 0,7446$), на 5-е сутки – в группе сравнения у 59% ($n = 10$) и в основной группе у 5% ($n = 1$) наблюдались НРС с превалированием ФП.

На 10-е сутки исследования в группе сравнения у 24% ($n = 4$) сохранялась ФП, при этом в основной группе у всех пациентов восстановился синусовый ритм.

В ходе системного анализа ЭКГ на 10-е сутки исследования у всех пациентов выявлены отклонения от нормальных значений гармоничности – 1,309 у.е. и величины кванта электромагнитного потока кардиоцикла – 0,246 с*мВб.

У пациентов основной группы отмечено приближение исследуемых параметров кардиоцикла к оптимальным значениям, при этом межгрупповые различия по гармоничности ($p = 0,002$) и величине кванта электромагнитного потока кардиоцикла ($p = 0,001$) являются статистически значимыми.

На начало исследования между исследуемыми группами по показателям КФК, КФК-МВ, ТР-I и β -эндорфина статистически значимых различий не выявлено ($p > 0,05$).

В ходе анализа концентрации калия, при проведении как парных межгрупповых сравнений по контрольным точкам исследования, так и в динамике внутри исследуемых групп статистически значимых различий не выявлено ($p > 0,05$).

При этом при проведении по показателям КФК, КФК-МВ и ТР-I как парных межгрупповых сравнений на 5-е и 10-е сутки исследования, так и сравнений в динамике внутри исследуемых групп выявлены статистически значимые различия ($p < 0,05$) свидетельствующие о более низком уровне маркеров альтерации миокарда на фоне применения ТЭС-терапии. На 10-е сутки исследования у всех пациентов активность КФК, КФК-МВ практически возвращается в диапазон нормальных значений.

На фоне применения ТЭС-терапии содержание высокочувствительного тропонина-I статистически значимо ($p = 0,0042$) меньше на 109 %, чем в группе сравнения.

На 5-е сутки, на фоне применения ТЭС-терапии в группе 2, концентрация β -эндорфина была выше на 38,3 %, чем в группе сравнения ($p < 0,05$).

На 10-е сутки в основной группе сывороточная концентрация β -эндорфина была выше на 35,0 %, чем в группе сравнения ($p < 0,05$).

В ходе внутригруппового анализа в группе сравнения выявлено статистически значимое падение концентрации β -эндорфина на 42,4 % ($p < 0,05$), при этом в основной группе статистически значимых изменений по данному показателю не выявлено ($p > 0,05$).

Заключение: Применение ТЭС-терапии у пациентов с НРС после проведения ЧТКА со стентированием в связи с ИМ, к 10-м суткам исследования сопровождается тенденцией к регрессу НРС, нормализации гармоничности и величины кванта электромагнитного потока кардиоцикла, падением уровня высокочувствительного тропонина-I, что свидетельствует в пользу кардиопротективного и антиаритмического потенциала ТЭС-терапии. Вышеназванные позитивные изменения наблюдаются на фоне стабилизации сывороточной концентрации β -эндорфина, что свидетельствует об участии опиоидергической системы в механизме терапевтического эффекта ТЭС-терапии и косвенно подтверждается данными экспериментальных исследований на моделях ишемии миокарда.

Транспорт ионов хлора через плазматическую мембрану ооцитов миноги (*Lampetra fluviatilis*)

Шерстобитов А.О., Чеботарева М.А., Шуколюкова Е.П., Никитина Е.Р.*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им.И.М.Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия;
elena.nikitina@bk.ru

Проницаемость изолированных ооцитов речной миноги *Lampetra fluviatilis* для хлора в преднерестовый период их жизненного цикла (декабрь-май) охарактеризована с использованием радиоактивного изотопа ^{36}Cl . При физиологической внешней концентрации $[\text{Cl}^-]_o$ 150 ммоль/л установившееся равновесие показателя соответствует внутриклеточной концентрации $[\text{Cl}^-]_i$ 10,5 ммоль/л клеток в декабре и 18,6 ммоль/л клеток в апреле, с периодом полуабсорбции хлорида около 20 мин. Коэффициент проницаемости для Cl^- увеличился с $1,5 \times 10^{-6}$ см/с (при 5°C) в декабре до $7,5 \times 10^{-6}$ см/с (при 10°C) в мае. Поступление хлоридов линейно зависело от $[\text{Cl}^-]_o$ (0–150 ммоль/л) и зависело от температуры с энергией активации 24 кДж/моль при 5–20°C. Деполяризация плазматической мембраны в средах с высоким содержанием K^+ в присутствии валиномицина стимулировала

приток Cl⁻ примерно в 2,5 раза. Снижение тонуса среды примерно на 50% приводило к 3-кратной активации поступления Cl⁻ по сравнению с изотоническими условиями. Воздействие на клетки 0,1-0,2 ммоль/л Cu²⁺ и 0,2 ммоль/л Cd²⁺ вызывало заметное ускорение поступления Cl⁻, а воздействие 0,2 ммоль/л Pb²⁺, 0,2 ммоль/л Zn²⁺ и 0,15-5,0 ммоль/л (Ca²⁺ + Mg²⁺) не влияли на клеточную мембрану. Обработка клеток высокой концентрацией ионофора A23187 в присутствии 5 ммоль/л Ca²⁺ для повышения уровня внутриклеточного кальция также оказалась неэффективной. Чувствительный к буметаниду котранспорт Na-K-2Cl обеспечивал менее 5% общего поступления Cl⁻. В апреле Cu²⁺ вызвал примерно 4,5-кратное увеличение чувствительного к амилориду компонента притока Na⁺ (22Na), что, скорее всего, представляло собой обменный механизм Na/H. Полученные результаты свидетельствуют о наличии канала-опосредованного механизма входа Cl⁻ в плазматическую мембрану ооцитов миноги.

Литература:

Amazing chloride channels: an overview / Nilius B., Droogmans G.// Acta Physiol Scand. - 2003. – Vol.177. - № 2. - P. 119-147.

Работа выполнена в рамках Госзадания 075-152-22-00

Усиление биологического действия ионизирующего излучения с помощью наночастиц золота

Морозов В.Н.^{1*}

¹ИБХФ РАН;

morozov.v.n@mail.ru

Лучевая терапия используется для радикального и паллиативного лечения широкого спектра новообразований, а также заболеваний неопухолевой природы. Однако несмотря на интенсивное развитие этого метода, все еще существует значительный потенциал для повышения эффективности лучевого лечения: радиорезистентность некоторых видов опухолей и дозовая нагрузка на окружающие нормальные ткани могут существенно ограничивать применение лучевой терапии. Добиться увеличения эффективности облучения позволяют различные способы модификации радиочувствительности клеток, в частности, использование химических радиомодификаторов (в первую очередь радиосенсибилизаторов).

В последнее время внимание в этом качестве привлекают продукты нанотехнологий. Так, многообещающим классом противоопухолевых радиосенсибилизаторов являются наночастицы, содержащие в своем составе элементы с высоким относительно мягких биологических тканей атомным номером. В качестве примера можно привести металлические наночастицы на основе серебра или платины, а также частицы более сложных составов, например оксидов металлов (HfO₂, V₂O₃ и другие). Однако благодаря своим физико-химическим свойствам, контролируемой биосовместимости, низкой токсичности, широким возможностям синтеза и модификации функционального дизайна, наиболее привлекательными и широко изучаемыми являются наночастицы золота.

В настоящем сообщении резюмированы основные результаты исследования возможностей усиления воздействия ионизирующего излучения на биологические объекты с использованием золотых наночастиц. В частности, предложены принципы подбора оптимальных параметров наночастиц под заданные условия облучения. Продемонстрированы экспериментальные результаты исследования радиосенсибилизирующего действия наночастиц золота на различных биологических системах: растворах биомакромолекул, культурах опухолевых клеток и лабораторных животных с перевиваемыми опухолями. Полученные данные свидетельствуют, что препараты на основе наночастиц золота могут быть весьма привлекательны для использования в комбинации с лучевой терапией для ряда онкологических заболеваний. Кроме того, впервые показано, что сочетанное использование наночастиц золота и рентгеновского облучения позволяет значительно повысить эффективность инактивации вирусных частиц, что также весьма перспективно для задач радиационной стерилизации и обработки.

Ферроптоз зависит от перекисного окисления липидов в митохондриях

Лямзаев К.Г.^{1,2*}, Аветисян А.¹, Симонян Р.¹, Черняк Б.¹

¹МГУ, НИИ ФХБ им. Белозерского;

²Российский клинический научный центр геронтологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.

Пирогова;

Lyamzaev@gmail.com

Ферроптоз, это регулируемая форма некротической гибели клетки, которая зависит от катализируемого ионами железа перекисного окисления липидов (ПОЛ). Роль митохондрий в ферроптозе не выяснена. Мы показали, что ферроптоз в фибробластах, вызванный ингибитором транспорта цистина эрастином или ингибитором биосинтеза глутатиона бутионсульфоксимином (БСО) можно предотвратить с помощью митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1. Измерения ПОЛ в митохондриях с помощью нового флуоресцентного радиометрического зонда MitoCLOx показали, что защитное действие SkQ1 коррелирует с предотвращением митохондриального ПОЛ, но не с накоплением активных форм кислорода (АФК) в клетке. Метиленовый синий, окислительно-восстановительный агент, ингибирующий продукцию АФК в комплексе I цепи переноса электронов, также ингибирует ферроптоз и митохондриальное ПОЛ, не снижая общий уровень АФК. Эти данные указывают на ведущую роль митохондриального ПОЛ при ферроптозе. В изолированных митохондриях сердца в присутствии ионов двухвалентного железа и NAD⁺-зависимых субстратов дыхания, ингибитор комплекса I ротенон стимулирует ПОЛ. В то же время, продукция АФК в комплексе III в присутствии сукцината и антимицина не вызывает ПОЛ. SkQ1 и метиленовый синий ингибируют ротенон-зависимое ПОЛ в изолированных митохондриях. Мы предполагаем, что АФК, образующиеся в комплексе I, способствуют митохондриальному ПОЛ и ферроптозу.

Физико-химические факторы влияния низкотемпературной плазмы атмосферного давления на одноклеточный организм *Paramecium caudatum*

Карпущина О.В.^{1*}, Груздев Г.А.¹, Савинов В.П.¹, Якунин В.Г.¹, Иноземцев А.Н.¹, Тимошенко В.Ю.^{1,2}, Каменский А.А.¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;

²Национальный исследовательский ядерный университет, Московский инженерно-физический институт;

karpukhina.msu@yandex.ru

Нами были исследованы эффекты влияния низкотемпературной плазмы атмосферного давления, генерируемой плазмотроном в инертном газе (аргон, гелий) и в смеси аргона и воздуха, на культуру клеток *Paramecium caudatum* [Карпущина и др.; 2018; Savinov et al., 2019; Груздев и др., 2021]. Плазмотрон представляет собой высокоресурсный источник дугового разряда [Рябый и др., 2017], работающий при атмосферном давлении с постоянным напряжением дуги на уровне 20-40 В; расход инертного газа, обдувающего вольфрамовый катод, был равен 2 л/мин., расход подаваемого в технологический канал воздуха составлял 10 л/ мин., электрический ток дуги был равен 50 А. Оригинальная конструкция плазматрона обеспечивает выход в окружающий воздух сверхчистой плазменной струи, практически свободной от частиц металла электродов. Для исследования влияния плазмы на биологическую систему, клетки *Paramecium caudatum* оказались подходящим тест - объектом для быстрого комплексного анализа одновременного воздействия таких физико-химических факторов как излучения разного типа и потока активных радикалов O, N, OH-, NO-, NO₂-, O₂(1Δg). Даже при использовании чистых плазмообразующих инертных газов, в плазменную струю, распространяющуюся за пределами разрядного промежутка, попадают частицы, содержащие O и N, вследствие их диффузии в струю из окружающего воздуха. Поскольку *Paramecium caudatum* – одноклеточный организм, свободнодвижущийся в водной среде, то в момент обработки плазмой большинство клеток находилось не на поверхности среды (h=7мм) в микропробирке (d=10мм), а двигались по всему объему; максимально допустимое удаление клеток от среза сопла источника плазмы составляло 20 см; значения температуры плазмы фиксировались на уровне 28-30° С. Время экспозиции плазмы на клетки варьировали от 0,5 до 5 мин.

Одним из потенциально значимых факторов воздействия плазмы на *Paramecium caudatum* оказалось изменение ионного состава водной среды, в которой находились клетки. Степень изменения pH среды зависела от состава плазмы и от времени её воздействия. Результатом действия плазмы инертных газов стало слабое

понижение pH водного раствора с клетками, при этом более заметный эффект отмечался для аргоновой плазмы. После обработки микропробирки с клетками плазменной струей, при плазмообразующей смеси (Ar + воздух), отмечалось существенное уменьшение pH водной среды (на 2,5 от исходных 6,5-7), что приводило к серьезным нарушениям движения *Paramecium caudatum* в начальные 30 мин, клетки двигались замедленно или вращались на месте. Двигательная активность *Paramecium caudatum* формируется на основе работы ионных каналов, встроенных в мембрану специальных органов движения – ресничек. В кислой среде происходит деполяризация мембран, что влечет уменьшение амплитуды биения ресничек, снижение скорости и реверсивного движения клеток. Дополнительно к двигательным нарушениям через сутки у большинства клеток, подвергшихся 3 мин. и 5 мин. обработке плазмой, появились значительные морфологические изменения, характерные для апоптоза, такие как расслоение мембраны, вакуолизация и фрагментация цитоплазмы перед дегенерацией. Реакции наблюдаемых нами клеток являются следствием влияния долгоживущих активных форм кислорода и азота (NO, O, OH, ONOO⁻, O₂(1Δg)), которые переносятся из плазменной среды в водную среду. Используемый нами источник плазмы с дуговым разрядом постоянного тока в плазмообразующем инертном газе создаёт в среднем концентрации радикалов NO и OH не менее 500 ppm, и таким образом при воздействии струи плазмы в витальной среде *Paramecium caudatum* запускаются окислительно-восстановительные процессы с образованием концентраций пероксида водорода, критических для нормального функционирования клеток.

Кроме того, присутствие свободных радикалов в среде нарушало воспроизводство *Paramecium caudatum*, что свидетельствовало о воздействии плазмы на ядерный аппарат клеток, при этом наиболее выраженный эффект последствия плазмы (72 часа) на размножение *Paramecium caudatum* отмечался в случае применения гелия или смеси аргона с воздухом.

Потенциальная эффективность воздействия низкотемпературной плазмы на микроорганизмы демонстрирует возможность её широкого использования, например, для очистки воды от биозагрязнений или обработки инструментов медицинского назначения.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (тема № 121032500080-8) и Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект».

Функционализированные полидофамином композитные фототермические скаффолды для комплексной модуляции клеточной активности

Райхман Е.В.^{1*}, Канев И.Л.¹, Кочеткова О.Ю.¹, Антонова О.Ю.¹
¹*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;*
elenaraikhman@ya.ru

Поиск неинвазивных дистанционных способов модуляции клеточной активности является актуальным направлением в различных областях биомедицины. В частности, управление направленной дифференцировкой и трансдифференцировкой стволовых клеток представляет несомненный интерес для регенеративной медицины. Одним из подходов для модуляции активности клеток является фототермическое воздействие, которое уже нашло применение в клеточной терапии и тканевой инженерии [1]. Фототермические скаффолды представляют собой объемные конструкции либо поверхности, модифицированные компонентами, способными поглощать свет с соответствующей длиной волны, преобразуя световую энергию в тепло. Такие материалы хорошо зарекомендовали себя в области гипертермической абляции опухолевых клеток и контролируемой доставки экзогенных биоактивных молекул. В то же время еще одним перспективным направлением является разработка комплексных подходов нанотопологической (обусловленной ультраструктурой поверхности) и фототермической стимуляции клеточной активности [2]. В данном сообщении представлены результаты работы по разработке композитных фототермических скаффолдов из ориентированных в одном направлении полиамидных нановолокон, близких по диаметру к компонентам внеклеточного матрикса (~100 нм). Для реализации фототермического воздействия волокна покрывали пленкой свет-конвертирующего биополимера полидофамина (ПД). Технология получения покрытия позволяет варьировать плотность нанесения ПД на волокна. Используя для модификации волокна с разным диаметром нами были получены композитные материалы с различной архитектурой и разной толщиной полидофаминового (ПД) покрытия. Величина нагрева подложек при облучении зависела от плотности ПД покрытия и достигала 79°C при облучении ближним ИК излучением с длиной волны 808 нм и интенсивностью 3 Вт/см² на воздухе. Эффективность фотоконверсии волокнистых материалов, функционализированных ПД, оказалась значительно выше, чем при использовании для покрытия подложки термоплазменных наночастиц сульфида меди [2]. Полученные скаффолды не имели цитотоксического эффекта при культивировании клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, выбранной в качестве модельного объекта для исследования нейрогенности материала и его способности воздействовать на процесс дифференцировки клеток.

Культивирование на поверхности композитных нановолокон инициировало направленный рост отростков клеток в отсутствие дифференцирующих факторов. Изменение внутриклеточной температуры, определенное методом флуоресцентной термометрии, составило $15,6 \pm 2,3^\circ\text{C}$ при облучении с интенсивностью 3 Вт/см^2 в течение 5 мин. Ранее было показано, что внутриклеточный нагрев в данном диапазоне оказывает стимулирующее воздействие на дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток [3]. Также мы показали, что фототермический нагрев ПД-модифицированных скаффолдов инициирует высвобождение ионов кальция, а следовательно позволяет дистанционно осуществлять нейромодуляцию. Полученные результаты указывают на возможность осуществления комплексного стимулирующего воздействия фототермического нагрева и архитектуры подложки на рост, пролиферацию и дифференцировку клеток.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00519, <https://rscf.ru/project/23-25-00519/>

1. Yangcui Qu et al. Photothermal scaffolds/surfaces for regulation of cell behaviors. *Bioactive Materials*, 2022, 8, pp. 449-477.

2. Antonova OY, Kochetkova OY, Kanev IL. Light-to-Heat Converting ECM-Mimetic Nanofiber Scaffolds for Neuronal Differentiation and Neurite Outgrowth Guidance. *Nanomaterials (Basel)*, 2022, 12(13), p. 2166.

3. Xiao Y et al. Ultrasmall CuS@BSA nanoparticles with mild photothermal conversion synergistically induce MSCs-differentiated fibroblast and improve skin regeneration. *Theranostics*, 2020, 10(4), pp. 1500-1513.

Характер влияния экзогенных фитогормонов на стартовый рост проростков зависит от напряжённости стрессовых факторов

Федулов Ю.П.^{1*}, Дегтярёв Е.А.², Подушин Ю.В.¹, Михайлова М.К.¹, Багдасарян М.Н.¹

¹Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия;

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Россия;

fedulov.ju@kubsau.ru

На сорте Вилана было изучено влияние на стартовый рост гетероауксина (10^{-8} моль/л), кинетина (10^{-8} моль/л) и гиббереллина (в форме GA-4, 10^{-5} моль/л).

Опыт был спланирован по схеме полного двухфакторного эксперимента, где одним фактором была температура проращивания семян ($T_1 = 12^\circ\text{C}$, $T_2 = 20^\circ\text{C}$, $T_3 = 32^\circ\text{C}$), другим – влажность субстрата выращивания – песка ($B_1 = 30\%$, $B_2 = 50\%$, $B_3 = 80\%$). Обработанные фитогормонами семена проращивали в песке заданной влажности [2] в термостатах, позволяющих поддерживать заданную температуру с максимальным отклонением от заданной не более $1,5^\circ\text{C}$

После проращивания до выхода листьев из колеоптиля проростки отмывали от песка и взвешивали с точностью до 1 мг. Повторность опыта трёхкратная.

Активность антиокислительной системы оценивали по каталазной активности тканей растений [1].

Оба стрессовых фактора, и понижение температуры, и дефицит влаги, тормозили накопление биомассы как у контрольных растений, так и обработанных гормонами. В зависимости от напряжённости стрессового фактора фитогормоны либо усиливали, либо тормозили рост.

Независимо от температуры и способов обработки семян биомасса проростков с нарастанием влажности субстрата возрастала. С другой стороны, при всех заданных влажностях субстрата проростки формировали большую биомассу при более высокой температуре.

При температуре проращивания 12°C все фитогормоны тормозили накопление общей биомассы проростков при всех изученных влажностях субстрата. Наибольшее торможение роста фитогормонами отмечалось при 12°C в варианте с влажностью субстрата 30%. В этом варианте опыта гетероауксин и кинетин тормозили рост в одинаковой степени, тогда как тормозящее действие гиббереллина было почти вдвое слабее. При повышении влажности при этой температуре вплоть до 80% тормозящее действие фитогормонов сохранялось, хотя степень торможения роста снижалась.

При влажности субстрата 30% гетероауксин и кинетин сохраняли своё ингибирующее влияния на рост при всех температурах, хотя с повышением температуры прорастания степень ингибирования роста уменьшалась

В отличие от гетероауксина и кинетина обработка семян гиббереллином в условиях водного дефицита (влажность субстрата 30%) уже при температуре 20°C стимулировала нарастание биомассы проростка.

Сравнение данных по торможению роста и каталазной активности тканей проростков показало, что эти параметры с изменением условий выращивания изменяются в противоположных направлениях: чем сильнее тормозится рост, тем выше каталазная активность. Максимальная каталазная активность тканей проростков сои

после предпосевной обработки семян фитогормонами отмечалась при обработке семян гетероауксином и кинетином в тканях растений, прорастающих при влажности субстрата 30% и температуре 12^oC. Следует отметить, что именно в этом варианте наблюдалось максимальное торможение роста проростков.

Для получения количественной оценки степени изменения ростстимулирующей активности фитогормонов при изменении условий среды были рассчитаны уравнения множественной линейной регрессии, связывающие скорость накопления биомассы с изменениями параметров внешней среды. Коэффициенты регрессии этих уравнений позволяют провести количественное сравнение влияния отдельных фитогормонов на ростовые параметры проростков при действии различных стрессовых факторов.

Полученные результаты полностью согласуются с данными, полученными на озимой пшенице [2]. Однако, следует отметить, что растения сои гораздо сильнее реагируют на аналогичное изменение уровней тех же самых стрессовых факторов, чем растения озимой пшеницы, что обусловлено глубокими различиями в их биологии.

Полученные результаты показывают, что предпосевная обработка семян фитогормонами усиливает реакцию растений на стрессовые факторы, причём с большой степенью вероятности можно предполагать, что природа стрессового фактора не имеет значения, что обусловлено неспецифической устойчивостью [3].

Можно полагать, что выявленная зависимость реакции проростков на предпосевную обработку фитогормонами от напряжённости стрессовых факторов отражает переориентацию основных метаболических путей развивающихся проростков с обеспечения ростовых процессов на активирование защитных реакций [4].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края в рамках научного проекта №19-416-230044.

Литература

1. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений //Л.: Агропромиздат. / А.И. Ермаков, Л.: Агропроиздат, 1972. 457 с.
2. Подушин Ю.В., Федулов Ю.П., Дегтярёв Е.А. [и др.]. Влияние экзогенных фитогормонов на стартовый рост озимой пшеницы в зависимости от температуры и влажности проращивания семян//Труды Кубанского ГАУ, 2020. – №2(83). – р.130-135.
3. Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и её регуляция. Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
4. Savchenko T.V., Rolletschek Y., Dehesh K. Jasmonates-Mediated Rewiring of Central Metabolism Regulates Adaptive Responses| Plant Cell Physiol.- 2019 – V. 60(12): 2613–2620 (2019)

ЭПР исследование биомагнетизма в делящихся клетках гречихи татарской *Fagopyrum tataricum*

Юртаева С.В.^{1*}, Яцък И.В.¹, Валиева А.И.², Акулов А.Н.², Румянцева Н.И.²

¹КФТИ ФИЦ КазНЦ РАН;

²Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН;
svetlana.vish@rambler.ru

О феномене биомагнетизма делящихся клеток известно с начала 60-х годов. Этот эффект заключается в появлении в спектрах ЭПР широких линий в области $g=2.2-2.3$. Он был обнаружен в интенсивно делящихся клетках дрожжей, коррелировал с изменением их статической магнитной восприимчивости и получил название феномена «широких линий ЭПР» [1-3]. Было установлено, что магнетизм в полусинхронной культуре клеток дрожжей возникает в период непосредственно предшествующий почкованию. После деления клеток сигнал исчезает [1-3]. Предполагалось, что сигнал может быть связан с кластерами предположительно ионов железа, возникающими на определенном этапе клеточного цикла. Однако природа возникновения этих сигналов в делящихся клетках не до конца понятна и по-прежнему вызывает большой интерес.

В данной работе упомянутый феномен магнетизма при делении клеток впервые обнаружен в интенсивно делящихся растительных клетках. В качестве объекта исследования были использованы культуры интенсивно делящихся клеток неморфогенного каллуса гречихи татарской *Fagopyrum tataricum*. Целью работы было изучить магниторезонансные характеристики сигналов для установления их происхождения (физической природы).

Методом ЭПР спектроскопии изучали замороженные и лиофилизированные образцы клеток. Образцы клеточной культуры отбирали ежедневно после пересадки на питательную среду в процессе ее роста. Установлено, что спектры ЭПР образцов культуры клеток существенно зависели от фазы роста культуры. Результаты ЭПР исследования показали, что в процессе роста клеточной культуры происходит сильное изменение магнитных свойств, заключающееся в появлении интенсивных, зависящих от ориентации магнитного поля сигналов ЭМР (ФМР) в период фазы ускорения роста культуры (3-4 день после пересадки). Интегральная

интенсивность спектров ЭПР имеет максимум на 3-й или 4-й день. Проведено более 10 серий независимых экспериментов. Увеличение сигнала происходит за счет появления сигнала ЭМР в области g-фактора 2.1÷2.2. Изучены температурные и угловые зависимости сигналов ЭМР.

В результате проведенного исследования установлено, что характеристики сигналов ЭМР ($H_{res}(T)$, $\Delta H(T)$ и интегральная интенсивность) в диапазоне температур 100К-260К соответствуют поведению нанокристаллитов магнетита Fe_3O_4 с характерным фазовым переходом Вервея, что было описано нами ранее в работе [4]. Наличие угловой зависимости свидетельствует о ферромагнитных свойствах Fe_3O_4 .

Была построена кривая изменения интегральной интенсивности спектра ЭПР от времени. Одновременно с ЭПР измерениями были получены кривая прироста клеточной массы, а также кривая зависимости митотического индекса от времени культивирования с момента пересадки культуры.

Установлено, что момент появления максимального сигнала ЭМР коррелирует с моментом регистрации максимального значения митотического индекса, что демонстрирует связь появления магнитных свойств с процессом деления клеток.

Культивирование клеточных культур проводили в КИББ ФИЦ КазНЦ РАН в рамках выполнения госзадания.

Исследования образцов методом ЭПР спектроскопии проводили в КФТИ ФИЦ КазНЦ РАН в рамках выполнения госзадания.

1. O.P.Samoilova, L.A.Blumenfeld. Biofizika (in Russian.), 6, Issue 1, 15-19 (1961)
2. A.I.Tsapin, O.P.Samoilova, L.A.Blumenfeld. Biofizika (in Russian), 34, Issue 4, 15-19 (1989)
3. O.P.Samoilova, A.I.Tsapin, L.A.Blumenfeld. Biofizika (in Russian), 40, Issue 2, 383-388 (1995)
4. Yurtaeva S.V., Efimov V.N., Yafarova G.G. et al. Appl. Magn. Res. 47, 555-565 (2016)

Электрохимическое исследование поведения толуидинового синего в альгинатном гидрогеле с иммобилизованными клетками перитонеального смыва

Новаковская М.В.^{1*}, Черенков И.А.¹, Рябов Е.И.¹

¹Удмуртский государственный университет, Ижевск, Россия;
mariya.98@inbox.ru

В настоящее время существует потребность в разработке модели активации, дифференцировки и оценки функциональной активности клеток иммунной системы. 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.

Основу работы составило проведение серии электрохимических измерений на планарных графитовых электродных системах (рабочий и вспомогательный электроды – графитовые, электрод сравнения – хлорсеребряный), которые предназначены для работы с малыми объемами.

Измерялись значения силы тока, потенциалов для основных электрохимических процессов (окисление и восстановление красителя), а также характерные свойства вольтамперных кривых циклической вольтамперометрии (ЦВА).

Перед измерениями электроды подвергали циклированию в диапазоне потенциалов от -1000 до 1000 мВ дистиллированной водой для стабилизации характеристик. В качестве фонового электролита использовался 0,9% раствор хлорида натрия (рН = 6,8). На его основе готовились все последующие растворы. Для моделирования межклеточного матрикса использовался 2% (масс.) свежеприготовленный альгинат натрия ($\rho = 997 \text{ кг/м}^3$). Его полимеризация осуществлялась в течение 5 минут 0,1М раствором $CaCl_2$ ($\rho = 1018 \text{ кг/м}^3$), который наносился непосредственно на рабочий электрод, избыток раствора удалялся фильтровальной бумагой. В качестве электроактивной метки, дающей аналитический сигнал, был выбран краситель – толуидиновый синий (ТС) в концентрации 0,1мМ.

Лейкоциты выделяли из перитонеального смыва мышей. Взвесь клеток отмывали стерильным физиологическим раствором (ФР). Суспензию смешивали с 4% альгинатом натрия (масс.) в соотношении 1:1 и исследовали методом ЦВА в диапазоне потенциалов 0...+500 мВ (отн. $Ag/AgCl$) со скоростью развертки потенциала 35 мВ/с.

Для оценки диффузии красителя в бесклеточной и клеточной системах измерения проводились в течение 50 минут с интервалом в 5 минут.

В присутствии 2% альгината ТС характеризуется близким к обратимому электрохимическому поведению. Наблюдаются качественные изменения вольтамперных кривых ЦВА. До начала измерений краситель формирует два пика: при потенциале +280,2мВ – пик восстановления (E_{pc}), а при +203,9 мВ – пик окисления (E_{pa}), $\Delta E =$

76,3 мВ. Что касается значений пиковых токов, то они соответствуют +0,11 мкА для восстановления (I_{рс}) и -0,14 мкА для окисления (I_{ра}). Отличные значения потенциалов и схожие по модулю значения пиковых токов указывают на квазиобратимый процесс, который обусловлен наличием полианионного гидрогеля в системе, препятствующего осаждению заряженных молекул красителя.

В течение 30 минут мы наблюдали постепенное нарастание пиковых значений силы тока. На последнем цикле они составили I_{рс} = 0,23 мкА, I_{ра} = -0,15 мкА. Отношение пиковых значений силы тока составляет 0,65 мкА, что говорит о частичной обратимости процесса. Интерес представляли значения потенциалов соответствующих пиков: E_{рс} = +316,2 мВ, E_{ра} = + 196 мВ, ΔE = 120,2 мВ. Мы предположили, что такое поведение красителя связано с его частичной абсорбцией в гидрогеле, так как низкие концентрации CaCl₂ обеспечили не полную полимеризацию гидрогеля. Из-за чего структура капли была рыхлой, а внутри неё и на поверхности было достаточно реакционноспособных свободных группировок.

На основе уравнения Рендлса-Шевчика был рассчитан коэффициент диффузии красителя через альгинатный гидрогель и составил $D = 1,18 \cdot 10^{-9}$ м²/с. Такой результат является более низким по сравнению с оценочными значениями коэффициента диффузии ТС для водных сред, полученных по данным расчетов на основе приближения Стокса-Эйнштейна, приведенных в литературе ($1,42 \cdot 10^{-9}$ м²/с). Альгинатный гидрогель, стабилизированный ионами кальция, замедляет диффузию ТС.

После добавления в электрохимическую ячейку клеточного компонента нами были зафиксированы видимые изменения. В присутствии клеток системой изначально сформировалось 2 пика: I_{рс} = + 0,02 мкА при E_{рс} = +272,3 мВ, I_{ра} = -0,01 мкА при E_{ра} = + 239,9 мВ. Значения силы тока по сравнению с контролем уменьшились более, чем в 10 раз, что указывает на присутствие клеточного компонента в системе, который активно взаимодействует с красителем.

Через 30-минутной диффузии ТС наблюдается значительное повышение пиковых значений силы тока I_{рс} = + 0,2 мкА, I_{ра} = -0,28 мкА, I_{ра}/I_{рс} = 1,4. Также смещается и диапазон потенциалов, в котором происходят превращения красителя (E_{рс} = 308,3 мВ, E_{ра} = 183,8 мВ, ΔE = 124,5 мВ).

Зависимость пиковых значений силы тока от времени являлась линейной и описывалась уравнением: I_{рс} = t + 0,31, R₂ = 0,99. Коэффициент диффузии $D = 2,47 \cdot 10^{-11}$ м²/с, что значительно ниже по сравнению с бесклеточной моделью.

В обеих системах также было отмечено преобладание катодного тока над анодным, что объясняется наличием восстанавливающихся электроактивных молекул. В присутствии клеток увеличились значения токов электроокисления, что указывает на наличие окисленных молекул, в качестве которых могут выступать активные формы кислорода, выделенные лейкоцитами.

Таким образом, нами была установлена функциональная активность лейкоцитов, выраженная в значениях каталитических токов окислительно-восстановительных превращений ТС. Взаимодействие клеток перитонеального смыва с компонентами электрохимической модели запускает биохимический каскад реакций, которые успешно регистрируются методом ЦВА. Это позволяет смоделировать процесс взаимодействия клеток с межклеточным матриксом и в дальнейшем проследить этапы переноса электронов в тканевых системах.

Эффективность фотобиомодуляции при онкогенезе в зависимости от уровня окислительной модификации макромолекул и особенностей функционирования центральной нервной системы

Жукова Е.С.^{1*}, Щербатюк Т.Г.¹, Чернов В.В.², Гапеев А.Б.³

¹Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

²Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, Россия;

³Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия;

evgenya_plekhanova@mail.ru

Одним из открытых вопросов о механизмах реализации биологического действия электромагнитных излучений (ЭМИ) видимого и инфракрасного диапазонов остается объяснение различного отклика живых систем на воздействие ЭМИ в условиях развития опухоли: показано стимулирование пролиферации, отсутствие эффекта, ингибирование роста клеток неоплазии [1, 2]. Возможно, разный ответ обусловлен различным функциональным состоянием живой системы на момент воздействия.

Отмечено, что цитохром-С-оксидаза, один из основных фотоакцепторов, в зависимости от степени окисления обладает различной фоточувствительностью [1]. В связи с этим нами была выдвинута гипотеза о том, что эффективность фотобиомодуляции на организменном уровне будет зависеть не только от параметров используемого ЭМИ, но и от степени окислительной модификации макромолекул. Однако на сегодняшний день нет данных о том, какие маркеры достоверно характеризуют окислительную напряженность в организме, поэтому необходим комплексный подход - оценка уровня окисления липидов, ДНК, белков и активности ферментов антиоксидантной системы. Отражением внутреннего состояния уровня окислительных процессов в сложной живой системе может являться, в том числе, функционирование нервной системы, как одной из наиболее чувствительных к окислительному стрессу. У *Rattus* некоторые гены ферментов антиоксидантной защиты расположены в локусах, ассоциированных с поведением в тесте «открытое поле» [3, 4]. Исходя из этого, особенности поведения, выявленные с помощью этого теста, вероятно, могут быть связаны с уровнем окислительных процессов в организме. Целью работы являлась оценка эффективности фотобиомодуляции при онкогенезе в зависимости от уровня окислительной модификации макромолекул и особенностей поведения лабораторных животных в тесте «открытое поле».

Исследования проведены на 138 ювенильных аутбредных крысах-самцах стока SD. Модели неоплазии - штаммы солидных опухолей крыс PC-1 и PA (РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН), перевиваемые подкожно. Источники ЭМИ оптического диапазона - экспериментальные генераторы низкоинтенсивного ЭМИ ($\lambda_1 = 400 \pm 20$ нм, 4,6 Дж/см², $\lambda_2 = 460 \pm 20$ нм, 3,2 Дж/см², транскутанно; ИПФ РАН, Нижний Новгород) и аппарат физиотерапевтический светодиодный АФС для ФДТ ($\lambda_3 = 660 \pm 10$ нм; ООО «Полироник», Москва). Модификаторы окислительных процессов – озон, получаемый на медицинском озонаторе «ТЕОЗОН» (РФЯЦ ВНИИЭФ, Саров), посредством внутрибрюшинного введения озонированного физиологического раствора [5], и фотосенсибилизатор гидроксисолюминия трисульфопталокцианин (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Москва). Схемы воздействия и дозировки подробно описаны в наших работах [2, 6]. Оценивали поведение крыс в тесте «открытое поле», противоопухолевую эффективность воздействий по индексу торможения роста опухоли и по коэффициенту прироста опухоли, общую свободнорадикальную активность косвенно методом индуцированной H₂O₂ и Fe²⁺ хемилюминесценции, уровень перекисного окисления липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой, степень окислительной модификации белков по уровню карбонильных производных с помощью реакции с 2,4-динитрофенилгидразином, уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс с помощью щелочной версии метода ДНК-комет, активность супероксиддисмутазы по реакции восстановления нитросинего тетразолия и каталазы по скорости разложения H₂O₂ [2, 6, 7].

По показателям исследовательской и двигательной активности, эмоциональности и тревожности животные разделились по типу поведения: 1) пассивные, 2) среднеактивные и 3) высокоактивные (метод k-средних, $p < 0,001$). По сравнению со среднеактивными для пассивных крыс была характерна более высокая интенсивность окислительных процессов в организме, для высокоактивных наоборот – низкая [2]. Для животных с пассивным поведением отмечены более высокая скорость пролиферации опухолевых клеток PC-1 в начале логарифмической фазы роста и последующая спонтанная регрессия [2], более агрессивное развитие PA с метастазированием [6]. Воздействие ЭМИ фиолетово-синего диапазона на PC-1 ранних сроков развития у пассивных животных стимулировало опухолевую прогрессию, у среднеактивных – тормозило, у высокоактивных – привело к регрессированию. Предварительное курсовое действие озона изменило отклик на воздействие ЭМИ фиолетово-синего спектра: у пассивных крыс наблюдалась остановка роста с последующим регрессированием опухолевого очага, у среднеактивных – краткосрочное торможение и продолженный рост, у высокоактивных - наблюдался выраженный противоопухолевый эффект [2]. Фотодинамическое воздействие с использованием ЭМИ красного диапазона и фотосенсибилизатора способствовало прогрессии PA у высокоактивных крыс. При этом предварительное курсовое действие озона снижало риски стимулирования пролиферации опухолевых клеток и повышало противоопухолевый эффект [6].

Таким образом, показано, что эффективность фотобиомодуляции при онкогенезе зависит от уровня окислительной модификации макромолекул и взаимосвязана с особенностями поведения.

1. Кару Т.И. Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии // Лазерная медицина. 2001. Т. 5. № 1. С. 7-15.

2. Жукова Е.С. и др. Фотобиомодуляция фиолетово-синим светом динамики опухолевого роста и прооксидантно-антиоксидантного баланса в организме опухоленосителей // Биофизика. 2022. Т. 67. № 3. С. 615-624.

3. Редина О.Е. и др. Генетический контроль поведения крыс НИСАГ в тесте открытого поля // Генетика. 2022. Т. 58. № 7. С. 773-785.

4. Rat Genome Database – URL: <https://rgd.mcw.edu/>

5. Кулагина Т.П. и др. Действие озона на жирнокислотный состав и свободнорадикальную активность в тканях крыс при опухолевом росте // Биологические мембраны. 2022. Т. 39. № 6. С. 482-491.

6. Щербатюк Т.Г. и др. Окислительная модификация белков в тканях крыс при опухолевом росте в условиях озono-фотодинамического воздействия // Биофизика. 2020. Т. 65. № 2. С. 367-375.

Механизмы действия физико-химических факторов на биологические системы

7. Арутюнян А.В. и др. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. – СПб.: ООО "Издательство Фолиант", 2000.

Экологическая биофизика

Активизация биоэлектрогенеза в микробных топливных элементах почвенного типа при внесении модельных органических загрязнителей

Мелконян К.К.^{1,2*}, Волченко Н.Н.², Гроина А.Д.², Самков А.А.², Худокормов А.А.²

¹ *Кубанский государственный технологический университет;*

² *Кубанский государственный университет;*

010899karina@gmail.com

Биоэлектрохимические системы с участием микроорганизмов являются объектом активного изучения последнее время. Принцип передачи электронов в анаэробных (или микроаэрофильных условиях) из электронтранспортных цепей бактерий на внешний акцептор – реализуется в микробных топливных элементах (МТЭ). Конечным акцептором отрицательных зарядов в них является биоанод. МТЭ – это биотехнологические устройства, в которых энергия химических связей преобразуется в электрический ток за счет биохимической активности бактериальных клеток. Напряжение, генерируемое подобным устройствами невелико и чаще всего не превышает 1 В, чего хватает для питания маломощных электронных устройств. Биотопливные элементы активно исследуются для применения в очистных системах, для биоремедиации *in situ*, качестве биосенсоров и т.д. Одним из пока мало исследованных направлений – является применения так называемых почвенных (грунтовых) элементов для усиления метаболизации органического вещества почвы. А также создания на этой основе биоэлектрохимических систем компостирования органических отходов, направленных в том числе на уменьшение углеродного следа.

По данным аналитических служб ООН в мире выбрасывается около трети продуктов питания, на пищевые отходы приходится 8% глобальных выбросов парниковых газов. Рассматриваются несколько способов сокращения подобных выбросов, например через использования пищевых остатков в качестве кормов для животных или вторсырья, часть отправляется на установки для получения биогаза и т.д.

Нами исследовалась возможность совмещения МТЭ и системы компостирования органических остатков, а также их влияния на электрогенез. Для этого использовался МТЭ почвенного типа. На дно вертикального пластикового сосуда помещался электрод из углеволокнистого войлока (анод). Средний слой был заполнен 1 литром почвы, смешанным в соотношении 10 к 1 с модельными пищевыми отходами, включающими хлебобулочные и овощные изделия. На поверхности в аэробных условиях находился катодный электрод. В качестве контроля использовался МТЭ идентичной конструкции, но без модельного загрязнителя.

Начальное напряжение в обеих ячейках было равно 0,3 мВ. В первый месяц эксперимента в МТЭ с органическими остатками напряжение составляло 20 мВ, что было на порядок ниже показателей в контрольном варианте. Вероятно, это связано с быстрым развитием в ячейке биомассы плесневых грибов, ассимилирующих углеводородный субстрат модельного пищевого загрязнителя. Они могли подавлять в том числе рост бактерий, участвующих в процессах анодофильного транспорта электронов.

Далее биоэлектрогенез опытного МТЭ начал возрастать и достиг 300 мВ, этот показатель с некоторыми колебаниями в целом сохранялся до конца эксперимента (90 суток). Иная картина наблюдалась в контрольной ячейке, где напряжение снизилось до 30 мВ, что, вероятно связано с истощением источников углерода. Измерения количества углекислого газа, выделяемого из почвы в период активизации электрогенеза в МТЭ, составило 1700 ppm, что в 1,5 раза выше, чем в контроле, что подтверждает вывод о более высокой активности микроорганизмов в МТЭ с органическим загрязнителем.

В целом данный эксперимент показывает возможность применения технологии микробных топливных элементов в почвенных биоэлектрохимических системах и возможность их использования для оценки биохимической активности почвы.

Биологические ритмы – алгоритм устойчивости биологических систем

Тулеханов С.Т.^{1*}, Швецова Е.В.¹, Кайрат Б.К.¹

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби;

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби;

Elenna4444@mail.ru

Живая система является сплавом биологических ритмов. Биологические ритмы обнаружены на всех уровнях организации биосистем: от молекулярного уровня до организменного уровня. Широкий спектр биологических уровней относится ко всем биологическим процессам и явлениям. Присутствие биоритмов на всех уровнях организации биосистем позволяет получить информацию об изучаемых процессах. Все эти биоритмы взаимосвязаны между собой как по вертикали, так и по горизонтали живых объектов. Эти особенности биоритмов позволяют добиться биосистемам синергетического и матричного эффекта. Синергетический и матричный эффекты позволяют сохранить устойчивость биосистем при действии различных возмущающих факторах как эндогенного, так и экзогенного происхождения. Динамичный характер биопроцессов позволяет биосистемам быть пластичными и лабильными. Пластичность и лабильность биосистем выработаны в ходе эволюционного процесса и адаптации к динамическим факторам окружающей среды.

Состояние систем, при котором параметры биоритмов со временем сохраняются, характеризуются устойчивым стационарным состоянием, т.е. нормой. При этом организм стремится работать на наиболее выгодном энергетическом уровне. Это свойство имеет большое значение для поддержания устойчивости биосистем. Если биосистема почему-либо отклонится от стационарного состояния, то в силу стремления системы к минимальному производству энтропии в ней наступят внутренние изменения, которые будут приближать биосистему к устойчивому стационарному состоянию, т.е. к аутостабилизации.

Устойчивость стационарного состояния организмов поддерживается с помощью механизмов авторегулирования, имеющих отрицательную обратную связь, где имеет место отрицательная обратная связь там присутствует ритм, т.е. за счет хроноструктурных параметров (акрофаза, ортофаза, мезор, амплитуда, период) поддерживается и обеспечивается устойчивость биосистем.

Если биосистема испытывает небольшое внешнее или внутреннее воздействие, то уровень стационарного состояния сохраняется. В случае действия возмущений система переходит от одного уровня стационарного состояния к другому, более выгодному при новых условиях. А при длительном возмущающем воздействии биосистема переходит в неустойчивое стационарное состояние (патология и т.п.), которое характеризуется максимальной скоростью приращения энтропии, что будет свидетельствовать о нарушении хроноструктурных параметров биоритмов. А для неустойчивого стационарного состояния характерно наличие механизмов самоусиления, работающего по типу положительной обратной связи. Внешние или внутренние воздействия вызывают в неустойчивой стационарной системе нарастающие изменения, в результате которых система переходит в состояние термодинамического равновесия, т.е. разрушение биоритмов и доминирование хаоса.

Таким образом, устойчивое стационарное состояние организма обеспечивается сохранностью биоритмов, а неустойчивость состояния биосистем свидетельствует о нарушении биологических ритмов.

Биологическое окисление промышленных сточных вод высокоэнергетических соединений на примере нитрированной целлюлозы

Саратовских Е.А.^{1*}, Авдеева Л.В.¹, Яруллин Р.Н.²

¹Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН;

²Казанский государственный университет;

casar@icp.ac.ru

Идеальная хозяйственная деятельность человека должна строиться по принципу природных экосистем, которые оптимально расходуют вещество и энергию, в которых отходы одних организмов служат средой обитания для других, т.е. осуществляется кругооборот, безотходные технологии утилизации. Соответственно, очистка стоков химических производств возможна только при использовании биологических методов окисления. В условиях средней климатической полосы в естественных условиях такое высокоэнергетическое супрамолекулярное соединение как нитрированная целлюлоза (НЦ) практически не разлагается. Устойчивость НЦ к биологическому разложению приводит к накоплению отходов в прудах-отстойниках, что оказывает негативное воздействие на окружающую среду и на здоровье людей. Поиски эффективных микроорганизмов-деструкторов и

разработка метода биологического окисления стоков производства НЦ являются острой научной и хозяйственной задачей.

Стоки типовых производств НЦ содержат значительные количества сульфатов, поэтому перспективной моделью для изучения трансформации НЦ являются сульфатредуцирующие бактерии. Они принадлежат родам *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfobacterium*, *Desulfosarcina*, *Archaeoglobus*, относятся к хемоорганотрофным микроорганизмам. Отдельные виды *Desulfotomaculum* способны довести окисление до CO_2 и H_2O . Нами были выполнены исследования по окислению НЦ с содержанием азота 10.7 и 13.38 мас% с помощью *Desulfovibrio desulfuricans*. Инкубация НЦ на бактериях проводилась до 65 суток. Измеряли содержание в растворе нитрат- и нитрит- групп; изменения молекулярно-массового распределения, вязкости, скорости тепловыделения и теплоты реакции термического разложения и элементный состав выделенной и высушенной НЦ.

Микроорганизмы, предназначенные для окисления стоков производства НЦ должны быть способны к метаболизму лигнина и его производных. Микроорганизм должен быстро расти, конкурентно преобладать в окружающей среде и деградировать низко- и высокомолекулярные производные лигнина. Этим требованиям соответствуют грибы белой гнили. Окисление НЦ нами проведено с использованием мицелиального гриба рода *Fusarium solani* IFO 31093. Показано, что в присутствии *F. solani* содержание N составило 10.61% (16 суток) и 10.51% (38 суток). За 65 суток инкубации происходило снижение pH с 7.15 до 6.53. О разложении НЦ свидетельствовало появление нитрат- и нитрит- групп в среде культивирования – 11.4 мкг/мл и 3.38 мкг/мл. Через 5 суток инкубации *F. solani* доля низкомолекулярных продуктов составляла 15%, к 65 суткам молекулярные массы этих фрагментов значительно уменьшились, что является перспективным с точки зрения практического применения.

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием № 0089-2019-0014 (№ государственной регистрации АААА-А19-119071890015-6).

Биолюминесцентный метод оценки загрязнения воздушной среды

Мельникова А.А.^{1*}, Римацкая Н.В.¹, Кратасюк В.А.¹

¹*Сибирский федеральный университет;*
anastasiafb15@gmail.com

В последние года актуальна проблема загрязнения атмосферного воздуха, так как большинство опасных загрязняющих веществ поступают в природную среду через атмосферу, которая становится важным входным компонентом геосистемы с точки зрения техногенного воздействия[1]. Химические методы анализа воздушной среды активно применяются в г. Красноярске и других городах, но не позволяют проанализировать действие загрязнений на живые объекты.

В данной работе с помощью биолюминесцентного биферментного метода было проанализировано состояние воздушной среды и оценена степень ее загрязнения.

Отбор проб воздушной среды проводился на открытом воздухе в городской черте с помощью аспиратора ПУ-4Э с использованием поглотительных сосудов Рихтера. В качестве поглотительных сред использовались: дистиллированная вода; поглотительная среда на формальдегид[2]; поглотительная среда на диоксид азота[3]. Было отобрано 30 проб воздушной среды.

По результатам спектрофотометрического анализа было определено содержание в пробах воздуха формальдегида, диоксида азота. Биолюминесцентный анализ проб воздуха проводился с использованием растворимой биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза.

Была использована реакционная смесь следующего состава:

- 350 мкл 0,05 М калий фосфатного буфера (pH=6,9);
- 5 мкл раствора КРАБа; 50 мкл 0,0025% раствора тетрадеканая;
- 100 мкл 0,4 мМ раствора NADH;
- 10 мкл пробы/контроля (для дистиллированной воды 50 мкл);
- 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN.

Оценка токсичности исследуемой пробы осуществлялась по величине ингибирования люминесценции пробы. В качестве анализируемого параметра выступает величина остаточного свечения [1]. Спектрофотометрический анализ проб воздуха показал, что концентрация формальдегида составила $0,016 \pm 0,002$ мг/м³, а диоксида азота $0,063 \pm 0,014$ мг/м³.

В результате проведения биолюминесцентного анализа все исследуемые пробы оказались загрязнены, так как остаточное свечение пробы, отобранной на поглотительный раствор на формальдегид, составило 134 ± 4 , а на поглотительный раствор на диоксид азота 77 ± 7 .

Спектрофотометрический анализ проб, в отличие от биотестирования, не показал превышение предельно допустимых концентраций. Это свидетельствует о том, что химический анализ не является полноценным

методом оценки состояния воздушной среды. Альтернативным интегральным методом в таком анализе может служить биолюминесцентный анализ с использованием растворимой биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза.

Список литературы

1. Esimbekova, E.N., Torgashina, I.G., Kalyabina, V.P., Kratasyuk, V.A. Enzymatic Biotesting: Scientific Basis and Application. Contemporary Problems of Ecology, 2021, 14(3), стр. 290–304

2. Problems of Ecology 2021, 14, 290. РД 52.04.823-2015. Массовая концентрация формальдегида в пробах атмосферного воздуха, 2016, стр.29-30

3. РД 52.04.792-2014 .Массовая концентрация оксида и диоксида азота в пробах атмосферного воздуха.

Биолюминесцентный потенциал мезомасштабных вихрей мирового океана

Пионтковский С.А.^{1*}, Мельник А.В.², Серикова И.М.², Минский И.А.², Жук В.Ф.²
¹СевГУ;

²Институт биологии южных морей РАН;
spiontkovski@mail.ru

Мезомасштабным вихрям океана (с диаметром 100-200км и временем существования от недель до месяцев) посвящены многочисленные исследования и их обзоры (Chelton et al., 2007, 2011; Korotaev, 2020, и др.), поскольку эти динамические образования вносят значительный вклад в пространственно-временную изменчивость поля кинетической энергии геострофических течений мирового океана. Экологическим следствием энергодинамики вихрей является пространственная неоднородность распределения биомассы и численности планктона (Пионтковский, 2005), в том числе его биолюминесцентной фракции. Характеристики механически стимулированной биолюминесценции отражают как структурные свойства планктонного сообщества (биолюминесцентный потенциал светящихся видов), так и его функциональное (физиологическое) состояние (Токарев, 2006, 2016).

Цель данного исследования состояла в выявлении характерных свойств мезомасштабной изменчивости биолюминесцентного потенциала (БП) в верхнем 100-метровом слое в районах с более или менее развитым вихревым полем. В частности, выполнена проверка гипотезы о возможной взаимосвязи между мезомасштабной пространственной неоднородностью поля биолюминесценции и кинетической энергией вихрей. Методы расчета последней приведены в серии работ (Roach et al., 2018; Sharma et al., 1999, и др.).

В большинстве регионов БП измерялся погружным комплексом «Сальпа» нескольких модификаций (Мельник и др., 2019). В данной работе использованы материалы ночных зондирований. Часть из них сопровождалась сбором проб фито и зоопланктона. Мезомасштабные вихри идентифицированы как по результатам контактных измерений направления и скорости геострофических течений, так и по аномалиям уровня поверхности океана полученных со спутников (<https://las.avisio.altimetry.fr>).

Батифотометрические зондирования (по 5-20 последовательных зондирований на дрейфовых станциях) в режиме сеток станций и разрезов позволили оценить горизонтальную составляющую пространственного распределения и характеристики вертикальной структуры поля биолюминесценции. Анализ 24,000 батифотометрических зондирований из 71 экспедиции научно-исследовательских судов АН СССР и РФ в 1966-2017гг. выполнен для регионов Атлантического, Индийского океанов и средиземноморского бассейна.

Максимумы БП характерны для периферии циклонических вихрей, с 3-4х кратными различиями БП между центрами и периферией. В тропических водах Атлантического и Индийского океанов отмечена корреляция между БП и биомассой сетного зоопланктона ($r=0.7$, $p=0.05$), которая существует сезонно, особенно в Индийском океане, где таксономический состав и биомасса изменяются в связи с муссонной перестройкой ветров и течений. В открытой части Черного моря преобладает корреляция между БП и биомассой фитопланктона.

Нормированная дисперсия БП в слое 0-50м на 14 сетках станций и разрезов в океанических водах коррелирует с кинетической энергией вихрей в поверхностном слое ($r=0.8$, $p=0.001$), в диапазоне кинетической энергии вихрей и биомассы сетного зоопланктона варьирующих, приблизительно, в пределах одного порядка. При этом, величина нормированного БП варьировала в диапазоне превышающем два порядка.

В вертикальном распределении, в циклонических вихрях тропических вод, максимумы БП располагаются выше, чем в фоновых областях. При этом, вертикальный масштаб тонкоструктурных неоднородностей в тропических водах и Черном море (оцененный по автокорреляционным функциям) находится в пределах 1-7 м. Он больше в вихрях по сравнению с фоновыми областями.

Работа поддержана грантом РФ № 23-24-00007, Севастопольским государственным университетом и Институтом биологии южных морей РАН (гранты № 121040600178-6 и № 121090800137-6).

Литература

- Chelton D.B., Schlax M.G., Samelson R.M., de Azoeke R.A. 2007. *Geophysical Research Letters*, 34, L15606.
Chelton D.B., Schlax M.G., Samelson R.M. 2011. *Progress in Oceanography*, 91: 167-216.
Korotaev G.K. 2020. *Physical Oceanography (e-journal)*, 27 (6): 692-713.
Roach C.J., Balwada D., Speer K. 2018. *Journal of Geophysical Research. Oceans*, 123: 4560-4575.
Sharma R., Gopalan A.K.S, Ali M.M. 1999. *Marine Geodesy*, 22:239-248,
Мельник А.В., Георгиева Е.Ю., Мельник Л.А. 2019. Системы контроля окружающей среды, 3 (37): 120-126.
Пионтковский С.А. 2005. Многомасштабная изменчивость мезопланктонных полей океана. «Экоси-Гидрофизика», Севастополь, 194 с.
Токарев Ю.Н. 2006. Основы биофизической экологии гидробионтов. «Экоси-Гидрофизика», Севастополь, 342 с.
Токарев В.Н., Евстигнеев П.В., Машукова О.В. 2016. Планктонные биолюминесцентные мирового океана: видовое разнообразие, характеристики светозлучения в норме и при антропогенном воздействии. «Н.Орианда», Симферополь, 340 с.

Биомониторинг состояния поверхностных вод русла реки Кальмиус с применением метода флуориметрии

Чуфицкий С.В.^{1*}, Беспалова С.В.¹
¹ГОУ ВПО "Донецкий национальный университет";
ChufitskyiSergey@yandex.ru

Введение. Проблема сохранения и обеспечения водными ресурсами Донецкого региона в последние годы стоит наиболее остро. Значительно возросла потребность не только в поиске дополнительных источников пресной воды, но и в сохранении имеющихся природных запасов. Оценка состояния поверхностных природных вод и мониторинг водных ресурсов в таких условиях является приоритетной задачей. При этом наиболее востребованы экспресс-методы, позволяющие за короткий промежуток времени оценить состояние водного объекта. Наиболее перспективным в данной области является метод флуориметрии с использованием в качестве биоиндикатора клеток фитопланктона.

Материалы и методы. Для мониторинга состояния поверхностных вод русла реки Кальмиус и ее двух притоков: рек Бахмутка и Дурная, было выбрано 11 мониторинговых точек. Ряд мониторинговых точек был расположен вдоль Нижнекальмиусского водохранилища. Так же точки располагались в местах попадания сточных вод из потенциальных источников загрязнения. Все мониторинговые измерения проводились в различные сезоны года (не менее одного раза за отдельный сезон) с целью определения состояния клеток фитопланктона в различных природно-климатических условиях.

Содержание хлорофилла в пробах воды определяли с помощью флуориметра Phyto-PAM (Walz, Германия). Кривые индукции флуоресценции регистрировали с помощью флуориметра ФС-2, разработанного на базе Специального конструкторско-технологического бюро «Турбулентность» и кафедры биофизики Донецкого национального университета. Обработку кривых индукции выполняли в программе ruPhotoSyn [1], которая позволяет вычислить параметры ОЛР-теста [2].

Результаты исследования. В зимний период основными фотопигментами в пробах воды выступали хлорофиллы а и b. Наибольшие концентрации пигментов были получены для Нижнекальмиусского водохранилища – около 6 мг/л. Накопление биомассы фитопланктона в водохранилище обусловлено гидрорежимом водного объекта и является характерным независимо от времени года. Во все периоды наблюдали высокие, в сравнении с другими мониторинговыми точками, концентрации фотопигментов в Нижнекальмиусском водохранилище. Для рек Дурная и Бахмутка было характерно низкое содержание фотопигментов (например, в осенний период в 3 раза ниже, чем в русле реки) с преобладанием хлорофилла b. В осенний период в водах водохранилища значительно возросла доля фотопигментов цианобактерий.

При анализе кривых индукции флуоресценции хлорофилла было выявлено 10 наиболее показательных тест-функций. В зимний период регистрацию кривых индукции флуоресценции хлорофилла не выполняли в связи с низкими концентрациями клеток фитопланктона в пробах воды.

В течение всего года наблюдали снижение фотосинтетической активности клеток фитопланктона в пробах воды из притоков р. Кальмиус, что выражалось в снижении квантового выхода флуоресценции и общего фотосинтетического индекса производительности фотосистемы II. Кроме того, в летний период около Донецкого металлургического завода наблюдали низкие значения минимального и максимального уровней флуоресценции, квантового выхода и общего фотосинтетического индекса, а также уменьшение квантовой эффективности переноса электронов от первичного хинона и вероятности переноса электронов от него. Была выявлена высокая

фотосинтетическая активность клеток фитопланктона Нижнекальмиусского водохранилища. Отмечали высокие показатели флуоресценции клеток фитопланктона водохранилища, что свидетельствует об интенсификации роста биомассы фитопланктона.

Выводы. Отдельные мониторинговые точки Нижнекальмиусского водохранилища и притоков р. Кальмиус являются приоритетными объектами исследований, поскольку было получено нехарактерное для большинства точек распределение фотосинтетических пигментов, значительное присутствие пигментов цианобактерий на фоне возрастания суммарной биомассы фитопланктона в различные сезоны года. На основании анализа кривых индукции флуоресценции наблюдали снижение фотосинтетической активности клеток фитопланктона в р. Дурная и р. Бахмутка, что выражалось в снижении квантового выхода флуоресценции и общего фотосинтетического индекса производительности и указывает на загрязнение данных притоков р. Кальмиус.

Список литературы

1. Plyusnina T.Yu., Khruschev S.S., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Analysis of chlorophyll fluorescence transient by spectral multi-exponential approximation // Biophysics. – №60. – 2015. pp. 392-399.

2. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. – In: Papageorgiou G.C., Govindjee (ed.): Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration.– 2004. pp. 321-362.

Биофизические показатели производных кожи оленей разных мест обитания

Комарова С.А.^{1*}, Олешкевич А.А.¹
¹МГАВМиБ - МВА им. К.И. Скрябина;
Black_panter27@mail.ru

Изучены величины редокс-потенциалов щелочных гидролизатов волос разных видов оленей: северного, пятнистого и благородного. Волосы были взяты с различных участков тела здоровых животных разного пола и возраста (самцов, беременных и не беременных самок, детенышей). Забор материала для исследования проводили у животных различных природно-климатических зон. В России северный олень обитает на севере русско-европейской равнины, в горах Урала, в сибирской тайге и на Дальнем Востоке. Он заселяет равнинные, горные районы. Живет в тундре, лесотундре, хвойных лесах. Уссурийский пятнистый олень относится к редким видам животных. В России обитает в Приморском крае. Благородный олень представлен в основном подвидом алтайский олень (марал). Обитает в горных лесах Алтая, в Саянах и в Прибайкалье в Сибири.

Редокс-потенциал волос определяли методом авторов [1, 2]. Исследованы по 20-25 образцов кожных производных оленей из 8 местностей. Были выявлены достоверные различия значений редокс-потенциалов у разных видов животного. Однако при этом зависимость величины редокс-потенциал от возраста, пола, зоны проживания и климатических условий не установлена.

Редокс-потенциал волос северного оленя при инкубации в темноте находился в диапазоне 55-57 мВ, при облучении видимым светом диапазоне составлял 50-53 мВ.

У шерсти пятнистого оленя редокс-потенциал при инкубации в темноте находился в диапазоне 48-51 мВ, при облучении видимым светом диапазоне составлял 40-41 мВ.

Редокс-потенциал волос благородного оленя при инкубации в темноте варьировал в диапазоне 60-64 мВ, при облучении видимым светом диапазоне составлял 56,5-58,5 мВ.

1. Патент на полезную модель № 171788 «Устройство для определения параметров фоторедокс-эффекта в щелочных растворах кератинов» Новиков В.Э, Комарова С.А., 2016.

2. Laboratory examination technique for animal skin derivatives (hair, wool, fluff). A.A. Oleshkevich, S.A. Komarova, A.A. Guselnikova, E.I. Yarygina. RAD Conference Proceedings, vol. 4, pp. 95–100. DOI: 10.21175/RadProc.2020.20

Биофизическое исследование кожных производных северных оленей различных зон Якутии

Олешкевич А.А.^{1*}, Комарова С.А.¹, Федоров В.И.²

¹МГАВМиБ - МВА им. К.И. Скрябина;

²ФГБНУ Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. М.Г. Сафронова;
kaffizmgavmib@mail.ru

Продукция северного оленеводства считается экологически безопасной. Но особенности физиологических систем северных домашних оленей в Якутии изучены недостаточно. Были проведены исследования физиологии репродукции северных домашних оленей 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.

Краткие результаты. Установлено, что домашние олени горно-таежной и тундровой зон относятся к лептосомному типу. Физиологические показатели роста и развития оленей разных зонах различаются. Для определения радиоактивного загрязнения, наличия тяжёлых металлов (медь, свинец, цинк) и для измерения редокс-потенциалов щелочных гидролизатов волос/шерсти северного оленя различных северных зон были взяты образцы у разных животных (от самцов, самок и детёнышей). В результате исследований 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. Затем при инкубации в темноте возвращался к исходным темновым значениям. У шерсти детёнышей значения редокс-потенциалов не имели отличий от взрослых особей. Предварительный анализ наличия в производных кожи оленей разных зон обитания стронций-90 и цезий-137 не выявил присутствия радиоактивных элементов.

Влияние гипوماгнитных условий, растворенного кислорода и солености воды на продукционные и морфометрические показатели *Daphnia magna* Straus

Сизова А.А.^{1*}, Сизов Д.А.¹, Крылов В.В.¹

¹ИБВВ РАН;

batrakova_a@mail.ru

В последние годы проявления глобальных климатических изменений становятся заметнее. Общие последствия трансформации параметров окружающей среды для пресноводных экосистем, вероятно, приведут к повышению солености воды и снижению уровня растворенного кислорода. Кроме этого, существует вероятность того, что вследствие инверсии магнитных полюсов Земли может произойти снижение напряженности геомагнитного поля. Изменения солености, количества растворенного кислорода в водоемах и магнитных условий как по отдельности, так и совместно могут существенно сказаться на жизнедеятельности и размножении гидробионтов.

Одним из удобных гидробиологических объектов для исследования влияния указанных факторов является рачок *Daphnia magna* Straus. В научной литературе имеются сведения о влиянии солености, количества растворенного в воде кислорода и магнитных полей по отдельности на этих ракообразных. Однако, нам не удалось найти публикаций о совместном влиянии гипوماгнитных условий и факторов, сопровождающих глобальные климатические изменения, на животных.

Нами были проведены эксперименты с целью изучения совместного и раздельного влияния увеличения солености водной среды и гипوماгнитных условий, а также снижения содержания кислорода в воде и гипوماгнитных условий на морфометрические и продукционные показатели *D. magna*.

В опытах использовали воду с соленостью 0.5, 1.5 и 3 г/л, что соответствует солености, встречающейся в настоящее время в водоемах Ярославской области (0,5 г/л), и вероятному увеличению этого показателя в связи с климатическими изменениями (1,5 г/л и 3 г/л). Для второй серии экспериментов использовали воду с содержанием кислорода 2, 5 и 8 мг/л. Последнее значение соответствует уровню содержания кислорода в водоемах Ярославской области, первое и второе моделируют вероятное уменьшение этого показателя в связи с климатическими изменениями. Снижение растворенного кислорода в воде до 2 мг/л и 5 мг/л достигали путем барботирования воды жидким азотом. В опытах использовали немодифицированное геомагнитное поле (51.7

мкТл) и гипوماгнитные условия (0 ± 200 нТл), моделирующие изменения в процессе инверсии магнитных полюсов Земли.

Из синхронизированной культуры *D. magna* случайным образом отбирали новорожденных особей не старше 24 часов. Рачков помещали в емкости с водой разной солености или различным содержанием кислорода по одной особи в каждую емкость. Часть дафний размещали в центре системы колец Гельмгольца, где генерировались гипوماгнитные условия. Другая часть оставалась в геомагнитном поле.

Гипوماгнитные условия и различная соленость. Были получены эффекты увеличения размеров молоди и количества особей в первом выводке у содержащихся в гипوماгнитных условиях дафний в сравнении с самками, экспонированными в контрольных условиях. Фактор солености также оказывал влияние на размеры и количество молоди, производимой в первом выводке, что выражалось в увеличении этих показателей при содержании рачков в воде соленостью 3 г/л. Взаимодействие факторов не оказывало влияния на размеры и количество молоди в первом выводке. Эти результаты согласуются с литературными данными.

Сроки появления первого выводка зависели от солености водной среды. В меньшей степени на этот показатель влияли магнитные условия и взаимодействие факторов. Дисперсионный анализ показал значимое влияние магнитных условий на период между выводками, что было связано с увеличением этого показателя у дафний в геомагнитном поле в сравнении с рачками, содержащимися в гипوماгнитных условиях.

Несмотря на улучшение продукционных показателей в первом выводке в гипوماгнитных условиях, динамика изменения количества производимого потомства в последующих выводках указывает на негативное влияние гипوماгнитного поля. Начиная с 4-го выводка дафнии, содержащиеся в геомагнитном поле при любой солености, производили больше молоди по сравнению с рачками, находившимися в гипوماгнитных условиях. Было зарегистрировано снижение размерных показателей рачков-производителей в гипوماгнитных условиях. Наиболее сильный эффект наблюдался при солености 3 г/л.

В случае с длиной хвостовой иглы наблюдали тренд к увеличению этого показателя с ростом концентрации соли в воде и незначительное увеличение длины хвостовой иглы в гипوماгнитных условиях. В литературе нам не удалось найти сведений о влиянии солёности на этот морфологический признак.

Гипوماгнитные условия и гипоксия. Можно выделить группу эффектов, вызванных изменением содержания кислорода в воде, к которым относится снижение количества потомства, производимого в 3-6 выводках, снижение размерных показателей взрослых особей и увеличение длины хвостовой иглы у дафний, содержащихся в условиях гипоксии.

Размеры производимой молоди увеличивались в гипوماгнитном поле. При этом, длина тела рачков-производителей в гипوماгнитных условиях была значимо ниже, чем в геомагнитном поле, а длина хвостовой иглы наоборот была больше при отсутствии геомагнитного поля. Кроме того, мы наблюдали увеличение длины хвостовой иглы у *D. magna* в воде с низким содержанием кислорода.

Содержание кислорода и гипوماгнитные условия оказывали заметное воздействие на продукционные и морфометрические показатели *D. magna*. Фактор солености, который существенно меняется в пределах ареала этого вида, оказывал меньшее влияние в сравнении со снижением индукции геомагнитного поля. Палеомагнитные данные указывают на то, что геомагнитное поле не испытывало инверсий и резкого ослабления в течение последних 42 000 лет. Вполне закономерно, что изменения столь стабильного фактора были менее ожидаемы организмом и, следовательно, приводили к более заметным эффектам в наших экспериментах. Полученные результаты указывают на то, что смоделированные в данном эксперименте изменения в окружающей среде, которые могут возникнуть вследствие глобальных климатических и геофизических процессов, существенно влияют на пресноводных ракообразных *D. magna*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-20053, <https://rscf.ru/project/22-24-20053/>

Влияние лигандов на адсорбцию ионов меди клеточными стенками растений вики посевной (*Vicia sativa* L.)

Никушин О.В.^{1*}, Мейчик Н.Р.¹, Николаева Ю.И.¹, Кушунина М.А.¹
¹*Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова;*
nikushin.94@mail.ru

В российских регионах с развитой промышленностью и сельскохозяйственным производством, существует опасность загрязнения агроэкосистем. Одними из основных и самых опасных загрязнителей экосистем являются тяжелые металлы (ТМ). Токсическое действие ТМ на растения обусловлено в первую очередь нарушением ионного гомеостаза, водного баланса, функционирования ферментных систем и цитоскелета, что приводит к множественным нарушениям метаболизма.

Растения ведут прикрепленный образ жизни, поэтому для выживания на почвах с повышенной концентрацией ТМ им необходимо развивать специализированные механизмы устойчивости. Внутриклеточные защитные механизмы широко изучаются и освещены в достаточном количестве обзоров [2,5]. В тоже время, внеклеточным механизмам защиты растений от ТМ уделяется значительно меньше внимания. Именно клеточная стенка является первой структурой растительной клетки, взаимодействующей с окружающей средой. В связи с этим ряд авторов считает, что именно клеточная стенка играет одну из ключевых ролей в защите растений от ТМ, обусловленную их высокой катионообменной способностью [1,3]

Другим механизмом защиты растений от ТМ является выделение корнями лигандов, связывающих металлы в почвенном растворе, таких как цитрат, малат, некоторые аминокислоты [4,6]. Несмотря на то, что имеется большое количество исследований о влиянии органических лигандов на накопление и доступность ТМ, тонкие механизмы этих явлений до сих пор не установлены.

В связи с этим целью данной работы было изучение влияния лигандов (гистидина и глутамина) на адсорбцию ионов меди клеточными стенками растений вики посевной (*Vicia sativa* L.).

В данной работе проведено сравнительное исследование поглощения ионов меди корнями транспирирующих растений и изолированными из корней и побегов клеточными стенками (КС) при разных концентрациях гистидина или глутамина в присутствии 10 и 100 мкМ меди в среде. В опытах с гистидином (His) использовались концентрации 0,5 мМ и 1 мМ, с глутамином (Gln) – 1 мМ и 5 мМ. В соответствии с результатами, с увеличением концентрации Cu^{2+} в растворе выращивания, её содержание в корнях и побегах так же росло. Эффекты His и Gln выражаются в снижении поступления металла в растение. 1 мМ His, в присутствии 100 мкМ меди в среде, достоверно снижает поступление металла в корень в 4,3 раза. Максимальная концентрация Gln (5 мМ) в присутствии 100 мкМ металла снижение составило 86,6% по отношению к варианту без лиганда.

В случае с изолированными клеточными стенками наблюдалась схожая тенденция к увеличению сорбции металла по мере увеличения концентрации меди в среде. В условиях 10 мкМ меди His не оказывал влияния на адсорбцию меди КС корней. Добавление 5 мМ Gln, в свою очередь, усиливало адсорбцию меди на 13% по отношению к варианту без лиганда. В присутствии 100 мкМ меди в среде, добавление аминокислот снижало адсорбцию на 16% в вариантах с Gln и на 25% в вариантах с 1 мМ His, гистидин 0.5 мМ не оказывал влияния. В случае с клеточной стенкой побегов, лиганды не оказывали влияние на адсорбцию ионов меди в расчете на грамм сухой массы побега.

При обработке растворами CuCl_2 концентрации 10 мкМ и в отсутствии лигандов, КС корней адсорбирует в 2 раза больше ионов металла, чем поглощается транспирирующим растением. По мере увеличения концентрации лигандов в растворе разница между содержанием меди в корне и адсорбцией изолированной КС корня увеличивается. При максимальных концентрациях гистидина и глутамина адсорбция изолированными КС корней в 4,4 и в 13,4 раз больше внутренней концентрации меди в корнях опытных растений в расчете на грамм сухой массы корня

Таким образом, исследованные лиганды снижают поглощение меди интактными растениями. При этом не оказывая влияния на адсорбцию ионов меди изолированными КС корней, которая, в свою очередь, превосходит в несколько раз эндогенную концентрацию металла в опытных корнях. Полученные результаты дают основание полагать, что: 1) КС является основным местом депонирования ТМ в растении; 2) исследованные лиганды способствуют ограничению поглощения ионов меди транспирирующими растениями, не оказывая влияния на сорбционную способность клеточных стенок.

Список литературы:

1. Krzesłowska M. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2011. Vol. 33. P. 35–51.
2. Migocka M, Malas K. Plant Responses to Copper: Molecular and Regulatory Mechanisms of Copper Uptake, Distribution and Accumulation in Plants. In: Hossain MA, Kamiya T, Burritt DJ, Phan Tran L-S, Fujiwara T, Plant Micronutrient Use Efficiency. Academic Press, 2018, Pages 71-86, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812104-7.00005-8>.
3. Meychik N., Nikolaeva Yu., Kushunina M. 2021. The significance of ion-exchange properties of plant root cell walls for nutrient and water uptake by plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 166: 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.048>
4. Tsednee M, Yang SC, Lee DC, Yeh KC. Root-secreted nicotianamine from *Arabidopsis halleri* facilitates zinc hypertolerance by regulating zinc bioavailability. *Plant Physiol*. 2014 Oct;166(2):839-52. doi: 10.1104/pp.114.241224
5. Viehweger, K. (2014) How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55, 35.
6. Yang Y.-Y., Jung J.-Y., Song W.-Y., Suh H.-S., Lee Y. 2000a. Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance. *Plant Physiology* 124: 1019–1026. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1019>

Воздействие экстремальных физических факторов стратосферного полёта на модельные биологические объекты в составе микроспутников типа «кубсат»

Волченко Н.Н.^{1*}, Худякова Ю.Е.¹, Новомлинова О.С.¹, Реут Е.С.¹, Егупец Л.В.¹, Крылова А.К.¹, Палагутина Е.Е.¹, Крицкая А.А.¹, Попко К.С.²

¹Кубанский Государственный Университет;

²ЦМИТ "Перспектива";

volchenko.n@mail.ru

Одним из перспективных направлений современных биофизических исследований могут являться эксперименты на микроспутниках формата «Cubesat». Эти устройства запускаются на околоземную орбиту в качестве дополнительной нагрузки вместе с крупногабаритными аппаратами. Функционально кубсаты способны выполнять большинство функций классических искусственных спутников Земли с поправкой на их минимальные размеры и отсутствие систем корректировки орбиты. На основании таких устройств сейчас выполняется значительное количество физических экспериментов, в области исследований радиационного фона, радиопрозрачности атмосферы, оптические наблюдения и др. Однако пока слабо представлены биологические эксперименты, что связано с естественными ограничениями по размерам биосистем, не допускающими такой миниатюризации как физические.

Задачей нашего эксперимента являлась разработка дизайна биологических экспериментов на основе микроорганизмов и их реализация в микроспутниках, поднимаемых в стратосферу в условия экстремальных физических воздействий. Стратосферный запуск более прост и доступен технически, при этом биологические образцы попадают в условия, приближенные к таковым в ближнем космосе: низкие температуры, минимальное атмосферное давление, высокие уровни радиации, ультрафиолета. Одной из ключевых проблем является массогабаритные ограничения кубсатов, которые представляют собой контейнеры размером до 10*10*34 см. Полезную биологическую нагрузку необходимо вмести в модуль объёмом не более 1000 см³.

Микроспутники были разработаны и изготовлены сотрудниками и учащимися ЦМИТ «Перспектива» (г. Курганинск Краснодарского края). Биомодули для различных вариантов организмов были разработаны ими, а также сотрудниками и учащимися клуба «Матрица» и ЦМИТ «Станция» г. Краснодара. Микробный топливный элемент с системой регистрации данных был разработан и изготовлен сотрудниками лаборатории робототехники и мехатроники КубГУ Д.А.Барыбиным, А.С.Прутским. Микробиологические эксперименты были разработаны и реализованы студентами и сотрудниками биологического факультета КубГУ, упомянутыми в перечне авторов данной работы. Запуск в стратосферу был осуществлён на аэростате командой ЦМИТ «Перспектива» и «ТоСку» (г. Томск). В ходе полёта была достигнута высота 24,6 км, минимальная температура воздуха составляла -42...-55 оС, уровень радиации около 300 мкР/ч. Длительность полёта составила 86 минут. После достижения максимальной высоты и разрыва оболочки шара, возврат микроспутников осуществлялся спуском на парашюте.

Для оценки влияния этих экстремальных физических факторов были разработаны и реализованы 4 варианта биологических экспериментов, размещенных в трёх микроспутниках.

Опыт с микробным топливным элементом (МТЭ) имел задачей изучение биоэлектрогенеза в условиях экстремальных воздействий. Динамика электрического напряжения использовалась как показатель анаэробной дыхательной активности бактерий. В качестве образцов исследовалась монокультура электрогенного штамма рода *Shewanella* и анодофильные микробные ассоциации иловых сообществ. Была показана возможность создания бактериями потенциала более 300 мВ с некритическим обратимым его снижением в ходе полёта.

Эксперимент с микроводорослями рода *Chlorella vulgaris* был направлен на исследование изменения динамики роста фотосинтетических организмов в лабораторных условиях после экстремальных физических воздействий стратосферного полёта. Оценка роста суспензии хлореллы проводилась фотометрическим способом в среде Прата. Было показано, что все образцы водорослей сохранили жизнеспособность, причём сходный уровень роста наблюдался у хлореллы, находившейся в биомодуле в условиях термостатирования и без него.

Был проведён эксперимент с ростом бактерий нескольких штаммов на плотной агаризованной среде в чашках Петри, без условий термостатирования и герметизации. Показано, что микроорганизмы сохранили свою жизнеспособность, которая зависела от пигментации их колоний. Культуры, имеющие жёлтые пигменты росли лучше, чем штаммы других цветов. Это, вероятно, может быть обусловлено защитными свойствами, например, каротиноидов, нейтрализующих свободные радикалы, образующиеся при воздействии радиации.

Был проведён аналогичный эксперимент на агаризованной среде с системой «*Escherichia coli* / бактериофаг». Факт проникновения генетического материала вирусов в клетки бактерий регистрировался визуально по диаметру зоны лизиса. Было показано что и фаг, и кишечная палочка сохранили жизнеспособность, хотя лизирующая способность вируса была значительно ниже, чем в контрольном опыте.

По итогам проведённых биологических экспериментов можно сделать вывод, что исследованные нами микроорганизмы могут быть использованы в качестве модельных объектов для исследования экстремальных физических факторов верхних слоёв атмосферы, в дальнейшем – и ближнего космоса. Целесообразно

дальнейшая разработка аппаратуры биомодулей микроспутников кубсат как платформы для биофизических исследований.

Динамика внутриклеточных окислительных-антиокислительных отношений в постэмбриональном развитии

Ибрагимов Ж.М.^{1*}, Мухтаров М.М.¹, Байрамова С.Д.¹

¹*Институт Физиологии им. А.И. Караева;*

Jaluzi2009@gmail.com

В последние десятилетия плотность электромагнитных полей в окружающей среде чрезмерно возросла, и как логическое следствие этого, поставлена задача изучения биологического воздействия этого ЭМИ-фактора, имеющего неионизирующую природу на первый план. ВОЗ указывает в своих документах, что последствия воздействия электромагнитного излучения на отдельных людей или на человеческую популяцию еще не ясны, поэтому необходимо активно соблюдать принцип раннего оповещения, чтобы обеспечить их безопасность. При исследованиях воздействия неионизирующего электромагнитного излучения на организм, выявляются признаки его окислительного стрессового фактора в ограниченные промежутки времени. Воздействие электромагнитной паутины на поле человека оказывает влияние на его мысли, поведение, физиологические функции и даже жизненный тонус. Имеется достаточно фактов, свидетельствующих о том, что длительное облучение живых организмов электромагнитным излучением (ЭМИ) дециметрового диапазона (нетепловая интенсивность) наблюдаются изменения в частности (в хрусталике глаза) и это служит одной из причин развития катаракты. Наша работа преследовала Цель Изучение влияния окислительного стресса, индуцированного электромагнитным излучением с частотой 460 МГц, на динамику интенсивности перекисного окисления липидов в хрусталике глаза в процессе дальнейшего развития у новорожденных белых крысят.

Материалы и метод. Новорожденных крысят (возраст 3-4 дня) облучали в металлической камере на физиотерапевтическом аппарате «Волна-2» при следующих условиях: выходная мощность 60 Вт, плотность потока энергии 10 мВт/см², в течение 20 минут. Контрольные новорожденные крысят подвергались «ложному» облучению. По истечению положенного срока (т.е 20 –ти и 30- ти) дневных крысят забивали и определяли концентрацию МДА в хрусталике. Уровни ПОЛ оценивали путем измерения концентрации малонового диальдегида. Достоверность результатов рассчитывали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследований. Наши исследования показали, что воздействие ЭМИ относительно низкой интенсивности на новорожденных крысят влияет на последующее развитие, во всяком случае, в возрасте 20 и 30 дней у него незначительно ослабевает окислительный ответ на облучение, относительно высокой интенсивности, иными словами в хрусталике сохраняется окислительно-восстановительный статус, обусловленный предоблучением. По показателю интенсивности перекисного окисления липидов можно говорить о новом окислительно-антиокислительном состоянии, созданном под влиянием ЭМИ в организме новорожденного в более поздний период развития, во всяком случае до 30-дневного возраста. Что касается физических изменений в хрусталике глаза здесь можно говорить о биохимических реакциях, суть которых сводится к модификации окислительно-восстановительных реакций и нарушению локального редокс-гомеостаза. В предыдущих своих исследованиях мы изучали различные аспекты этого явления.

Изменение биоэлектrogenеза микробных топливных элементов с течением времени под влиянием некоторых тяжёлых металлов

Гасюк О.А.^{1*}, Волченко Н.Н.¹, Самков А.А.¹, Худокормов А.А.¹, Лазукин А.А.¹

¹*Кубанский государственный университет;*

olgagasyuk2000@yandex.ru

Высокая антропогенная нагрузка в настоящее время вынуждает искать новые и эффективные способы очистки окружающей среды. Большое количество загрязнителей постоянно поступает в окружающую среду из различных источников. Среди наиболее опасных загрязнителей можно выделить углеводороды нефти, радиоактивные элементы, тяжёлые металлы, СПАВы и т.д. Одним из перспективных направлений в ремедиации окружающей среды является применение биологических агентов (микроорганизмы, растения, грибы и

некоторые животные). Биоремедиация – это процесс, при котором вредные загрязнители превращаются живыми организмами в нетоксичные соединения.

Микробные топливные элементы (МТЭ) являются прогрессивными биоинженерными системами, которые могут применяться, как альтернативный источник энергии, также для мониторинга и очистки окружающей среды, «интернет-вещей» и т.д. За счет происходящих в МТЭ биоэлектрохимических процессов они могут быть использованы в процессах биоремедиации. Для эффективного использования микробных топливных элементов в данных процессах окружающей среды необходимо выяснить: как те или иные поллютанты влияют на работоспособность МТЭ.

В данном исследовании конструировались микробные топливные элементы бентосного типа с электродами горизонтального и вертикального типов. В качестве основы для электродов использовалось углеводородное волокно «Карбопон» и графитовые стержни. Агентом биоремедиации выступала культура *Shewanella oneidensis* MR-1, полученная из ВКПРМ № В-9861 и аборигенная микробиота грунта, который использовался в качестве твердой фазы МТЭ. Штамм *Shewanella oneidensis* MR-1 был выбран для исследования, так как обладает электрогенной активностью и способен в анаэробных условиях восстанавливать катионы тяжёлых металлов до менее токсичного состояния, используя их в качестве акцепторов электронов. Электрогенный потенциал МТЭ под нагрузкой в 1 кОм фиксировался автоматическим вольтметром авторской конструкции Лазукина А.А. В качестве поллютантов использовались растворимые соли никеля, меди и свинца в концентрации 7 ПДК по каждому катиону. Длительность эксперимента составила 3 месяца.

В первые 10 суток эксперимента среднее значение электрогенного потенциала в МТЭ только с аборигенной микробиотой и с горизонтальными электродами составило: в присутствии солей Pb^{2+} – 325,4 мВ, Ni^{2+} – 368,1 мВ, Cu^{2+} – 135,1 мВ. В присутствии же *S. oneidensis* MR-1 среднее значение электрогенеза составило: Pb^{2+} – 250,1 мВ, Ni^{2+} – 380,8 мВ, Cu^{2+} – 413,2 мВ. Таким образом, в МТЭ с солями никеля, меди и шеванеллы значение электрического потенциала выше, по сравнению с МТЭ, в которых присутствует только аборигенная микрофлора. В МТЭ с вертикальными электродами в присутствии *S. oneidensis* MR-1 за первые 10 суток среднее значение биоэлектрогенеза составило: Pb^{2+} – 124,7 мВ, Ni^{2+} – 65,1 мВ, Cu^{2+} – 43,7 мВ. В итоге, электроды вертикальной конструкции показывают гораздо меньшее значение потенциала по сравнению с электродами горизонтального типа.

По прошествии трех месяцев эксперимента вновь производился анализ среднего значения биоэлектрогенеза микробных топливных элементов. В результате было получено, что в МТЭ с горизонтальными электродами и аборигенной микрофлоры среднее значение электрического потенциала в течении 10 суток составило: Pb^{2+} – 28,8 мВ, Ni^{2+} – 37,7 мВ, Cu^{2+} – 35,7 мВ. В МТЭ с горизонтальными электродами и в присутствии шеванеллы средние показатели напряжения за 10 суток составили: Pb^{2+} – 27,1 мВ, Ni^{2+} – 31,1 мВ, Cu^{2+} – 49,7 мВ. В микробных топливных элементах с вертикальными электродами и *S. oneidensis* MR-1 среднее значение биоэлектрогенеза за 10 суток составило: Pb^{2+} – 5,1 мВ, Ni^{2+} – 0,3 мВ, Cu^{2+} – 0,1 мВ.

Таким образом, по прошествии трёх месяцев наблюдается значительное снижение биоэлектрогенеза, что связано с токсичным действием тяжёлых металлов на микробиоту МТЭ. Так, в микробных топливных элементах с горизонтальными электродами и аборигенной микробиотой значение напряжения за три месяца снизилось: в присутствии Pb^{2+} – в 11,3 раз, Ni^{2+} – в 9,8 раз, Cu^{2+} – в 3,8 раз. В данной системе катионы меди оказали наименее губительный эффект на работу МТЭ. В МТЭ с горизонтальными электродами в присутствии *S. oneidensis* MR-1 значение биоэлектрогенеза по истечению трех месяцев было снижено: Pb^{2+} – в 9,2 раз, Ni^{2+} – 12,3 раз, Cu^{2+} – 8,3 раз. Здесь менее токсичный эффект на биоэлектрогенез был произведен аналогично солями меди. В МТЭ с вертикальными электродами и в присутствии микроорганизма *S. oneidensis* MR-1 величина электрогенеза за три месяца снизилась: Pb^{2+} – 24,5 раз, Ni^{2+} – 217 раз, Cu^{2+} – 437 раз. В результате, наименее негативный эффект на биоэлектрогенез МТЭ оказывают катионы свинца.

Таким образом, применении микробных топливных элементов в процессах биоремедиации и мониторинга окружающей среды возможно, но данные устройства являются не очень стабильными и показывают различные значения электрогенного потенциала в зависимости от вида поллютанта, его концентрации, типа электрода, состава микробиоты и т.д.

Изменение состояния фотосинтетического аппарата зеленой водоросли *Scenedesmus obliquus* при отдельном и совместном действии хлорида меди(II) и растворенного органического вещества

Воронова Е.Н.^{1*}, Дроздова О.Ю.²

¹МГУ имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет;

²МГУ имени М.В.Ломоносова, Геологический факультет;

vlena66@mail.ru

Загрязнение водной среды солями тяжелых металлов оказывает большое влияние на обитающие в ней организмы. Фитопланктон является первичным звеном в системе пищевых цепей в водной среде и определяет состояние водной экосистемы в целом. Тяжелые металлы оказывают влияние на многие метаболические процессы внутри клеток водорослей. Одним из наиболее чувствительных процессов к действию тяжелых металлов является фотосинтез.

Растворенное органическое вещество (РОВ) присутствует во всех водоемах. Большую часть РОВ составляют гуминовые кислоты. РОВ играет большую роль в защите микроводорослей от стресса, связанного с тяжелыми металлами. В присутствии РОВ может изменяться токсичность и биодоступность за счет образования комплексов с металлами. Роль РОВ в биохимическом поведении и токсичности тяжелых металлов для микроводорослей очень важна, но сложна и плохо изучена.

Измерение параметров флуоресценции хлорофилла позволяет на ранних стадиях выявить и определить причины снижения эффективности фотосинтеза клетками водорослей. Спектры поглощения света суспензий позволяют контролировать скорость роста водорослей. В природе организмы испытывают практически постоянный стресс со стороны различных природных факторов, поэтому для исследований действия токсикантов на тест-объекты необходимо создание дополнительной физиологической нагрузки (увеличение интенсивности освещения, дефицит минерального питания), не выходящей по интенсивности за пределы толерантности тест-объектов.

В работе рассмотрено влияние ионов Cu(II) в концентрациях от $5 \cdot 10^{-8}$ до 10^{-6} М и РОВ в концентрациях от 0.001 до 50 мгС/л на фотосинтетический аппарат зеленой водоросли *Scenedesmus obliquus*. Измерения параметров флуоресценции хлорофилла и спектров поглощения хлорофилла в суспензии проводили в течение 72 часов с момента инкубирования микроводорослей с токсикантом на безазотной среде при освещении (плотности потока квантов) 80 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹.

Через сутки после инкубации микроводорослей с солями Cu(II) в концентрациях от 10^{-7} до $5 \cdot 10^{-7}$ М интенсивность флуоресценции при открытых и закрытых реакционных центрах увеличивались незначительно по сравнению с контролем. Через 72 часа культивирования микроводорослей с солями Cu(II) в концентрациях $5 \cdot 10^{-8}$ – $5 \cdot 10^{-7}$ М значения параметров флуоресценции, величина нефотохимического тушения и относительное содержание хлорофилла не отличались от значений в контрольной культуре. При увеличении концентрации солей Cu(II) до 10^{-6} М через 24 часа в 4 раза возрастала величина нефотохимического тушения. Через 72 часа культивирования водорослей с солями Cu(II) в концентрации 10^{-6} М значения параметров флуоресценции, нефотохимического тушения и оптической плотности были в 4 раза ниже по сравнению с теми же значениями в необработанной суспензии водорослей. Значения переменной флуоресценции оставались во всех экспериментах высокими и были сравнимы с контрольными. При культивировании водорослей с РОВ в концентрации > 10 мгС/л снижались значения параметров флуоресценции F0 и Fm на 10-20%, увеличивалась величина нефотохимического тушения. Малые концентрации РОВ < 0.1 мгС/л не оказывали влияния на изменения параметров флуоресценции хлорофилла. При инкубации микроводорослей с РОВ в концентрации 0.25-1 мгС/л через 72 часа достоверно увеличивалось содержание хлорофилла (значения оптической плотности при D678) по сравнению с контролем. При культивировании водорослей с солями Cu(II) в присутствии РОВ наибольшее снижение токсического действия наблюдали при концентрации Cu(II) 10^{-7} - $5 \cdot 10^{-7}$ М и концентрации РОВ 1 мгС/л. Способность водорослей расти в присутствии токсикантов в среде обусловлена физиологической адаптацией и отбором устойчивых особей. РОВ в концентрациях, близких к природным, способно снижать токсическое действие тяжелых металлов.

Работа осуществлена при поддержке РНФ проект № 21-77-10028.

Измерение активности радионуклидов в пробах почв города Краснодара

Филиппов В.В.^{1*}

¹ФГБОУ ВО "Кубанский государственный университет";
slava.shor@mail.ru

Радиоактивные элементы естественного происхождения присутствуют повсюду в окружающей человека среде. В больших объемах искусственные радионуклиды образуются, главным образом в качестве побочного продукта на предприятиях оборонной промышленности и атомной энергетики. Попадая в окружающую среду, они оказывают воздействия на живые организмы, в чем и заключается их опасность [1].

В настоящее время на предприятиях атомной отрасли поступление в окружающую среду техногенных радионуклидов строго контролируется, но остается нерешенной проблема обеспечения экологической безопасности. В отдельных случаях наблюдается утечка радионуклидов и поступление их в окружающую среду, вовлечение в биологический круговорот с вытекающими последствиями. Данная работа посвящена изучению активности радионуклидов, поступивших в окружающую среду и оценке экологического состояния природной среды города Краснодара [2].

В ходе выполнения исследования были отобраны и изучены образцы почв г. Краснодара на глубине 0,5 м. Произведена первоначальная механическая очистка образцов от камней и биологических остатков.

Метод измерения активности основан на регистрации аппаратного спектра сцинтилляционным детектором гамма излучения («МУЛЬТИРАД-гамма», Россия), с последующей его обработкой при помощи специализированного программного обеспечения. Расчет активности, удельной активности и неопределенности измерения проводится программным обеспечением на основании измеренного спектра и массы счетного образца, определяемой посредством взвешивания.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что у образца «PROBA_10» (45.0223539°, 39.0308668°) показатели активности радионуклидов минимальны, а образец «PROBA_3» (45.0502849°, 38.9190679°) показал наивысший результат активности. В таблице видно, что полученные данные активности радионуклидов не превышают нормы постановления Главного государственного санитарного врача РФ от 07.07.2009 N 47 "Об утверждении СанПиН 2.6.1.2523-09" (вместе с "НРБ-99/2009. СанПиН 2.6.1.2523-09. Нормы радиационной безопасности. Санитарные правила и нормативы") (Зарегистрировано в Минюсте РФ 14.08.2009 N 14534). Что свидетельствует о благоприятной радиационной обстановке на территории города Краснодара.

Необходимо отметить, что радиационная безопасность населения является важным элементом национальной безопасности и подразумевает состояние защищенности настоящего и будущих поколений от вредного воздействия радиации и ее составляющих. Любое применение источников ионизирующего излучения в медицине, промышленности, сельском хозяйстве должно находиться под контролем и быть безопасным [3].

Литература

1. Котченко С.Г., Скипин Л.Н., Захарова Е.В., Бурлаенко В.З., Гаевая Е.В., Ознобихина А.О. Исследование влияния радиации на состояние почв // АБУ. 2017. №4 (158).
2. Колодка А. А. Измерение характеристик радионуклидов / А. А. Колодка, В. С. Гулин, В. В. Зюкин // Морской сборник. – 2017. – № 8. – С. 70-74.
3. Кайгородов Р. В. Удельная активность радионуклидов ¹³⁷CS и ⁹⁰SR в почвах прибрежных зон водных объектов Тюменской области / Р. В. Кайгородов // Успехи современного естествознания. – 2020. – № 9. – С. 66-70.
4. Ивлиева М. С. Изменение суммарной бета-активности радионуклидов на территории Тульской области / М. С. Ивлиева // Известия Тульского государственного университета. Технические науки. – 2021. – № 2. – С. 399-403.

Изучение сорбционных возможностей стронций-альгинатных гидрогелей, в том числе армированных углеродными нанотрубками, по данным элементного анализа и электронной микроскопии

Зуева О.С.^{1*}, Хаир Т.¹, Шайдуллин А.И.¹

¹Казанский государственный энергетический университет;
ostefzueva@mail.ru

Для развития инновационных технологий очистки различных водных сред требуются высокоэффективные адсорбенты, способные связывать опасные соединения, в том числе атомы тяжелых металлов. Решение аналогичных задач важно и для биомедицинских приложений. В качестве подобных адсорбентов могут быть

использованы гидрогели, приготовленные на основе природных биополимеров, в частности, на основе альгинатов двухвалентных металлов. Одним из наиболее перспективных материалов для экологических и биомедицинских приложений является альгинат стронция. Природный стронций встречается в виде смеси четырёх стабильных изотопов. Он входит в состав микроорганизмов, растений и животных и является малотоксичным элементом, по своим свойствам являющимся аналогом кальция. При попадании капель альгината натрия в раствор концентрированной соли хлорида стронция происходит соединение соседних полимерных цепей за счет возникновения ионных связей и комплексообразования между ионами стронция и карбоксильными группами альгинатных цепей, приводящее к появлению гелевых микросфер [1]. Подобный гидрогель, а также материалы, полученные на основе лиофильно высушенных гелевых микросфер, обладают хорошими сорбционными свойствами. Целью данного исследования явилось изучение сорбционных возможностей стронций-альгинатных гидрогелей, в том числе при наличии углеродных нанотрубок, добавляемых в гидрогели для усиления их механической прочности [2,3], по данным элементного анализа и электронной микроскопии.

При добавлении катионов щелочноземельных металлов, в частности стронция, происходит попарное соединение линейных альгинатных цепей и образование плоских зон соединения. Структура этих зон согласно «egg-box» модели состоит из ячеек различных типов. Альгинат является натуральным сополимером, имеющим нерегулярную блочную структуру, состоящую из единиц различных уроновых кислот: М (маннуровой) и G (гулуровой), причем обычно число единиц М преобладает над числом единиц G. Пространственные структуры, образуемые блоками MM, MG, GG и тем более ячейками из попарно соединенных блоков в каждом димере, различаются достаточно сильно, несмотря на то, что химическая формула альгиновой кислоты для М и G единиц одинакова. Для блока из любых двух единиц, ее можно записать в виде $(C_{12}H_{14}O_{12}Na_2)_n$. После сшивки ионами стронция эта химическая формула преобразуется к виду $(C_{12}H_{14}O_{12}SrX)_n$. Символом X обозначено количество ионов двухвалентного металла на блок из двух мономерных единиц C12. Предельное теоретическое значение этого количества ионов, соответствующее полностью заполненным ячейкам egg-box листа равно 1. Наблюдаемое в эксперименте значение X оказалось меньшим единицы, что говорит о том, что щелочноземельный стронций заполняет не все ячейки «egg-box» листа. Часть ячеек остается вакантной и может быть занята адсорбируемыми ионами тяжелых металлов [4].

Данные элементного анализа лиофильно высушенных гелевых микросфер показали, что среднее число заполнения ячеек примерно равно $X = 0.64$, т.е. 36 % ячеек может дополнительно адсорбировать ионы тяжелых металлов за счет координационной связи. Однако, согласно тем же данным, кроме химических связей с альгинатами существуют возможности для физической адсорбции определенных ассоциатов, которые могут удерживаться вблизи альгинатных цепей за счет более слабых (в основном, Ван-дер-Ваальсовских) взаимодействий. В частности, в рассматриваемом случае наблюдалась дополнительная физическая адсорбция SrCl₂, соответствующая 1.42 указанных единиц на каждый блок C12, указывающая на хорошие сорбционные возможности альгината стронция.

Исследование армированных углеродными нанотрубками гелевых микросфер показало существенную разницу в результатах. В частности, число заполнения ячеек «egg-box» листа возросло до $X = 0.81$, что говорит о возникновении более упорядоченной структуры из альгинатных цепей, приводящей к уменьшению возможной адсорбции ионов тяжелых металлов и их дальнейшей координационной связи с альгинатом. Тем не менее, число мест дополнительной физической адсорбции SrCl₂ увеличилось и стало соответствовать 1.97 указанных единиц на каждый блок C12. Таким образом, добавление углеродных нанотрубок в структуру гидрогеля изменяет их сорбционные возможности, приводя, в первую очередь, к увеличению физически адсорбируемых молекул.

1. A.O. Makarova, L.R. Bogdanova, O.S. Zueva. Use of Natural Biopolymers to Create Nanocomposite Materials. *Solid State Phenomena*. 2020, 299, 299-304.

2. A.T. Gubaidullin, A.O. Makarova, S.R. Derkach, N.G. Voron'ko, A.I. Kadyirov, S.A. Ziganshina, V.V. Salnikov, O.S. Zueva, Y.F. Zuev. Modulation of Molecular Structure and Mechanical Properties of κ-Carrageenan-Gelatin Hydrogel with Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Polymers*. 2022, 14(12), 2346.

3. A.O. Makarova, S.R. Derkach, A.I. Kadyirov, S.A. Ziganshina, M.A. Kazantseva, O.S. Zueva, A.T. Gubaidullin, Y.F. Zuev. Supramolecular Structure and Mechanical Performance of κ-Carrageenan-Gelatin Gel. *Polymers*. 2022, 14(20), 4347.

4. C. Kong, X. Zhao, Y. Li, S. Yang, Y.M. Chen, Z. Ion-Induced Synthesis of Alginate Fibroid Hydrogel for Heavy Metal Ions Removal. *Frontiers in Chemistry*. 2020, 7, 905.

Исследование влияния углеродных наночастиц на зеленые микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*

Тодоренко Д.А.^{1*}, Гвоздев Д.А.¹, Цораев Г.В.¹, Байжуманов А.А.¹, Лукашев Е.П.¹, Маторин Д.Н.¹
¹МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики;
dariatodor@mail.ru

Углеродные наноматериалы привлекают внимание исследователей с 80-х годов двадцатого столетия благодаря своим уникальным свойствам и возможностью применения в различных областях. Обычно под углеродными наноматериалами понимают наноалмазы, фуллерены и углеродные нанотрубки, однако, в настоящее время термин значительно расширился за счет появления различных типов углеродных наночастиц (УНЧ), которые первоначально были описаны как люминесцентные фрагменты углеродных нанотрубок. УНЧ разделяют на углеродные наноточки (cNDs), которые обладают аморфной структурой и не проявляют квантово-размерных свойств, сферические углеродные квантовые точки (cQDs) и графеновые квантовые точки (GQD). Широкое производство и использование УНЧ в различных областях, а также образование УНЧ в качестве побочных продуктов антропогенной деятельности ведет к неизбежному загрязнению окружающей среды. В то же время, их воздействие на живые организмы еще недостаточно изучено. В настоящей работе мы исследовали влияние УНЧ, синтезированных нами электрохимическим (GQD), гидротермальным (hND) и микроволновым методами (mND), на зеленые микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. В присутствии УНЧ наблюдали снижение скорости роста *S. quadricauda*. Ингибирование роста клеток в большинстве случаев имело дозозависимый эффект, что позволило установить полумаксимальную эффективную концентрацию (EC50) за 72 ч для GQD и hND – $3,63 \pm 0,8$ мкМ (или 140 ± 30 мг/л) и $1,76 \pm 0,21$ мкМ (или 80 ± 10 мг/л), соответственно. В отличие от GQD и hND углеродные наночастицы, полученные микроволновым методом (mND), не обладали выраженными дозозависимыми эффектами; поэтому невозможно было определить EC50 для данного типа УНЧ. Нами показано, что синтезированные УНЧ способны адсорбироваться на клеточной стенке водорослей благодаря большому количеству функциональных групп на поверхности наночастиц. Мы не выявили какой-либо специфической токсичности полученных УНЧ, которая могла бы быть связана с окислительным стрессом. Фотосинтетическая активность микроводорослей, определенная по максимальному квантовому выходу (Fv/Fm), также существенно не изменялась. Полученные данные свидетельствуют о том, что синтезированные УНЧ не влияют на фотохимию ФС2 культуры *S. quadricauda*. Мы считаем, что основным фактором, снижающим скорость роста микроводорослей в суспензии, является ограничение доступного светового потока за счет поглощения света наночастицами (эффект затенения). Полученные данные могут быть использованы для оценки и прогнозирования взаимодействия углеродных наночастиц с клетками микроводорослей, что позволит снизить неблагоприятное воздействие на водные экосистемы в будущем.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (№ 22-11-00009) и междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды».

Исследование действия гербицида раундап (глифосат) на пероксидазу хрена

Авдеева Л.В.², Вахтерова Я.В.^{1*}, Саратовских Е.А.²
¹МГУ;

²Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН,
 Черноголовка, Россия;
vahterova_yana@mail.ru

Исследовано влияние гербицида раундапа (Рп) или глифосата (Гл) на пероксидазу хрена (ПО). Рп является самым распространённым препаратом по объёму производства и применения в практике сельского хозяйства в мире. Однако Рп оказывает токсическое действие на живые организмы всех трофических уровней; у людей вызывает множество патологий: нарушения в работе печени, почек, онкологические заболевания. В марте 2015 г. Международное агентство по изучению рака ВОЗ, обнародовало заключение, о том, что Гл является «возможным канцерогеном для человека» (категория опасности «2А»). В заключении приводятся данные о повышенном уровне развития неходжкинской лимфомы у работающих с Гл [1]; о развитии рака у лабораторных крыс и мышей [2,3]; о способности Гл повреждать ДНК и вызывать абберации хромосом в клетках человека и животных, культивируемых *in vitro*; а также приводить к повышению частоты хромосомных повреждений (микроядер) в клетках крови [3].

Считается, что Рп ингибирует 5-сноилпирувил-шикимат-3-фосфат-синтазу (КФ 2.5.1.19) [4]. Однако ранее было показано, что Рп ингибирует активность фермента НАДН-оксидоредуктазы, катализирующего многие окислительно-восстановительные (ред-окс) реакции [5]. Естественно вставал вопрос о способности ред-окс системы организма растения или животного окислять и обезвреживать данное химическое токсичное соединение. Способность объектов окружающей среды к самоочищению, т.е. разложению загрязняющих веществ, во многом определяется протеканием ферментативных ред-окс процессов в клетках растений и микроорганизмов. Поэтому мы исследовали действие Рп именно на окислительный фермент.

Выбор фермента обусловлен тем, что пероксидазы (КФ 1.11.1.X) относятся к ферментам основной антиоксидантной системы, разрушающей пероксид водорода и окисляющие широкий спектр субстратов. Обычно пероксидазы функционируют в присутствии пероксида водорода.

Гербицид Рп (или Гл) имеет множество коммерческих названий, но в качестве действующего вещества – это химическое соединение N-(фосфонометил)-глицин, C₃H₈NO₅P (N-ФМГ). В связи с этим, мы проводили работы с действующим веществом N-ФМГ, который выделяли из коммерческого препарата Рп двойной перекристаллизацией из воды.

В качестве субстрата был выбран гидрохинон (ГХ), который относится к группе быстро окисляемых субстратов ПО. В работе изучена кинетика окисления ГХ пероксидазой хрена в присутствии Рп. Окисление ГХ регистрировали на спектрофотометре PerkinElmer UV-VIS Spectrometer «Lambda EZ 210», производства США по уменьшению поглощения при длине волны $\lambda = 290$ нм. Условия проведения экспериментов: ГХ (0,05–0,4·10⁻³ М), H₂O₂ (0,64·10⁻³ М), пероксидаза хрена (15·10⁻⁹ М), 0,05 М Na-ацетатный буфер, pH 5,4, T = 250С.

В предварительном исследовании установлена устойчивость как ГХ, так и Рп в условиях проведения экспериментов и отсутствие взаимодействия между ними.

В ходе исследования определены следующие кинетические параметры ПО в реакции окисления ГХ: константа Михаэлиса K_m (по ГХ) для системы I (ГХ + H₂O₂ + ПО) и для системы II в присутствии Рп (ГХ + H₂O₂ + ПО + Рп) составляет 0,168 мкМ; V_{max} для системы I составляет 4,31 мкМ/с и в присутствии Рп для системы II 3,44 мкМ/с.

Тип ингибирования и константу ингибирования определяли в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка. Показано, что Рп проявляет неконкурентный тип ингибирования по отношению к окисляющему ферменту ПО.

Впервые показано, что N-ФМГ ингибирует ферментативной активности пероксидазу из корней хрена. Данный результат является серьёзным дополнением к имеющимся литературным данным о мишенях, на которые направлено действие раундапа.

Полученные результаты доказывают, что N-ФМГ блокирует работу антиоксидантной системы, что в теплокровных организмах может явиться причиной накопления свободных радикалов, и онкологических перерождений тканей и органов.

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием № 0089-2019-0014 (№ государственной регистрации АААА-А19-119071890015-6).

1. Guyton K.Z., Loomis D., Grosse Ya., et all. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate // The Lancet, 2015. V. 16, no. 5. P. 490-491. doi:10.1016/S1470-2045(15)70134-8

2. Cressey D. Widely used herbicide linked to cancer // Nature. 2015. doi:10.1038/nature.2015.17181

3. IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization (20 March 2015).

4. Кузнецова Е.М., Чмил В.Д. Глифисат: поведение в окружающей среде и уровни остатков // Современные проблемы токсикологии. Киев, 2010. № 1. С. 87-95.

5. Саратовских Е.А., Коршунова Л.А., Гвоздев Р.И., Куликов А.В. Ингибирование НАДН-оксидоредуктазной реакции гербицидами и фунгицидами различного строения // Известия АН. Сер. хим. 2005. № 5. С. 1284–1289.

Комплекс флуориметрических приборов для диагностики функционального состояния фотосинтезирующих организмов в природной среде

Конюхов И.В.^{1*}, Погосян С.И.¹

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, каф. биофизики;
vanka.kon@gmail.com

Регистрация сигналов переменной флуоресценции хлорофилла – важный неинвазивный метод изучения фотосинтетических реакций в живых растениях. В настоящее время в серьезной лабораторной экспериментальной работе с фотосинтезирующими организмами (высшими растениями, одно- и многоклеточными водорослями, лишайниками и цианобактериями) используют флуориметры с наиболее широким

функционалом, т.н. РАМ-флуориметры немецкой фирмы Walz, где исследователь, за счет использования нескольких независимых источников света, может оказывать различного рода контролируемые воздействия на электронный транспорт между фотосистемой 2 и фотосистемой 1. Наиболее характерным признаком прибора РАМ является наличие модулированного в диапазоне нескольких килогерц слабого измерительного света (десятые и сотые доли мкмоль·м⁻²·с⁻¹). С одной стороны, такой пучок света гарантирует пренебрежимо малое собственное влияние на фотосинтетический электронный транспорт, на процессы регуляции фотосинтеза и на квантовый выход (интенсивность) флуоресценции хлорофилла. Но с другой стороны, низкая интенсивность измеряющего пучка существенно ограничивает область применения прибора, когда речь заходит о необходимости измерений флуоресценции в природных условиях – например в открытой для прямых солнечных лучей измерительной камере или при низком содержании хлорофилла, характерного для естественных водоемов.

В докладе представлен комплекс флуориметров, созданных на кафедре биофизики и построенных на несколько иной технологии управления источником возбуждения флуоресценции – на т.н. принципе «fast-repetition-rate». При помощи единственного мощного источника света он позволяет измерить кривые индукции и релаксации флуоресценции с высоким отношением сигнал/шум даже в присутствии интенсивного и зашумленного фона естественной облученности и определить фотохимический квантовый выход ФС2 (отношение Fv/Fm). FRR-флуориметры также могут провести предварительную адаптацию объекта к актиничному облучению и измерить световые кривые нефотохимического тушения (NPQ) и относительной скорости электронного транспорта (ETR), характеристики которых в большой степени зависят от температуры, от видовой принадлежности растения или видового состава фитопланктона и от условий их длительного предварительного содержания.

Удобство пользования приборами и точность измерений флуоресценции в природных условиях также существенно увеличены за счет специализированного программного обеспечения, созданного на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ.

Комплекс приборов включает в себя:

- портативный флуориметр "Smart 8" с затемненной измерительной камерой и кюветой под образец воды на 50мл с возможностью термостатирования и дополнительной регистрацией кривой индукции замедленной флуоресценции на пробах фитопланктона;
- портативный прибор "Smart 4" без кюветного отделения для регистрации сигналов от объектов, находящихся в условиях естественной облученности, и от суспензий микроводорослей в прозрачных колбах или фотобиореакторах;
- портативный прибор "Tubby FRR" с 4мл флаконом для фитопланктона и культур водорослей с содержанием хлорофилла не менее 5мкг/л и для количественного определения содержания хлорофилла «а» в ацетоновом экстракте;
- лазерный флуориметр во всепогодном исполнении с длинноволновым возбуждением (650nm) для круглогодичной регистрации флуоресценции на молодых побегах (ветвях) древесных растений;
- микроскоп с FRR протоколом возбуждения флуоресценции от отдельных клеток фитопланктона.

Особенности каждого прибора представлены на примерах исследовательской работы *in situ* с образцами морской воды, с лишайниками и листьями при круглосуточных наблюдениях на улице, а также с одноклеточными водорослями в процессе культивирования и в экспериментах по биотестированию.

Космофизические факторы и биоритмы растений

Кашулин П.А.^{1*}, Калачева Н.В.¹

¹ Полярно-альпийский ботанический сад-институт РАН;
falconet1@yandex.ru

Исследовали особенности многодневной динамики настических движений оранжерейных растений *Marantha leoconeura* и *Stenanthe setosa* во время спокойной «космической погоды» и в периоды повышенной солнечной активности. Некоторые виды марантовых восприимчивы к изменению атмосферного давления и другим факторам, меняя пространственное положение листовых пластинок в течение суток. Растения культивировали в стандартных лабораторных условиях при комнатной температуре, ежедневно измеряя углы наклона листовых пластинок в полдень и вечернее время. Для селективной оценки роли факторов космического и геофизического происхождения [1] в физиологических реакциях растений анализировали невосприимчивые к наземным экологическим факторам системы. В параллельных опытах фиксировали исходы случайных процессов с двоичным выбором (бросание монет) и анализировали работу генератора случайных чисел SRP-285II «CITIZEN». Ежедневно, в дневное и вечернее время анализировали интенсивность отклонений от теоретически ожидаемых и наиболее вероятных значений. В норме при генерировании десяти чисел вероятность появления

чисел с пятью разными первыми цифрами близка к трем [2]. Солнечную активность анализировали по радиоизлучению 10,7 см, суточным значениям чисел Вольфа и общей площади видимых солнечных пятен. В работе использовали данные нейтронного монитора и измерений гамма излучения на базе Полярного геофизического института РАН. Спектральный анализ многодневной динамики измеряемых параметров показал наличие септанных и семисептанных циклов, то есть циклов с периодом около недели и около её половины у амплитуд суточных отклонений угла листовых пластинок растений. Такие ритмы характерны для периодов низкой солнечной активности на минимуме основного цикла. Рост солнечных возмущений, сопровождавшихся корональными массовыми выбросами (СМЕ) в 2022 году и в начале текущего года, вызывал нарушения ритмики растений. Параллельно отмечали изменение распределения протяженности серий одинаковых исходов в опытах с двоичным выбором. А также - флуктуации ожидаемых значений чисел с разными цифрами при их случайной генерации от ожидаемых трех до нуля или, наоборот, до семи. Отклонения зафиксированы для ряда околоземных геофизических возмущений, сопровождающихся флуктуациями гамма-излучения, последнее - 19 января и Ройбуш-понижениями, соответственно 21 января и 8 февраля. Результаты подтверждают восприимчивость высших цветковых растений к геокосмическим факторам, установленную ранее [3]. В условиях спокойной «космической погоды» наблюдали устойчивую циркадную цикличность настических движений растений и появление различий дневных и вечерних результатов опытов с «неживыми» механическими и электронными системами. Что может указывать на общие причины таких различий с суточной динамикой интенсивности радиоактивного распада изотопов, подробно изученных в работах С.Э. Шноля [4].

1. Breus T.K., Cornelissen G., Halberg F., Levitin A.E. Temporal associations of life with solar and geophysical activity // *Annales Geophysicae* 1995. V. 13. No 3. P. 1211-1222.

2. Feller W. An introduction to probability theory and its applications (1970) John Wiley & Sons, Vol. 1, p. 51. 1970. New York, Chichester, Brisbane, Toronto.

3. Кашулин П.А., Калачева Н.В. Опережающие реакции сосудистых растений на интенсивные корональные массовые эмиссии Солнца в сторону Земли // *Физика авроральных явлений. Мат-лы. XLI Ежегодного Семинара, Апатиты, 2018. С. 207-210.*

4. Шноль С.Э. Форма спектра, реализуемого в ходе макроскопических флуктуаций, зависит от вращений Земли // *Биофизика*. 1995. Т. 40. №. 4. С. 861-874.

Модель функционирования популяции фитопланктона в краевых арктических морях в летний период

Фурсова П.В.^{1*}, Ризниченко Г.Ю.¹, Конюхов И.В.¹, Погосян С.И.¹

¹МГУ, биологический факультет;

fursova@biophys.msu.ru

Солнечный свет и доступность минерального питания являются основными факторами, обеспечивающими существование сообществ фитопланктона. Их воздействие в первую очередь оказывает влияние на фотосинтетическую активность, которую можно оценить с помощью флуоресцентных методов. Измеряя параметры флуоресценции хлорофилла водорослей, можно определить потенциальную эффективность (КПД) фотосинтеза, выяснить её зависимость от света различной интенсивности, обнаружить дефицит элементов минерального питания, установить степень адаптации водорослей к интенсивности света в зоне обитания фитопланктона. По данным исследований, проведенных в ходе экспедиций в бассейнах Карского моря и моря Лаптевых, измерения *in situ* содержания хлорофилла флуориметрическим методом демонстрируют разнообразные распределения по глубине [1]. Его максимум может находиться вблизи поверхности и на глубинах ниже скачка плотности воды или в верхнем и нижнем слоях одновременно. При этом часть клеток из проб верхнего горизонта демонстрирует адаптацию к темновым условиям, а из проб нижнего – к высокой освещенности. Необходимо отметить, что в летний период существенную часть биомассы фитопланктона арктических морей составляют диатомовые водоросли, которые не способны к активному перемещению. А водная толща представляет собой два практически не перемешивающихся слоя воды – верхний опресненный, дефицитный по биогенным элементам, и нижний, более соленый и обогащенный биогенами. Верхний слой воды достаточно хорошо освещен, в нижнем слое интенсивность света слишком низкая для фотосинтеза. Возникает естественный вопрос: как поддерживаются в стационарном состоянии популяции диатомовых водорослей в такой системе? В математических моделях вертикальное перемещение фитопланктона в отсутствие направленного переноса может быть описано, например, турбулентной диффузией [2, 3]. Однако, в условиях стратификации водной среды, этот процесс не может объяснить наблюдаемых распределений. В настоящей работе выдвигается следующая гипотеза о поведении клетки диатомовой водоросли [4]. В освещенном слое воды она накапливает биомассу за счет фотосинтеза. При этом клетка увеличивает свою плотность, сохраняя объем, обусловленный наличием твердых кремниевых створок. С увеличением плотности клетка постепенно опускается

до тех пор, пока ее плотность не сравняется с плотностью более соленой и плотной воды. В этом слое, богатом минеральными веществами, клетка восполняет свои внутриклеточные запасы. Оказавшись в условиях отсутствия света, клетка начинает тратить накопленные углеводы на различные метаболические процессы, в том числе дыхание. Выделяющийся углекислый газ удерживается вокруг клетки в образующемся слизевом мешке. При этом удельная масса этого «образования» (клетка+«мешок») постепенно падает. По достижении критического значения плотности клетка всплывает на поверхность, а пузырек газа схлопывается.

На основании предложенной гипотезы в среде NetLogo (<http://ccl.northwestern.edu/netlogo/>) построена агентная модель динамики численности популяции фитопланктона. Совокупность клеток-агентов разделена на две группы – верхнюю и нижнюю. Для каждой клетки возможны деление; смерть; переход из одной группы в другую; перемещение. Клетки верхней группы фотосинтезируют, увеличивая плотность и расходуют внутриклеточные минеральные вещества. Клетки нижней группы пополняют внутриклеточные запасы и осуществляют основной обмен веществ. При этом уменьшается их плотность. Среда разделена на 2 слоя. В верхнем содержание питательных веществ принимается равным нулю, интенсивность света падает по вертикали в соответствии с экспоненциальным законом. В нижнем слое освещенность отсутствует, питательные вещества распределены равномерно, находятся в достатке, их содержание не изменяется при потреблении клетками-агентами.

Проведено исследование поведения решений модели в зависимости от ключевых параметров: уровня приповерхностной освещенности и расстояния, на которое клетки смещаются в случайном направлении в каждый момент времени. Изменяя эти параметры, можно получить различные распределения клеток – численности в верхнем и нижнем слоях – характерные для экспедиционных наблюдений. При небольших случайных смещениях клеток популяция демонстрирует периодическое изменение численности. Постоянное преобладание клеток в одном из слоев или последовательная смена доминирования определяется заданной освещенностью. Перемещение клеток на большие расстояния, сглаживают колебания численности популяции. Модельный эксперимент демонстрирует уменьшение общей численности клеток в сравнении с аналогичным экспериментом в отсутствие значительных перемещений клеток, поскольку снижается «доступность» солнечного света. В условиях более высокой приповерхностной освещенности общая численность клеток, перемещающихся на большие расстояния, становится выше, так как они оказываются в меньшей степени подверженными фотодеструкции. Динамика численностей в каждом из слоев также изменяется: при нормальном уровне освещенности максимумы численностей верхних и нижних клеток сменяют друг друга, что характерно для слабо перемещающихся клеток в условиях пониженной освещенности. Дальнейшие исследования будут направлены на уточнение параметров модели и более детальное сравнение результатов с экспериментальными данными.

Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500060-0.

1. Экосистемы Карского моря и моря Лаптевых. Экспедиционные исследования 2016 и 2018 гг./ ИО РАН. – М.: Издатель Ерхова И.М., 2021. – 368 с.

2. Абакумов А.И., Израильский Ю.Г. Влияние условий среды на распределение фитопланктона в водоеме // Матем. биология и биоинформ., 2012, Т. 7(1), 274–283.

3. Belyaev V.I. Modelling the influence of turbulence on phytoplankton photosynthesis // Ecol.Modelling, 1992, V.60, 11-29.

4. Фурсова П.В., Ризниченко Г.Ю., Конюхов И.В., Погосян С.И. Агентная модель динамики численности популяций диатомовых водорослей краевых арктических морей в летний период (гипотеза) // Океанология, 2023 (в печати).

Мониторинговые исследования флуоресцентных параметров и биохимических компонентов *Hedysarum daghestanicum* L

Пиняскина Е.В.^{1*}

¹*Прикаспийский институт биологических ресурсов ДФИЦ РАН, Махачкала, Россия;*
elpin1@yandex.ru

Рост растений контролируется множеством физиологических, биохимических и молекулярных процессов, а фотосинтез является ключевым процессом, который вносит существенный вклад в рост и развитие растений. Измерение и анализ параметров флуоресценции хлорофилла а позволяет изучить реакции фотосинтетического аппарата в условиях стресса и оценки адаптационных возможностей растений. Целью исследования было комплексное изучение биохимического состава и флуоресцентных показателей копеечника дагестанского (*Hedysarum L. Daghestanicum*) - узколокального эндемика Дагестана, произрастающего на аридных участках каменистых склонов от 320 до 1800 м над у. м. с низким уровнем увлажненности и высоким уровнем инсоляции. При мониторинге *Hedysarum daghestanicum* были исследовали флуоресцентные параметры как при

темновой адаптации (для определения потенциальных возможностей растения), так и в естественных условиях измеренные на свету. Максимальный квантовый выход фотосинтеза (F_v/F_m) весьма высок и приближается к теоретически возможному. Относительная скорость нециклического электронного транспорта по ETR у растений высока, что позволяет поддерживать фотосинтез на необходимом уровне. Потери избыточной энергии в виде максимальной флуоресценции не велики и составляют 15%, в то время, основная часть поглощенного света с огромной скоростью идет на фотохимию. Согласно полученным данным, потенциальный уровень реализации энергии в фотохимию составляет около 80%, регулируемых потерь ($Y(NPQ)$) - 20%, не регулируемых $Y(NO)$ - 12%. Высокий уровень $Y(NPQ)$ означает, что потоки избыточной энергии хорошо регулируются (за счет работы ΔpH и зеаксантин-зависимых механизмов) и избыточная энергия возбуждения безопасно рассеивается на уровне антенны.

Проведенный качественный и количественный анализ фотосинтезирующих пигментов копеечника дагестанского показал, что содержание Хл а составляет 64% (от общего), соотношение Хл а/б \approx 3,22, а Хл (а+б)/Кар \approx 5,5, что характерно для светолюбивых растений. Аминокислотный анализ выявил 13 аминокислот 7 из которых обладают антиоксидантными свойствами, причем, их содержание в подземной части гораздо выше, чем в надземных частях. Суммарное содержание аминокислот в корнях копеечника дагестанского оставила 19%, содержание пролина составило 33% от общего содержания, а в надземных частях 85%. Кроме того, идентифицированы вторичные метаболиты флавоновой и изофлавоновой природы (кофейная кислота и лютеолин-7-О-глюкозид и лютеин, генистеин и формонетин) которые растения используют для преодоления стрессовых ограничений, адаптируясь к изменяющейся среде.

Проведенные комплексные исследования показали высокую адаптивность копеечника дагестанского к абиотическим стресс факторам: мезофит, растущий в условиях сильной инсоляции и недостатка влаги, имеет комплекс специфических анатомических, морфологических, физиологических адаптаций, которые направлены на минимизацию амплитуды изменений физических параметров окружающей среды, предотвращающих разрушение клеток или их органелл.

О циркуляции высших животных под действием физических условий внешней среды

Брацун Д.А.^{1*}, Костарев К.В.¹

¹*Пермский национальный исследовательский политехнический университет;*
dmitribratsun@rambler.ru

Коллективное поведение в сложных биологических системах может выступать в роли механизма сохранения энергии и играть ключевую роль при выживании группы организмов [1]. Одним из хорошо известных примеров такого рода является биоконвекция, которая наблюдается в растворах с аэробными микроорганизмами *Bacillus subtilis* и свободной поверхностью. Инстинктивное движение бактерий по градиенту кислорода приводит среду к фазовому переходу второго рода, запускающему макроскопическое упорядоченное движение элементов среды. Явление биоконвекции легко интерпретируется в рамках синергетической парадигмы Пригожина и имеет ту же конвективную природу, что и неустойчивость Рэлея-Бенара, т.е. может быть полностью объяснена в рамках физической концепции. Подобные явления в среде высших животных гораздо труднее дифференцировать от социального поведения в группе, поэтому они плохо изучены. Например, сложные колебательные движения наблюдаются у птиц, рыб, оленей. Но простого объяснения этим явлениям на основе физических механизмов здесь уже не достаточно, так как основным триггером такого поведения является социальная адаптация, а не безусловный рефлекс. В данной работе мы впервые указываем на одно важное исключение, когда представители высших животных демонстрируют коллективное поведение, которое имеет даже большее сходство с явлением классической тепловой конвекции жидкости, чем биоконвекция микробов. Речь идет об адаптационном поведении императорских пингвинов (лат. *Aptenodytes forsteri*) во время зимовки в Антарктиде. До последнего времени особенности жизненного цикла этого вида были изучены крайне плохо из-за трудного доступа в зону их проживания. Кроме того, самое интересное происходит зимой, когда условия существования в ареале обитания императорских пингвинов становятся одними из самых жестких на планете. Тем не менее в работе [2] было экспериментально установлено, что в коллективном поведении участвуют сотни особей, а внутри плотной стаи устанавливается комфортная температура. Там же предложена концепция, которая ставит соответствие между перестройками в стае пингвинов и фазовыми переходами первого рода.

В данной работе мы исследуем эффект внезапного оживления плотной среды пингвинов, при котором возникает макроскопическая циркуляция птиц от края группы к её центру и обратно. Мы впервые предлагаем математическую модель явления, которая опирается на гипотезу о том, что эффективная подъемная сила в стае генерируется градиентом температуры (аналог тепловой конвекции). Модель сформулирована как в рамках микроскопической теории, так и в рамках сплошнородного подхода. В первом случае особи в модели представлены в виде совокупности дискретных тел, взаимодействующих друг с другом в соответствии с

эффективным потенциалом, вид которого зависит как от физических эффектов, так и от социо-физических процессов в стае. Управляющими параметрами задачи являются температура окружающей среды и скорость ветра. Показано, что дискретная модель с индивидуальной динамикой элементов воспроизводит большинство явлений, наблюдаемых в стае императорских пингвинов в естественных условиях. Например, продемонстрирован фазовый переход к вихревому движению при понижении температуры внешней среды, а также асимметрия паттерна в случае бокового ветра. Обнаружено также, что ожигение плотной стаи происходит сначала локально, при этом большая часть животных не циркулирует. Такое поведение сходно с явлениями в гранулированной среде, в которой также могут сосуществовать разные агрегатные состояния среды.

В рамках второго подхода была разработана модель жидкой среды с эффективной силой взаимодействия между элементами среды. Показано, что математическая модель явления может быть сведена к уравнению самогравитирующего пористого диска, насыщенного несжимаемой жидкостью, которая генерирует тепло. В приближении Дарси-Буссинеска выведены определяющие уравнения, сформулирована нелинейная краевая задача. Получено точное решение линеаризованной задачи для бесконечно малых возмущений основного состояния, вычислены критические значения управляющего параметра для начала макроскопической циркуляции. Для конечных возмущений краевая задача решалась численно с помощью метода конечных разностей. Показано, что в случае осевой симметрии наиболее опасной является четырех-вихревая циркуляция. При наличии ветра, нарушающем симметрию задачи, наиболее опасным становится двух-вихревая конвекция пингвинов.

Таким образом, наблюдаемое явление можно трактовать как фазовый переход второго рода схожий с механизмом тепловой конвекции, в котором стремление пингвинов двигаться к максимуму температуры выполняет роль эффективной подъёмной силы. Авторам данной работы не известен другой пример макроскопической циркуляции, вызванной физическими процессами в среде, составленной высшими животными. Вовлечение пингвинов в коллективный процесс, протекающий под управлением внешних физических явлений, может быть объяснен слишком жесткими условиями существования стаи во время полярной зимовки. Любой отход отдельных особей от жесткой программы поведения стаи наказывается смертью.

Проведено сравнение результатов теории, полученных в рамках микроскопической теории и сплошнородного подхода, а также сравнение с результатами экспериментальных наблюдений за императорскими пингвинами в Антарктике.

Работа финансово поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (грант № FSNM-2020-0026).

Литература

[1] Trenchard H., Perc M. Energy saving mechanisms, collective behavior and the variation range hypothesis in biological systems: a review // *BioSystems*. 2016. Vol. 147. P. 40-66.

[2] Richter S., Gerum R., Winterl A., Houstin A., Seifert M., Peschel J., Fabry B., Le Bohec C., Zitterbart D. P. Phase transitions in huddling emperor penguins // *J. Phys. D Appl. Phys.* 2018. Vol. 51. No. 21. 214002.

[3] Bratsun D., Kostarev K. A continuum model of bioconvection with a centripetal force // *Bulletin of Perm University. Physics*. 2022. No.2. P. 36-46.

Определение сезонных вариаций газо-воздушного обмена в семьях пчел в зависимости от их физиологического состояния с использованием стабильных изотопов углерода ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)

Кузьмичев В.Е.^{1*}, Зякун А.М.².

¹*Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского;*

²*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пуццо*
vekoff@yandex.ru

Целью работы было проведение количественного анализа газо-воздушной среды в семьях пчел в зависимости от их физиологического состояния и факторов внешней среды на основе количественных масс-спектрометрических измерений, в том числе, измерений вариаций распространенностей стабильных изотопов углерода ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$).

На первом этапе исследований нами разработана принципиально новая эффективная технология контроля физиологического состояния целостного пчелиного сообщества на внешние факторы. Масс-спектрометрический анализ позволяет улавливать вариации концентрации кислорода, азота, углекислого газа, аргона и других газов в сотые и тысячные доли процента.

Масс-спектрометрические исследования количественного состава газо-воздушной среды пчелиного улья производилось в Лаборатории масс-спектрометрии ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино, под непосредственным руководством заведующего лабораторией д.б.н. Зякуна А.М. в 2013-2014 годах. У этого коллектива имелся обширный опыт подобных исследований различных биосистем (Зякун А.М., 2010).

Образцы газовой фазы в пчелиных ульях были получены путем забора воздуха в трёх повторностях из средней части улья в ампулы объемом 10мл. Для этого в необходимых местах стенок улья были просверлены отверстия диаметром 5мм, через которые в улей вводились трубки от капельниц и датчики температуры. Проба отбиралась при помощи шприца и затем перемещалась в ампулы методом вытеснения насыщенного раствора хлорида натрия. В эксперименте использовано 9 пчелиных семей различной силы в различные периоды года.

Сохранение содержания проб и их транспортировка к месту анализа осуществлялась вверх дном в герметично закрытых резиновыми пробками ампулах с газо-изолирующим водным затвором.

Ввод проб газа в масс-спектрометр проводили через тонкую иглу, соединенную с системой пробоподготовки масс-спектрометра.

Состав газовой фазы осуществляли путем измерения интенсивностей пиков молекулярных ионов в масс-спектре воздуха: азот с m/z 28, кислород с m/z 32, аргон с m/z 40 и углекислота с m/z 44. В качестве контроля служил состав воздуха, отобранного вблизи тестируемого улья. Ошибка измерений концентрации кислорода не превышала ± 1 % (относительных).

Получены количественные зависимости изменения концентрации кислорода и углекислоты в ульях в зависимости от времени наблюдения в течение суток, температуры наружного воздуха и температуры внутри улья. Концентрация углекислого газа в наружном воздухе (контроль) составляла 0,03...0,05%, содержание O_2 - 21,0...21,1%.

Так, 10.09.2013 при температуре наружного воздуха $+10^{\circ}C...+15^{\circ}C$, в семьях, завершающих активное выращивание расплода массовая доля CO_2 колебалась от 0,3% до 0,6%.

В разгар зимовки 17.01.2014г. в улье №2 внутри улья при наружной температуре около $-10^{\circ}C$ внутри зимующего клуба пчёл отмечены колебания в течение суток CO_2 от 0,16% до 0,35%, а кислорода - от 17,6% до 18,8%.

Отмечена линейная корреляция температуры внутри улья в течение суток из проб, взятых с интервалом в 2 часа (в ряду 29,6;31,9;29,9;27,9;26,0;24,8;23,8;25,0;29,2 $^{\circ}C$) как с содержанием CO_2 (0,594; 0,357; 0,299; 0,353; 0,462; 0,566; 0,499; 0,558; 0,312%, соответственно), так и O_2 (18,67; 19,45; 19,37; 19,36; 19,06; 19,06; 18,90; 18,77; 19,37%, соответственно). Расчеты показали высокую достоверность отличий по Стьеденту ($P < 0.0001$).

Таким образом, показано, что количественные показатели, характеризующие дыхательную активность семей пчел, изменяются в зависимости от времени суток, температуры окружающей среды, температуры внутри улья и физиологического потенциала пчелиной семьи. Полученные абсолютные и относительные закономерности хорошо согласуются с данными одного из крупнейших специалистов отечественной пчеловодной науки Еськова Е.К.(1983 и др.) и его учеников, полученные хорошо известными химическими и физическими методами. Что доказывает жизнеспособность предложенной нами методики.

Для более детального изучения и регулирования микроклимата в семье зимующих пчел в лаборатории генетики и биоинженерии пчел Калужского государственного университета разработана и апробирована модель Программно-аппаратного комплекса, изготовленного на основе платформы Mega 2560 R3 (ATmega2560-16AU CN340G) и сетевого модуля Ethernet Shield W5100 R3 (Виноградский и др., 2018).

Масс-спектрометрия позволяет проводить локальный отбор проб газо-воздушной смеси, их накопление и хранение с последующим анализом без потери точности. Также несомненный интерес представляет параллельный анализ содержащихся в улье различных метаболитов пчёл (феромонов матки), например, в целях экспресспрогнозирования роения или выявления причин неблагополучия в семье.

Представляется возможным проводить анализ содержания газообразных продуктов жизнедеятельности патогенной микрофлоры для ранней диагностики заражения пчелосемей. Данный метод перспективен и для выявления отравления пчел пестицидами.

Еськов Е.К. Микроклимат пчелиного жилища.- М.: Россельхозиздат, 2-е изд. 1983 г.

Зякун А.М. Теоретические основы изотопной масс-спектрометрии в биологии. - Пущино: Фотон-век, 2010, 224с.

Виноградский В.Г., Кривов М.С., Кузьмичев В.Е. Проектирование информационной системы сбора статистических данных на пасеке в зимний период // Вестник Калужского госуниверситета, 2018, №3, С.58-62

Особенности адаптационных изменений в крови якутских сусликов осенью

Теплова П.О.^{1*}, Комелина Н.П.¹, Лизоркина К.И.¹, Захарова Н.М.¹

¹Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

p.o.teplova@gmail.com

Гибернация зимоспящих сусликов является уникальной природной моделью для изучения адаптивных механизмов функционирования организма в условиях критически низких температур для выживаемости человека и других теплокровных животных. При изучении гибернации, как правило, наибольшее внимание уделяется сравнению летнего и зимнего периодов, соответствующих периодам максимальной и минимальной активности зимоспящих, в то время как этологические, морфологические и физиологические перестройки при подготовке к спячке происходят уже в осеннее время. К сожалению, данных, касающихся осенней подготовки гибернаторов к зимней спячке в литературе чрезвычайно мало. Между тем, нами получены убедительные результаты, касающиеся изменений, происходящих у якутских сусликов на органном и организменном уровне именно в этот период: в функциональной активности мозга, в моноаминергической и опиоидной системах мозга, в сердце и скелетных мышцах [1-4]. Данная работа продолжает цикл исследований осеннего периода жизнедеятельности якутских сусликов.

Ключевую роль в поддержании гомеостаза организма играет сердечно-сосудистая система, поэтому крайне важно понимать особенности гематологических перестроек в период сезонных адаптаций.

Цель работы – выявить особенности адаптационных изменений белых кровяных телец якутских сусликов в осенний период подготовки к зимней спячке.

Якутские длиннохвостые суслики *Urocitellus undulatus* обоего пола (n=50), взяты в эксперимент во время их летней (июнь-июль, 38 °С, n = 25) и осенней активности (октябрь, 37-38 °С, n = 25). Все процедуры на животных осуществлялись в соответствии с Директивой 2010/63/EU, и были одобрены комиссией по биологической безопасности и этике ИБК РАН. Гематологическое исследование цельной крови проводили на многопараметровом ветеринарном анализаторе BC-2800Vet (Mindray, Китай). В статистической оценке использовали критерий Уитни-Манна для независимых выборок с программным обеспечением GraphPad Prism (версия 9.4.1).

Обнаружено, что осенью общее число лейкоцитов увеличивается в 1,2 раза. При этом количественный показатель гранулоцитов возрастает в 1,8 раз, лимфоцитов уменьшается на треть, а моноцитов практически не изменяется. Таким образом, в лейкограмме происходит сдвиг влево - с агранулоцитарной фракции в сторону гранулоцитарной. Данный феномен может говорить о высвобождении нейтрофильных гранулоцитов из костного мозга в циркулирующую кровь. Известно, что в костном мозге млекопитающих содержится запас гранулоцитов, кратное превышающий уровень, циркулирующий в кровяном русле, который задействуется, например, при стрессовых ситуациях. Повышение уровня гранулоцитов может быть связано и с процессом, обратным лейкоцитарной экстравазации – проникновению лейкоцитов за пределы сосудов (т.н., пристеночный пул) и временное «хранение» во вторичных лимфоидных органах (селезенке и лимфоузлах). Развивающаяся лимфоцитопения может объясняться постепенной инволюцией тимуса, которая, по-видимому, начинается уже в осенний период [5]. Значимое увеличение общего числа лейкоцитов осенью недавно обнаружено и у гетеротермных летучих мышей [6].

У активных осенних сусликов выявлено также значительное увеличение тромбоцитов и тромбокриты - в 1,4 раза. При этом ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW) остается без изменений, что свидетельствует об общем сохранении процентного соотношения зрелых и молодых фракций тромбоцитов, и дополнительно подтверждается неизменностью показателя MPV - среднего объема тромбоцитов. Возможным механизмом высвобождения тромбоцитов в кровяное русло является их способность к обратимой адгезии, миграция и аккумуляция на стенках кровеносных сосудов, а также в различных органах (селезенке, легких, печени и др.). Предположительно лейкоцитоз, в том числе может быть связан с увеличением тромбокрита.

Причину изменений, наблюдаемых в крови гибернирующих животных непосредственно во время торпора, называют вторичной по отношению к гипотермии, которую испытывают животные [7]. Между тем, можно сделать вывод о наличии крайне важных, не связанных с температурой адаптационных изменений в «белой крови» у зимоспящих сусликов уже на стадии предгибернационного эутермного осеннего периода.

1. Karaduleva E.V., Zakharova N.M., et.al. Specific molecular and morphological changes in cardiomyocytes of hibernating ground squirrels in different periods of annual cycle. // *Biophysics*. 2014; 59 (5):752-757.

2. Lazareva M.V., Trapeznikova K.O., et.al., Seasonal changes in the isoform composition of the myosin heavy chains in skeletal muscles of hibernating ground squirrels *Spermophilus Undulatus*. // *Biophysics*. 2012; 57(6):764-768.

3. Onufriev et. al. Seasonal Changes in Actin and Cdk5 Expression in Different Brain Regions of the Yakut Ground Squirrel (*Spermophilus undulatus*). // *Neurochemical Journal*. 2016; 10(2):98–105.

4. Semenova T.P., Zakharova N.M. Seasonal features of the effects of blockade of opioid receptors on adaptive behavior in hibernating animals. // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2015; 45(6):658-663.

5. Kolaeva S.G., Novoselova E.G., et. al. The annual involution and regeneration of the thymus in hibernating animals and perspectives of its studies in gerontology and stem cell proliferation. *Tsitologiya*. 2003;45(7):628-34. [Article in Russian]

6. Bandouchova H., Zukal J., et. al., Low seasonal variation in greater mouse-eared bat (*Myotis myotis*) blood parameters. // *PLoS ONE*, 2020; 15(7): e0234784.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234784>.

7. Sahdo B., Evans A.L., et. al., Body temperature during hibernation is highly correlated with a decrease in circulating innate immune cells in the brown bear (*Ursus arctos*): A common feature among hibernators? // *Int. J. Med. Sci.* 2013; 10(5):508-514. doi: 10.7150/ijms.4476

Оценка сорбционных способностей полисахаридных гидрогелей, сшитых двухвалентными катионами, на основе данных элементного анализа

Зуева О.С.^{1*}, Хаир Т.¹, Янушевская Я.С.¹

¹*Казанский государственный энергетический университет;*
ostefzueva@mail.ru

Восстановление окружающей среды, загрязненной дымовыми выбросами, промышленными и бытовыми стоками, требует развития инновационных технологий очистки воды, воздуха и сточных вод. В последнее время большое внимание уделяется разработке высокоэффективных адсорбентов, в том числе композиционных материалов, приготовленных на основе природных биополимеров [1]. Природные полисахариды содержат карбоксильные, гидроксильные и другие активные функциональные группы, которые могут реагировать с тяжелыми металлами посредством ионного обмена, тем самым адсорбируя их из сточных вод [1]. Разработка технологий приготовления иотропных гелей и микросфер или микрофибрилл из этих гелей [2,3] создала множество возможностей модификации их структуры и свойств за счет изменения условий и компонент в процессе приготовления.

Для приготовления инновационных материалов растворы природных полиэлектролитов подвергаются сшиванию катионами двухвалентных металлов. Изучению влияния различных сшивающих ионов на морфологию и элементный состав микросфер альгинатных гидрогелей, полученных при использовании двухвалентных катионов щелочноземельных металлов Ba^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} посвящена данная работа. Исследование элементного состава стенок металл-альгинатных микросфер при применении конкретных сшивающих катионов позволяет изучить ассоциацию альгинатных цепей и провести оценку сорбционных способностей полученных гидрогелей. Основным компонент исследуемых гидрогелей – это линейные молекулы альгиновой кислоты, построенные из остатков β -D-маннурановой (M units) и α -L-гулурановой кислот (G units), находящихся в пиранозной форме и связанных 1→4 связями. Химическая формула альгиновой кислоты $(C_6H_8O_6)_n$ отражает состав как M единиц, так и G единиц, причем обычно число единиц $M > G$. Однако пространственные структуры, образуемые блоками MM, MG, GG, различаются достаточно сильно.

При добавлении солей двухвалентных металлов в растворы альгината натрия происходит попарное соединение блоков соседних альгинатных цепей гидрогелей. Сшивание происходит за счет образования зависящих от вида металла полиэлектролитных комплексов, возникающих в результате электростатических взаимодействий между отрицательно заряженными карбоксильными группами молекул полисахаридов и положительно заряженными катионами металлов. Для описания механизма сшивания альгинатных цепей с помощью двухвалентных ионов Ca^{2+} и их дальнейшей ассоциации в плоские листы, была использована предложенная ранее ячеечная модель, которая неоднократно подвергалась усовершенствованию. Выяснилось, что сшивание альгинатных цепей ионами щелочноземельных металлов проходит в несколько стадий. На первом этапе идет образование одиночных шивков между биополимерами. Диаксиальная связь в гомополимерной цепи гулуранатов приводит к изогнутой структуре цепей, образующих полости в каждом блоке GG. Катионы металлов предпочитают располагаться внутри этих отрицательных полостей, обеспечивая их сшивание. Поскольку MM и MG блоки не образуют подобных полостей, ионы Ca^{2+} предпочитают связываться именно с блоками GG. Поэтому при соединении альгинатных цепей в димеры часть ячеек остается незанятой.

Для исследования использовались методы электронной микроскопии и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. Показано, что исследование элементного состава зон соединения лиофильно высушенных металл-альгинатных микросфер позволяет не только получить информацию о степени заполнения ячеек, но и сделать выводы о виде и величине взаимодействия катионов с альгинатными цепями, уточнить информацию о наиболее предпочтительных для связывания с данными катионами видах ячеек, предположить характер связывания альгинатных димеров в зоны соединения. Найдено, что в металл-альгинатных гидрогелях число катионов различных металлов Me^{2+} в расчете на блок C12, которое теоретически для полностью заполненных ячеек должно быть равно 1, в случае щелочноземельных металлов и цинка меньше этого числа и

составляет 0.3 для кальция, 0.6 для бария и 0.65-0.7 для стронция. Этот факт указывает на электростатическое связывание щелочноземельных катионов с альгинатными цепями. Следствием относительно слабого электростатического взаимодействия является разная степень комплексообразования указанных катионов с альгинатными блоками различных типов (GG, MM, GM), что проявляется в наличии определенного количества незанятых мест в структуре из соединенных альгинатных димеров. Использование методов комбинаторики позволило рассчитать вероятности возникновения при гелеобразовании ячеек из альгинатных блоков различных типов, появляющихся при ассоциации альгинатных цепей с соотношением звеньев M/G = 1.5. Показано, что часть из них не может быть занята катионами щелочноземельных металлов. Наличием свободных ячеек в образовавшихся структурах объяснены возможности для поглощения из окружающей среды катионов тяжелых металлов, что дополнительно способствует упрочнению структуры гидрогелей [3]. Сделан вывод о том, что на основе альгината кальция могут быть получены наиболее эффективные с точки зрения сорбционных способностей материалы для их применения в природоохранных технологиях.

1. C. Kong, X. Zhao, Y. Li, S. Yang, Y.M. Chen, Z. Ion-Induced Synthesis of Alginate Fibroid Hydrogel for Heavy Metal Ions Removal. *Frontiers in Chemistry*. 2020, 7, No. 905.

2. A.O. Makarova, L.R. Bogdanova, O.S. Zueva. Use of Natural Biopolymers to Create Nanocomposite Materials. *Solid State Phenomena*. 2020, 299, 299-304.

3. L. R. Bogdanova, A. M. Rogov, O. S. Zueva, and Yu. F. Zuev. Lipase enzymatic microreactor in polysaccharide hydrogel: structure and properties. *Russian Chemical Bulletin*. 2019, 68, 400-404.

Повреждающее действие углеродных наночастиц на клеточные мембраны перитонеальных макрофагов мышей

Шанк М.А.^{1,2*}, Дзя Ш.¹, Туровецкий В.Б.², Пирутин С.К.^{1,2,3}

¹Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне;

²Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова;

³Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;

mikhailshank@gmail.com

Растущее население мира требует большего количества продовольствия и современных промышленных и научных прорывов. Развитие области изучения наноструктур позволяет исследовать не только естественные наночастицы, но и создавать искусственные. Применение наночастиц в различных областях, например, биологии и медицине, находится в начальной стадии исследований, и ведется множество *in vivo* исследований.

Углеродные наночастицы классифицируются как особый тип недавно разработанных квазисферических углеродсодержащих наноматериалов с размерами ниже порядка 10нм. Однако взаимодействие углеродных наночастиц с живыми клетками может привести к неблагоприятным последствиям, например, таким как окислительный стресс. Тем самым, становятся актуальными исследования на живых клетках *in vivo* и *in vitro*. Важную роль в такого рода исследованиях отводится экспериментам *in vitro* на модельных системах на основе клеточных препаратов. Для таких модельных препаратов обоснованным является использование макрофагов – фагоцитирующих клеток способных к быстрому функциональному ответу на различные рода воздействия.

В связи с выше изложенным, целью настоящей работы было: изучение цитотоксического действия углеродных наночастиц на клеточных препаратах на основе перитонеальных мышинных макрофагов.

Объектом исследования являются перитонеальные макрофаги беспородных белых мышей самцов (далее – «макрофаги» или «клетки»). Макрофаги были выделены стандартным методом цервикальной дислокации и введением в брюшную полость на полторы минуты раствора Хэнкса в объеме 1,2 мл, содержащего 10 моль/л НЕРЕС (рН 7.2). Далее, извлекалась перитонеальная жидкость, обогащенная макрофагами. После этого жидкость с макрофагами по 30 мкл наносилась на покровные стекла, где макрофаги прикреплялись к поверхности покровного стекла путём 45-минутной инкубации во влажной камере при температуре 20°C. После инкубации покровные стекла промывались каплей раствора Хэнкса для удаления не прикрепленных клеток, и помещались в малые чашки Петри (2 мл). После чего в чашки Петри, в которые были помещены стекла, добавлялся раствор Хэнкса в объеме 2мл. В данном растворе клетки находились в течение проведения всего эксперимента.

Исследования проведены с помощью микрофлуориметрического анализа одиночных клеток с использованием метода перекрестной окраски флуоресцентными зондами: флуоресцеиндиацетатом (ФДА) и бромидом этидия (БЭ) в конечной концентрации 5мкг/мл. Время инкубации клеточных препаратов составляло 15 минут в темных условиях после чего клетки отмывались от не связавшихся красителей и производился подсчет клеток с поврежденной мембраной. Клетки с зеленой флуоресценцией считались целыми, а с ярко оранжевой или красной с поврежденной мембраной т.к. при повреждении мембраны флуоресцеин вытекал из клетки, а БЭ проникал через, образовавшиеся в мембране дефекты и связывался с ДНК и РНК клеток.

Для анализа обнаружения клеток с поврежденной плазматической мембраной использовался люминесцентный микроскоп "ЛЮОММ ИЗ", оснащенный галогеновой лампой для возбуждения флуоресценции препаратов и набором светофильтров.

Инкубация перитонеальных макрофагов с углеродными наночастицами проводилась в временном до 210 мин и концентрационном интервалах от 0,0009 до 0,0225 мкг/мл при 20°C. В результате экспериментов выявлено, что значительное статистически достоверное повреждение начинается с 90 минуты инкубации при всех перечисленных концентрациях. Достигая максимального повреждающего эффекта к 210 минуте. Увеличение концентрации наночастиц в исследуемом диапазоне концентраций не приводило значительному эффекту увеличения повреждения.

Повреждающее действие углеродных наночастиц на плазматические мембраны макрофагов в тех же концентрациях при температуре 37°C и во временном интервале до 60-ти минут показала, что уже на 15-ой минуте инкубации клеток с наночастицами происходит резкое возрастание содержания клеток с поврежденной мембраной. При этом повышение концентраций приводит к более выраженному эффекту повреждения на 15-й минуте инкубации и отсутствию такой выраженности в более поздние сроки инкубации. Эффект повреждения плазматических мембран перитонеальных макрофагов обсуждается с точки зрения увеличения генерации активных форм кислорода (АФК) и как следствие повреждения липидного бислоя плазматической мембраны за счет интенсификации процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Таким образом, настоящее исследование показывает, что углеродные наночастицы оказывают цитотоксическое действие на перитонеальные мышечные макрофаги, вызывая повреждение плазматических мембран клеток. Было установлено, что повреждение плазматических мембран зависит как от времени, так и от концентрации наночастиц, причем значительное повреждение происходит при всех концентрациях после 90 минут инкубации при температуре инкубации - 37°C. Увеличение же концентрации наночастиц не привело к значительному увеличению повреждений, по крайней мере в интервале, исследуемых концентраций. Исследование также предполагает, что повреждающее действие углеродных наночастиц на плазматические мембраны макрофагов может быть связано с увеличением генерации реактивных форм кислорода и усилением перекисного окисления липидов. В целом, эти результаты дают важное представление о потенциальном токсическом воздействии углеродных наночастиц на клетки и подчеркивают необходимость дальнейшего изучения их биологических эффектов

Применение цифровых моделей водных экосистем для устойчивой эксплуатации водных объектов

Ермаченко П.А.^{1*}, Середин Д.С.², Беляева Н.Е.³

¹ТОО «Нео-Экологджи», Алматы, Казахстан;

²ООО «Центр прогрессивной аквакультуры», х. Камышеваха, Россия;

³Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;
neo-ecology@mail.ru

Во всем мире происходит деградация водных экосистем, которая связана с неконтролируемым развитием токсичного фитопланктона. Фитопланктон (фитоценоз) – это сообщество планктонных организмов, которые могут осуществлять процесс фотосинтеза и являются первичным звеном трофической цепи водной экосистемы. Состояние фитоценоза характеризует водоем как объект исследования [1]. Как правило, токсичный фитопланктон в основной массе представлен цианобактериями. Цианобактерии представляют угрозу для здоровья водных экосистем, поскольку при цветении водоемов они выделяют много различных токсинов [2]. В следствие активного развития цианобактерий качество воды стремительно ухудшается, рыба и другие гидробионты массово гибнут, а биоразнообразие водных экосистем неуклонно уменьшается.

Исследование посвящено разработке математических моделей водных экосистем с целью поиска устойчивых режимов эксплуатации водных объектов. Фитирование параметров моделей мы производим на основе экспериментальных данных полученных при эксплуатации водных объектов и в лабораторных модельных экспериментах. Структура применяемых математических моделей водных экосистем основана на уравнениях типа Навье-Стокса, решаемых совместно с задачей адвекции-диффузии-реакции. Также в структуре математических моделей водных экосистем учитываются данные динамики трансформации энергии квантов света в тилакоидных мембранах фитопланктона по измерениям кинетики индукции флуоресценции фотосистемы II [1].

При изучении природы устойчивости водных экосистем используются результаты имитационного моделирования различных режимов эксплуатации водных объектов. В результате предлагаются мероприятия по

восстановлению биоразнообразия водных экосистем способствующие увеличению естественной кормовой базы и созданию благоприятных условий для восстановления численности редких гидробионтов.

Одним из объектов имитационного моделирования являются рыбоводно-биологические пруды, используемые для утилизации сточных вод с высоким содержанием органических веществ. Принцип функционирования данных природоподобных очистных сооружений основан на способности водных экосистем к самоочищению. В основу разработанных математических моделей положен принцип неразрывной пищевой цепи от микроорганизмов до высших гидробионтов. При этом скорость самоочищения водных экосистем напрямую зависит от интенсивности фотосинтезирующей деятельности фитопланктона [3-5].

С целью непрерывного мониторинга водных объектов в полевых условиях, мы измеряем флуоресценцию хлорофилла в живых клетках фитопланктона (*in vivo*) [6]. Для обработки полученных данных применяется кинетическая модель первичных процессов фотосинтеза. Нами апробировано использование модели изолированной фотосистемы II для оценки состояния водных экосистем при обработке измерений индукции флуоресценции проб фитопланктона из прудов бассейна реки Темерник (г. Ростов-на-Дону) [1].

В результате обработки данных полученных при: эксплуатации водных объектов, лабораторных модельных экспериментах и математическом моделировании, энергетическая эффективность продуцирования биомассы фитопланктона, в обслуживаемых нами водоемах, составила в среднем 0,20-0,50 % от интегральной по спектру солнечной радиации, поступающей на поверхность воды. Большая часть этой энергии осталась в экосистеме в виде чистой первичной продукции, которая стала доступной для следующих звеньев трофической цепи.

Предложенный нами комплексный подход к эксплуатации водных объектов позволил сократить энергозатраты на очистку сточных вод в несколько раз, уменьшить углеродный след при культивировании кормовых микроводорослей и обеспечить условия для формирования устойчивых гипертрофных водных экосистем. В которых рыбы осуществляют регулирование концентрации взвешенных органических веществ и популяции фито-зоопланктона. Наличие рыб в экосистеме, имеющих различные пищевые предпочтения, играет важную роль в самоочищении водоемов. Поскольку доказано, что наиболее эффективно самоочищение происходит в экосистемах с хищными рыбами и более разнообразными трофическими цепями. Следовательно, для восстановления биоразнообразия водных экосистем целесообразно эксплуатировать водоемы с максимальной для данной климатической зоны биопродуктивностью. В то же время, устойчивость гипертрофных водных экосистем должна поддерживаться за счет вылова избыточной биомассы гидробионтов в количествах эквивалентных поступлению из внешней среды в водные объекты органических веществ и биогенных элементов (азота и фосфора).

Список литературы

1. Беляева Н.Е., Булычев А.А., Пашенко В.З., Клементьев К.Е., Ермаченко П.А., Конюхов И.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Динамика процессов в тилакоидных мембранах водорослей *in vivo*, изучаемая в моделях фотосистемы II и тилакоида по измерениям индукции флуоресценции // Биофизика. 2022. Т. 67. № 5. С. 877-896 (2022).
2. Chorus, I. & J. Bartram. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London (1999).
3. Субботина Ю.М. Технология выращивания молоди карпа в рыбоводно-биологических прудах: автореферат к.с.-х.н. 06.02.04. М.:ТСХА– 28 с (1993).
4. Ермаченко П.А., Середин Д.С., Зверева Н.А., Буханцов Ю.В., Соколова Е.А., Дудкин С.И., Булыжев Е.М., Беляева Н.Е., Конюхов И.В. Восстановление естественной способности водоемов к самоочищению // Наилучшие доступные технологии водоснабжения и водоотведения. № 6, с. 52-57 (2021).
5. Ермаченко П.А., Середин Д.С., Соколова Е.А., Дудкин С.И., Головкин Г.В., Беляева Н.Е., Конюхов И.В. Производство живых кормовых организмов фито-зоопланктона на очистных сооружениях канализации // Яковлевские чтения-2022: Системы водоснабжения и водоотведения. Современные проблемы и решения. Сборник докладов участников XVII Международной научно-технической конференции, посвященной памяти академика РАН С.В. Яковлева. Москва. С. 160-166 (2022).
6. Pires M.D. Evaluation of fluorimeters for the *in situ* monitoring of chlorophyll and/or cyanobacteria // *Deltares*, B1203593-000-ZWS-0004, (2010).

Проксимальное зондирование растений: спектральный анализ и машинное обучение

Соловченко А.Е.^{1*}, Шурыгин Б.М.¹

¹МГУ;

solovchenkoae@my.msu.ru

Количественная объективная оценка различных признаков растений занимает центральное место в современных методах диагностики состояния природных и искусственных сообществ (агрэкосистем). Этот подход, получивший название «фенотипирование», используется и в ускоренной селекции культурных растений для повышения их продуктивности и устойчивости к стрессам [1-3]. Методы фенотипирования растений также интегрированы в передовые практики точного земледелия (smart farming). Необходимость быстрого скрининга растений на обширных территориях, многочисленных родительских форм и гибридов на опытных делянках, в полях и садах обусловила создание автоматизированных, неинвазивных экспресс-методов массового или высокопроизводительного фенотипирования растений [2].

На начальных этапах для фенотипирования использовали методологию дистанционного зондирования. Она предусматривает регистрацию информации о растительности регистрируется сенсорами на спутниковых и авиационных платформах, с относительно далёкого расстояния — от сотен километров до сотен метров. В настоящее время наблюдается взрывное распространение технологий мониторинга информации для фенотипирования растений на сравнительно небольших расстояниях — от нескольких сантиметров до нескольких метров, в совокупности называемых «проксимальным зондированием» (proximal sensing).

Традиционно для дистанционного и проксимального зондирования использовали регистрацию и анализ отражённого растениями света (анализ спектров отражения) [3-7]. В зависимости от спектрального разрешения (числа доступных спектральных каналов) выделяют мульти- и гиперспектральные подходы. Анализ гиперспектральных изображений, основанных на пространственно-разрешённой визуализации спектров отражения растений даёт огромное количество структурной, биохимической и фенологической информации о диких и культурных растениях [3,5,7]. Появление недорогих гиперспектрометров сделало этот метод доступным для широкого сообщества ученых и практиков (растениеводов и селекционеров). Наряду с анализом отражённых сигналов, быстро набирает популярность функциональная диагностика растений и сообществ, основанной на визуализации амплитудно-кинетических параметров флуоресценции хлорофилла а, индуцированной солнечным светом (solar-induced fluorescence, SIF).

В последнее время возможности проксимального зондирования растений резко расширились благодаря использованию новых математических методов анализа процессов и изображений с применением искусственных нейронных сетей (методов машинного обучения, ML). Более того, всё чаще ML-анализ изображений выдвигаются в качестве необходимой и достаточной методологической основы для проксимального зондирования растений. При этом данные подходы нередко теряют связь с физиолого-биохимическими и фенологическими процессами исследуемого объекта (растения). Однако более эффективным представляется сбалансированный подход, сочетающий спектральный анализ отражённого сигнала либо эмиссии флуоресценции с морфологическим анализом структур растений методом ML.

Очевидно, что извлечение информации из гиперспектральных изображений, равно как и оптимизация ML-алгоритмов для их анализа, остается сложной задачей. В докладе сопоставляются преимущества и ограничения вышеупомянутых методологий проксимального зондирования и предлагается стратегия выбора оптимального подхода. В качестве примеров приводится использование спектральных индексов, включая новых подходов, основанных на дистанционно измеренных коэффициентов отражения. Рассматривается извлечение количественной информации о развитии растений (старение, созревание, смена фенофаз), их биохимическом составе (содержание первичных и вторичных каротиноидов, антоцианов и хлорофиллов) из гиперспектральных изображений, полученных в условиях окружающей среды в полевых условиях и в контролируемых условиях в лаборатории. На основании собственных и опубликованных в литературе данных сделано заключение о том, что «синтетический» подход обогатил к проксимальному зондированию и фенотипированию растений даёт исследователям более разностороннюю, а значит и более ценную информацию о физиологическом состоянии растений, состоянии акклиматизации к стрессу и прогрессировании развития растений.

Литература

- [1] Demidchik et al. 2020. Plant Phenomics: Fundamental Bases, Software and Hardware Platforms, and Machine Learning. *Russ J Plant Physiol* 67:397-412
- [2] Watt et al. Phenotyping: New Windows into the Plant for Breeders. *Annu Rev Plant Biol* 2020. 71:15.1–15.24
- [3] Solovchenko et al. Extraction of Quantitative Information from Hyperspectral Reflectance Images for Noninvasive Plant Phenotyping. *Russ J Plant Physiol*. 2022. In press. DOI: 10.20944/preprints202112.0325.v1
- [3] Shurygin et al. 2021. Comparison of the non-invasive monitoring of fresh-cut lettuce condition with imaging reflectance hyperspectrometer and imaging PAM-fluorimeter. *Photonics*. 8:425. DOI: 10.3390/photonics8100425

- [4] Gitelson et al. An insight into spectral composition of light available for photosynthesis via remotely assessed absorption coefficient at leaf and canopy levels. *Photosynth Res* 2021. DOI: 10.1007/s11120-021-00863-x
- [5] Solovchenko et al. 2021. Physiological foundations of spectral imaging-based monitoring of apple fruit ripening. *Acta Hort.* 1314, 419-428. DOI: 0.17660/ActaHortic.2021.1314.52
- [6] Solovchenko et al. Linking tissue damage to hyperspectral reflectance for non-invasive monitoring of apple fruit in orchards. *Plants*. 2021. 10 (310) DOI: 10.3390/plants10020310
- [7] Gitelson et al. Foliar absorption coefficient derived from reflectance spectra: a gauge of the efficiency of in situ light-capture by different pigment groups. *Journal of Plant Physiology*. 2020. V. 254. 153277.

Разнообразие числа повторов белка конденсации льда (INP) в популяции *Xanthomonas* в отношении активности образования льда

Тешич С.¹, Кырова Е.И.², Фокина Е.Д.¹, Косенко А.О.³, Игнатов А.Н.^{1*}

¹РУДН;

²Всероссийский НИИ защиты растений;

³ООО Биоспарк;

an.ignatov@gmail.com

Модель генетической адаптации в пределах фитопатогенного рода *Xanthomonas* (гамма-протеобактерии) была предложена для белка конденсации льда (Ice nucleation protein - Inp). Образование льда инициируется частицами Inp из-за их специфических свойств поверхности, которые снижают энергетический барьер для кристаллообразования льда (Szygmer, Zawadzki, 1997). Бактерии, выделяющие Inp, вызывают быстрое образование ледяных кристаллов при температурах до -2 °C (Morris et al., 2004). Центральный домен Inp (1034-1567 аминокислот) состоит из tandemных повторов длиной 8, 16(17) или 48 аминокислотных остатков. ЯМР-анализ синтетических пептидов, соответствующих повторяющимся доменам у *Xanthomonas campestris* показал, что пептид с 17 остатками образует петлевую структуру активного центра Inp (Kumaki et al. 2008). Количество повторов было пропорционально активной поверхности конденсации льда Inp. Была показана взаимосвязь между размером теоретической молекулярной массы структур, инициирующих образование ледяных кристаллов, и средней температурой замерзания (Ling et al. 2018). В данной работе, мы оценили два фактора: молекулярную массу 16-аминокислотных tandemных повторов Inp (Inp16R) и среднее количество мономерных субъединиц Inp16R для 368 геномов *Xanthomonas*, доступных в NCBI GenBank. Среднее, минимальное, максимальное количество и стандартное отклонение Inp16Rs были рассчитаны в сравнении с таксономическим положением бактерий и территорией (климатической зоной) встречаемости патогенов. Были проанализированы штаммы 15 видов *Xanthomonas* и 15 штаммов без определенной таксономической привязки. В результате исследования была установлена достоверная отрицательная корреляция между средними температурами в зоне распространения патогена и количеством Inp16Rs. Например, субтропический патоген рис, *X. oryzae*, имел всего 12 Inp16Rs, в то время как патогены, такие как *X. campestris*, *X. hortorum*, распространенные в зоне умеренного климата, имели от 48 до 84 повторов. Вид с самым широким распространением, *X. arboricola*, возбудитель болезней многих культурных деревьев и насаждений (Игнатов и др., 2015), имел самый широкий диапазон числа повторов: от 3 до 74.

Когда количество Inp16R было экспериментально уменьшено (Ling et al., 2018), укороченная версия Inp сохранила некоторую активность образования ледяных кристаллов, несмотря на более чем четырехкратное уменьшение теоретической поверхности связывания со льдом по сравнению с интактной версией белка. Поэтому, можно уверенно полагать, что все штаммы, имеющие Inp сохраняют способность к конденсации льда. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в популяции *Xanthomonas* существует генетическая адаптация размера активных поверхностей белка конденсации льда, пропорциональная температурам в зонах распространения патогенов.

Благодарности: Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-26-00168

Литература

1. Ignatov AN, Kyrova EI, Vinogradova SV, Kamionskaya AM, Schaad NW, Luster DG. Draft genome sequence of *Xanthomonas arboricola* strain 3004, a causal agent of bacterial disease on barley. *Genome announcements*. 2015 Feb 26;3(1):e01572-14.
2. Kumaki Y., Kawano K., Hikichi K., et al. A circular loop of the 16-residue repeating unit in ice nucleation protein. *Bioch Bioph Res Comm* 2008; 371, 5-9
3. Ling M. L., Wex H., Grawe S., et al. Effects of ice nucleation protein repeat number and oligomerization level on ice nucleation activity. *J Geophys Res: Atmosph* 2018; 123, 1802–1810. <https://doi.org/10.1002/2017JD027307>

4. Morris C. E., Georgakopoulos D. G., Sands, D. C. Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. Journal de Physique IV - Proceedings, 2004; 121, 87–103. <https://doi.org/10.1051/jp4:2004121004>

5. Szyrmer W., Zawadzki I. Biogenic and anthropogenic sources of ice-forming nuclei: A review. Bull Am Meteorolog Soc 1997; 78(2), 209–228. <https://doi.org/10.1175/1520-04772>

Фазовая синхронизация колебаний функции роста фитопланктона с температурой в озерной экосистеме

Нуриева Н.И.^{1*}, Адамович Б.В.^{1,2}, Медвинский А.Б.¹

¹ИТЭБ РАН;

²Белорусский государственный университет;

nailya.nurieva@mail.ru

Для описания динамики популяций в системе хищник-жертва используются дифференциальные и разностные уравнения, описывающие рост жертвы, независящий от плотности хищника, и убыль жертвы в результате поедания ее хищником. В свою очередь рост популяции хищника происходит за счет перехода биомассы жертвы в биомассу хищника.

В нашей работе рассмотрена система хищник-жертва на примере фитопланктона и зоопланктона Нарочанских озер республики Беларусь. Новизна нашего подхода заключается в том, что модель оперирует непосредственно с временными рядами, полученными в ходе экологического мониторинга, что в свою очередь позволяет не использовать функции роста и потребления в аналитическом виде, а получить их непосредственно в виде ряда данных.

Нами было показано, что функция роста фитопланктона синхронизована по фазе с температурой, тогда как сама биомасса фитопланктона не синхронизована с температурой в исследуемый период. Таким образом, влияние температуры на фитопланктон оказывается замаскированным в результате хищничества со стороны зоопланктона.

Работа поддержана грантом РФФ 23-24-00408.

Эко-генетическая стресс-устойчивость растений, как стратегия и тактика: супер-молекулярно-протеомного дизайнера физико-химической природы биологии развития

Иванова Э.А.^{1*}

¹Уфимский институт биологии Российской академии наук;

fiona_belobor@mail.ru

В ракурсе эко-генетической адаптации растений, с позиции междисциплинарной науки - супрамолекулярной физико-химии, рассмотрена динамика супрамолекулярных топологически ассоциированных структур тотальной хроматиновой матрицы (ТХМ): Нп-нуклеоплазмы, ХрI-эу-, ХрII-гетеро- хроматинов и ядерного матрикса. На поверхности раздела которых, представлена протео-супермолекулярная реорганизация ансамблей: «линкерных», «коровых» гистонов и негистонов, макрокинетика которых имеет важное значение для понимания особенностей биохимических процессов в генетических подсистемах растения (корень→мезокотиль→колеоптиль) переходного периода от гетеротрофного к автотрофному развитию растений. Показан алгоритм особенностей биологической специфичности морфогенеза и структурной устойчивости генетико-протеомной основы ТХМ, как модельной системы коллекционных зародышей семян пшениц, в процессе их органоспецифического, координированно-закономерного роста при переключении подпрограмм развития, где проведен экспериментальный анализ протеомного позиционирования в супермолекулярных нуклеосомных ансамблях: «линкерных», «коровых» и «негистоновых» белков ТХМ, разных генетических подсистем (мезокотиль→корень→высокодифференцированный зародыш) соответственно: донора (яровой)→переведенного в озимый (донор озимый-фенотип)→переведенного вновь в яровой-фенотип. На основании распределения нуклеосомного аргинин-богатого «корового» гистона (НЗ-Н4)''на поверхности раздела ТХМ: донора (яровой) Нп=ХрI (мезокотиль)→переведенного в озимый (донор озимый-фенотип) Нп>ХрII≥ЯМ (корень)→переведенного вновь в яровой-фенотип Нп>ХрI>ЯМ>ХрII (высокодифференцированный зародыш); предполагается возможное переключение генетических подпрограмм развития в генетических подсистемах целостного организма, которое осуществляется за счёт комбинаторного принципа протеомных ансамблей, потенциальных эпигенетических сетей «гистонового кода», в условиях экосистемы окружающей среды.

Ключевые слова: Протеомика, Интерфазная топология хроматина, Супрамолекулярная биохимия, кариогеномика, пшеница, сигнальные системы

Экологическая биофизика: пищевые цепи, агентно-ориентированное программирование и построение пирамид Элтона

Савицкий М.А.¹, Суглобов А.С.¹, Кузнецов А.В.^{2,3*}

¹Центр дополнительного образования "Малая академия наук", Севастополь, 299055;

²Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, 299011;

³Севастопольский государственный университет, Севастополь, 299053;

andrei_kouznetsov@hotmail.com

Модели хищник-жертва Лотки–Вольтерры используются для изучения экологии сообществ, но их способность генерировать пирамиды Элтона в сравнении с полевыми данными подробно не исследовалась. Здесь вместо систем обыкновенных дифференциальных уравнений (ODE – ordinary differential equation) использовали агентно-ориентированное программирование (ABM – agent based modeling). Показано, что двухкомпонентная система продуцент-консумент неустойчива, а трёхкомпонентная система с двумя трофическими уровнями стабильна. Временные срезы по ходу выполнения программы могут порождать как пирамиды Элтона, так и каскады. Результаты моделирования согласуются с данными полевых исследований.

Введение

Для описания конкурентных отношений в сообществах организмов разработаны такие математические модели, как уравнения экспоненциального [Malthus, 1798] и логистического [Verhulst 1838; Pearl, Reed, 1920] роста, системы линейных дифференциальных уравнений хищник-жертва [Lotka, 1925; Volterra, 1926] и матричные популяционные модели [Leslie, 1945, 1948]. Для общего описания функционирования экосистемы необходимы интегральные оценки. Наглядным примером такого подхода является экологическая пирамида, разработанная Ч. Элтоном [Elton, 1927], которая представляет графическое изображение соотношения между продуцентами и консументами всех уровней. Различают несколько типов экологических пирамид: видов, чисел, биомассы, энергии и т. д. В силу правила Р. Линдемана [Lindemann, 1942], согласно которому на каждом этапе передачи по пищевой цепи теряется примерно 90% вещества и энергии, количество трофических уровней конечно. Данное обстоятельство позволяет исследовать пищевые цепи реальных сообществ.

Для изучения морского планктона было разработано и испытано устройство последовательной фильтрации Viber [Баздырев, 2021]. Обнаружено, что форма пирамид Элтона может трансформироваться в каскады [Уфимцева, Кузнецов, 2022]. Предполагается, что искажение пирамид видов, наблюдаемое в отдельных пробах, происходит в результате конкурентных отношений между организмами. Данная работа посвящена изучению планктона размером от 2 мм до 2 мкм на примере станции в районе пляжа Каравелла на м. Фиолент в районе г. Севастополь (Крым, Чёрное море) во второй половине лета 2022 г.

Материал и методы

Сепаратор Viber-6 диаметром 11 см и длиной 98 см, состоит из 5 вставляемых друг в друга секций, между которыми прокладывались нейлоновые сетки. Диаметр отверстий входного сита составлял 2 мм, последующих – 300, 150 и 84 мкм, размер пор последнего волоконного фильтра EN14683 был 1-5 мкм. Траление осуществляли на глубине 50 см со скоростью ~5 км/ч на дистанции 1500 м. Образцы смывали с фильтров и фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом. Аликвоты исследовали под бинокулярной лупой ZEISS Stemi 305 при увеличениях от 8 до 40 раз. Использовали понятие «морфотип», т. е. сводили в одну категорию все объекты, обладающие визуально схожими морфологическими признаками.

Имитационное моделирование проводили в среде NetLogo [Wilensky, 1998, 1999; Liu, 2001]. Исследовали стабильность систем продуцент-консумент с разным числом консументов. В ходе моделирования агенты беспорядочно бродили по экрану, где хищники случайно встречались с добычей. Каждый шаг стоил энергии, поэтому они должны были питаться. Когда энергия заканчивалась, они умирали. Чтобы популяция продолжала существовать, каждый агент обладал фиксированной вероятностью размножения на очередном временном шаге. Варьируемые параметры включали: начальный размер популяции каждого агента, количество энергии, получаемое хищником за каждую съеденную жертву, вероятность воспроизводства агентов на очередном временном шаге. После того, как продуценты были съедены, они вырастали только через определённое время [Wilensky, Reisman, 1999].

Результаты

В отличие от аналитической модели Лотки–Вольтерры, двухкомпонентная ABM-модель в конечном итоге оказалась нестабильной, что приводит к гибели всех участников. Трёхкомпонентная система с консументами первого и второго порядка, проявляла стабильность. Устойчивость сохранялась на протяжении длительного

вычислительного эксперимента, несмотря на значительные флуктуации численности агентов. Это обстоятельство позволило сравнивать найденную минимальную модель с данными полевых исследований.

Образцы, смытые с фильтров в отдельных опытах, были проанализированы на богатство морфотипов отдельно для каждой размерной фракции. Численные значения, полученные для временных срезов, использовали для построения пирамид Элтона, где визуализируется количество морфотипов для последовательно уменьшающихся ячеек фильтров либо данные численного эксперимента. Большая часть результатов была выражена пирамидами Элтона, меньшая представляла искажённые пирамиды, т.е. каскады. Однако объединение данных по дням привело к получению канонической экологической пирамиды.

Анализ полученных размерных фракций микро- и нано-планктона свидетельствует в пользу обобщённой двухзвенной пищевой цепочки: морской фитопланктон → веслоногие рачки, где последние питаются фитопланктоном. Можно предположить, что протоперидиниумы поедают ликмофор, а веслоногие рачки в свою очередь протоперидиниумов. Следовательно, можно выделить и более длинную пищевую цепь: ликмофоры → протоперидиниумы → копеподы.

Обсуждение и вывод

Теория пищевых сетей, в целом, объясняет пирамиды чисел [Elton, 1927], осцилляции потребитель-ресурс [Lotka, 1925; Volterra, 1926] и каскады [Jonsson, 2017], тем не менее остаётся предметом споров. Напомним, что энергетическая парадигма [Lindeman, 1942] основана на потоке энергии по пищевой цепи и объясняет как виды распределяются по трофическим уровням или размеру тела [Banse, Mosher, 1980; Sprules, Barth, 2015]. Энергетические аргументы приводят к пирамидальным распределениям, тогда как динамические модели часто их не дают [Jonsson, 2017]. Мы объяснили причины таких несоответствий с помощью натуральных экспериментов и агентно-ориентированного программирования.

Экологическая ниша как гамильтониан, определяющий собственные значения волновой функции живого

Стригин М.Б.^{1*}

¹*Южно-Уральский Государственный Университет Кафедра физики наноразмерных систем;
strigin1969@gmail.com*

Представление об экологической нише активно эволюционирует последние сто лет, начиная с работ Гаузе, Лэка, Элтона, которые продолжили Хатчинсон, Шелфорд и др. Данная работа выдвигает гипотезу, что определение экологической ниши выступает аналогом определения гамильтониана 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, фонону в кристалле, и т. д. Во всех случаях собственные значения определяются граничными условиями, а проще говоря, некоторой геометрией потенциальной ямы. Понятие гамильтониана в квантовой механике непрерывно усложняется — размерность фазового пространства растёт.

Аналогично этому в биологии имеется представление об экологической нише, внутри которой существует биологическая сущность — вид животных или растений. «Васнецов однозначно признавал носителем ниши «члена сообщества», или «животное», оговаривая, что под последним должна пониматься не особь, а вид или род» [1, с. 58]. Дж. Э. Хатчинсоном построена модель гиперобъёма, где имеется собственное фазовое пространство, в котором вместе с пространственными координатами фигурируют другие экологические факторы.

Так же, 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 экологические факторы, лежащие в некоторых диапазонах, названных Шелфордом диапазонами толерантности. Как и фазовое пространство в квантовой механике, куб Хатчинсона обладает двумя сопряжёнными классами экологических факторов: фундаментальными, которые связаны с пространством и реализованными, которые связаны с импульсом, с динамикой вида, с хищниками и конкурентами.

На наш взгляд, эта модель может быть описана в рамках представления о волновом уравнении Шредингера, где гамильтониан состоит из нескольких членов $H_0 + H_1 + H_2$. В терминах квантовой механики H_0 определяется ближайшей геометрией, например, атомом, внутри которого находится электрон и который можно назвать фундаментальной нишей (по Хатчинсону), задаваемой географией ниши: пищевыми ресурсами, температурными и влажностными аспектами и т. д. H_1 — малая поправка, которая определяется, например, движением пролетающего мимо электрона — в терминах биологии — конкурента, или мимо пролетающего атома — хищника (поскольку первый может выбить рассматриваемый электрон и занять его место, а второй может выхватить электрон из начального атома и присвоить его). H_2 можно назвать реализованной нишей,

которая модулирует H_0 . H_2 — нелинейная часть гамильтониана, которая связана с самовоздействием, в случае вида эта часть определяется его когнитивными возможностями. Ключевое отличие этого уравнения от классических уравнений Лотки-Вольтерра, что оно перешло в комплексную плоскость и может учитывать интерференционные эффекты, понятие о которых в макрофизике может быть сопоставлено с введенным Хакеном понятием синергии.

Ключевой константой, определяющей уравнение Шредингера, является постоянная Планка, которая характеризует собой конкретную минимальную фазовую ячейку физического хаоса. В нашей модели эволюция вида описывается семантическим пространством куба Хатчинсона и стратегиями вида (например, его отношениями с конкурентами или с хищниками). Постоянную Планка необходимо заменить на параметр, обозначающий индивида, являющегося аналогичной минимальной ячейкой хаоса в области биологической семантики. Конкретный индивид вида означает окружающее пространство, обогащая его возможными стратегиями, приспосабливаясь к нему.

Многие биологические законы явно демонстрируют квантовый характер. Например, закон Гаузе о том, что внутри одной экологической ниши может проживать только один вид живого в точности воспроизводит статистику Ферми. Два вида белок могут обитать на одной территории, но располагаться на разных уровнях деревьев и слабо пересекаться друг с другом. Одновременно с этим фитопланктон подчиняется статистике Бозе: «Хатчинсон отметил, что такое видовое разнообразие противоречит принципу конкурентного исключения Гаузе и назвал это явление «парадоксом фитопланктона»» [2, с. 23]

Можно представить экологическую нишу в виде потенциальной ямы, внутри которой вид осциллирует, подстраиваясь под её форму. Но если ниша трансформируется существенно, когда ограничение, сдерживающее вид внутри неё, существенно снижается, происходит этап синтеза, и вид занимает принципиально новую нишу. Такие преобразования можно считать дарвиновским путём эволюции.

Исследователями отмечается, что возможно «просачивание» вида за пределы экологической ниши, по аналогии с туннельным переходом в квантовой механике. Такую эволюцию можно назвать ламарковской. «Туннелирование» через барьер и занятие новой экологической ниши возможно за счёт внутренних энергетических ресурсов. Так, например, Дэвид Лэк обнаружил [3], что увеличение размера клюва у галапагосских вьюрков имеет скорее социальную природу, а не является ответом на изменения пищевой цепочки.

Список литературы:

1. Озерский П. В. К формализации концепции экологической ниши Элтона — Одума. История вопроса. Функциональная морфология, экология и жизненные циклы животных. М: Научные труды РГПУ им. Герцена, 2013, т.13, №1, с. 55-68
2. Ризниченко Г. Ю. Рубин А. Б. Математические методы в биологии экологии. — М.: Издательство Юрайт, 2018, 211 с. — Серия: Университеты России.
3. Галл Я.М. Дэвид Лэк: две версии видообразования, либо от нейтрализма к адапционизму. Вавиловский журнал генетики селекции. 2014, т.18, №3, с.585–598

Медицинская биофизика. Нейробиофизика

2-Этил-6-метил-3-гидроксипиридин N-ацетилцистеинат предупреждает обусловленную стрессом дисфункцию митохондрий

Жигачева И.В.^{1*}, Русина И.Ф.², Крикунова Н.И.¹, Миль Е.М.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук;

²Институт химической физики им Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия ;
zhigacheva@mail.ru

Различные стрессы приводят к нарушению биоэнергетических функций митохондрий и избыточной генерации АФК, что лежит в основе развития патологических процессов [1]. Поскольку в условиях стресса митохондрии являются одним из основных источников АФК, то, возможно, основным механизмом действия препаратов-адаптогенов является снижение чрезмерной генерации АФК этими органеллами. Такую функцию могут выполнять антиоксиданты, в частности производные 3-гидроксипиридина, обладающие широким спектром биологического действия [2]. Они являются гетероциклическими аналогами ароматических фенолов и, в связи с этим, проявляют антиоксидантные и антирадикальные свойства [3]. В нашей работе в качестве объекта исследования мы использовали 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин N-ацетилцистеинат, являющийся производным 3-гидроксипиридина и ацетилцистеина. Целью нашего исследования было исследование антирадикальных свойств и биологической активности этого препарата. 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин N-ацетилцистеинат в диапазоне концентраций 10-6-10-11М и 10-13М предотвращал активацию ПОЛ в мембранах митохондрий печени мышей в модельной системе «старения» митохондрий. При этом хемилюминесцентным методом показаны высокие значения антирадикальной активности этого препарата, что могло свидетельствовать о наличии адаптогенных свойств у 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин N-ацетилцистеината. Исследование этих свойств проводили на моделях острой гипобарической гипоксии (ОГГ) или острого алкогольного отравления (ОАО). При этом изучали влияние этих воздействий на функциональное состояние митохондрий печени мышей. ОГГ и ОАО вызывали активацию ПОЛ в мембранах митохондрий, что сопровождалось изменениями в содержании жирных кислот (ЖК), имеющих 18, 20 и 22 атома углерода и набуханием митохондрий. Содержание линолевой кислоты- одной из основных ЖК, входящих в состав кардиолипина, в общей липидной фракции мембран митохондрий уменьшалось на 6%. Пул 20: 3 ω 6 и 20: 5 ω 3 уменьшился на 18% и 32% соответственно. Учитывая, что эйкозаноиды являются сигнальными молекулами и имеют широкий спектр биологических функций [30], снижение содержания этих ЖК, возможно, также как и снижение содержания линолевой кислоты, влияло на устойчивость организма к стрессовым воздействиям. 5-дневное введение препарата в дозе 10-6М/кг до стрессовых воздействий предотвращало активацию ПОЛ, изменение ЖК состава мембран и набухание митохондрий.

Изменения функционального состояния митохондрий отразились на устойчивости организма к стрессовым факторам. Введение мышам препарата увеличивало продолжительность жизни и выживаемость мышей в условиях различных видов гипоксии на 57-92 % и 15-40% соответственно. При этом продолжительность жизни и выживаемость мышей в условиях острого алкогольного отравления возрастали в 3,9 и 12 раз соответственно.

Адаптогенные свойства препарата, по-видимому, обусловлены его высокими антирадикальными и антиоксидантными свойствами.

Список литературы

1. Lenaz G. Adv Exp Med Biol., 2012, 942, 93-136. doi: 10.1007/978-94-007-2869-1_5.
2. Goroshko O.A., Kukes V.G., Prokofiev A.B., Arkhipov V.V., Demchenkova E.Yu. International Journal of Applied and Fundamental Research, 2016, 4-5, 905-912.
3. Дюмаев К. М., Смирнов Л. Д. Успехи химии. 1975,44(10),1788.
4. de Carvalho C. C. C. R, Caramujo M. J. Molecules, 2018 , vol. 23, no.10, pii: E 2583, DOI: 10.3390/molecules23102583

Аберрантные осцилляции и моторная дисфункция в модели болезни Паркинсона на крысах: новые терапевтические стратегии и цели

Бражник Е.С.¹, Новиков Н.И.^{1*}

¹*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;*
nikolay_novikov@hotmail.com

Болезнь Паркинсона (БП), прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, обусловленное избирательной потерей дофаминергической иннервации базальных ганглиев (BG), что приводит к нарушению двигательной функции. При БП активность в нейронных моторных сетях характеризуется появлением устойчивых 30-Гц бета-осцилляций, которые, как считается, нарушают обработку информации, связанной с движением, и приводят к возникновению моторной симптоматики (1-4). Леводопа устраняет эти осцилляции, что сопровождается временным восстановлением двигательной функции. Однако, при длительном лечении леводопой у большинства пациентов возникают серьезные побочные эффекты - леводопа-индуцированная дискинезия (ЛИД) с характерным появлением патологических 100-Гц гамма-осцилляций в таламусе и моторной коре (5-6). Механизмы, лежащие в основе патологической синхронизации в BG-таламо-кортикальных нейронцепях и их вклад в процесс возникновения двигательных нарушений и леводопа-индуцированной дискинезии, до конца не изучены. Выявление критических компонентов нейросетей мозга, участвующих в этом процессе, может стать основой для разработки новых методов лечения пациентов с БП.

Мы исследовали эффекты обратимого торможения активности ядер моторного таламуса (VM и Pf) и GPe (стратегическое ядро в BG; 7, 8) при локальном введении мусцимола, агониста ГАМК-А-рецепторов, а также повышения их активности пикротоксином, антагонистом ГАМК-А-рецепторов, на выраженность аберрантных ритмов и способности к восстановлению нормальной локомоции у крыс с экспериментальным паркинсонизмом. Нами показано, что при модуляции нейронной активности моторного таламуса и GPe (активация или торможение) мощность 30-Гц бета-осцилляций в BG-таламокортикальных цепях существенно уменьшалась, в то время как ее влияние на локомоцию не было однонаправленным. Отметим, что при торможении Pf таламуса и GPe двигательный дефицит устранялся, а при торможении VM таламуса моторный дефицит возрастал. И наоборот, повышение активности VM и GPe пикротоксином сопровождалось восстановлением нормальной локомоции, а введение пикротоксина в Pf усиливало двигательный дефицит. У крыс, получавших высокие дозы леводопы, приводящие к развитию ЛИД, введение мусцимола в GPe и VM устраняло 100-Гц гамма-осцилляции в таламокортикальной нейросети. Однако, только торможение активности GPe предотвращало или в значительной степени снижало вероятность возникновения леводопа-индуцированной дискинезии.

Полученные результаты свидетельствуют, что наличие аберрантных осцилляций в моторных нейросетях не может полностью рассматриваться как первопричина двигательных нарушений при БП, но является свидетельством дисбаланса их активности. Важно, что GPe, как критический компонент BG, можно рассматривать в качестве главной мишени терапевтического воздействия с целью восстановления нормальной двигательной функции при БП и, возможно, предотвращения ЛИД. Отметим, что использование современных хемогенетических методов позволит разработать новые подходы к устранению двигательных нарушений при болезни Паркинсона (9).

Сокращения: БП - Болезнь Паркинсона; GPe - наружное ядро бледного шара; BG - базальные ганглии; Pf – парафасцикулярное ядро таламуса; MSx -моторная кора; VM - вентромедиальное ядро таламуса; ЛИД – леводопа-индуцированная дискинезия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brown P. Bad oscillations in Parkinson's disease J. Neural Transm. 2006. 70: 27–30.
2. Gatev P, Darbin O, Wichmann T (2006) Oscillations in the basal ganglia under normal conditions and in movement disorders. *Mov Disord* 21:1566–1577.
3. West T.O., Berthouze L., Halliday D.M., Litvak V., Sharott A., Magill P.J., Farmer S.F. Propagation of beta/gamma rhythms in the cortico-basal ganglia circuits of the parkinsonian rat. *J. Neurophysiol.* 2018. 5: 1608–1628.
4. Brazhnik E., Cruz A.V., Avila I, Wahba M.I., Novikov N., Ilieva N.M., McCoy A.J., Gerber C., Walters J.R. State-dependent spike and local field synchronization between motor cortex and substantia nigra in hemiparkinsonian rats. *J. Neurosci* 2012. 32:7869–7880.
5. Halje P, Tamtè M, Richter U, Mohammed M, Cenci MA, Petersson P. Levodopa-Induced Dyskinesia Is Strongly Associated with Resonant Cortical Oscillations, *J Neurosci.* 2012 Nov 21; 32(47): 16541–16551. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3047-12.2012
6. Cenci MA, Henrik Jörntell, Petersson P On the neuronal circuitry mediating l-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of Neural Transmission* (2018)
7. Kita H. (2007). Globus pallidus external segment. *Prog. Brain Res.* 2007. 160: 111–133.
8. Hegeman DJ, Hong ES, Hernández VM, Chan CS. The external globus pallidus: progress and perspectives. *Eur J Neurosci.* 2016 May;43(10):1239-65.

9. Hawk JD, Wisdom EM, Sengupta T, Kashlan ZD, Colón-Ramos DA. A genetically encoded tool for reconstituting synthetic modulatory neurotransmission and reconnect neural circuits in vivo. Nat Commun. 2021 Aug 9;12(1):4795. doi: 10.1038/s41467-021-24690-9.

Адаптогенные свойства антиоксидантов

Жигачева И.В.^{2*}, Крикунова Н.И.²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук;

²;
zhigacheva@mail.ru

Митохондрии занимают ключевые позиции в энергетических, окислительно-восстановительных и обменных процессах в клетке. Тем не менее, в условиях стресса эти органеллы являются одним из основных источников активных форм кислорода (АФК) [1]. Избыточная генерация АФК, приводят к перекисидации липидов мембран, прежде всего кардиолипина, и набуханию митохондрий. Следствием «перекисного» набухания митохондрий (или образования больших пор во внешней мембране) является высвобождение апоптогенных белков из межмембранного пространства в цитоплазму и активация митохондриального пути апоптоза. Можно предположить, что препараты, снижающие избыточную генерацию АФК митохондриями будут повышать устойчивость организма к действию стрессовых факторов. На эту роль в первую очередь претендуют антиоксиданты. Объектом исследования были выбраны антиоксиданты из класса пространственно затрудненных фенолов: калий фенозан (калий 3,5-Ди-трет-бутил-4-гидроксифенил пропионат) и натрий анфен (натрий (1-карбоксо-1)-(N-метиламид) - 2- (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилпропионат)), антиоксидант-производное 3-оксипиридина, являющийся гетероциклическим аналогом ароматических фенолов: 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиний гидрокси-бутан-диоат (этоксидол) и антиоксидант природного происхождения - полифенол ресвератрол. Целью исследования было изучение эффектов исследуемых антиоксидантов на функциональное состояние митохондрий печени крыс в условиях стресса.

Поскольку в условиях стресса основным источником АФК являются митохондрии, необходимо было разработать модель имитирующую стресс, т.е. найти условия, при которых будет увеличиваться продукция АФК митохондриями, а, следовательно, будет активироваться ПОЛ [2]. Эту задачу мы решили, разработав модель «старения» (инкубация митохондрий в гипотонической среде при комнатной температуре). «Старение» вызывало рост генерации АФК, что нашло отражение в увеличении интенсивности флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в 3 раза. Введение препаратов в среду инкубации митохондрий приводило к снижению флуоресценции продуктов ПОЛ, и это снижение зависело от концентрации препарата в среде инкубации. Натрий анфен в концентрациях 10⁻⁹- 10⁻¹¹, 10⁻¹³ и 10⁻¹⁴ М снижал интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ до контрольного уровня. Наиболее эффективными концентрациями для калий фенозана были 10⁻⁷- 10⁻⁸ и 10⁻¹³ и 10⁻¹⁴ М, а для этоксидола - 10⁻⁵ М. Что касается ресвератрола, то для него эффективными концентрациями являлись 10⁻⁶-10⁻¹⁴ М. В более высоких концентрациях он проявлял прооксидантные свойства. Снижение интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ препаратами, вероятно, свидетельствовало о том, что они обладают антистрессовыми свойствами, наличие которых проверили на модели острой гипобарической гипоксии (ОГГ).

Выбор модели ОГГ обусловлен активацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) и дисфункцией митохондрий в этих условиях [3,4].

В эксперименте использовали препараты в дозах эффективно снижающих интенсивность ПОЛ в модельном эксперименте: натрий анфен 10⁻⁹ моль/кг, калий фенозан -10⁻⁸ моль/кг, этоксидол - 2×10⁻⁵ моль/кг, ресвератрол 10⁻⁵ моль/кг. ОГГ приводила к активации ПОЛ в мембранах митохондрий: интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ возрастала в 2-4 раза. Введение крысам натрий анфена, калий фенозана за 45 минут до воздействия предотвращало активацию ПОЛ. Введение 2×10⁻⁵ моль/кг этоксидола в течение 7 дней или 10⁻⁵ моль/кг ресвератрола в течение 5 дней до стрессового воздействия также приводило к снижению интенсивности ПОЛ до контрольного уровня. Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий, обусловленные перекисидацией липидов мембран могли повлиять на липид - белковые взаимодействия, а следовательно, и на активность ферментов дыхательной цепи митохондрий. Действительно, ОГГ приводила к 27% снижению максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов и 38% уменьшению эффективности окислительного фосфорилирования. Натрий анфен и калий фенозан, введенные животным за 45 минут до воздействия предотвращали изменения функциональных характеристик митохондрий печени. Такой же результат был достигнут 7-дневным введением этоксидола или 5-дневным введением ресвератрола.

Предотвращая активацию ПОЛ в условиях стресса и тем самым предупреждая изменения функциональных характеристик митохондрий, препараты влияли и на физиологические показатели:

продолжительность жизни животных при введении антиоксидантов до стрессового воздействия в условиях различных видов гипоксии возрастала в 1,8-3 раза, а выживаемость - увеличивалась на 10-40%.

На основании этих данных можно прийти к заключению, что исследуемые антиоксиданты могут быть использованы как адаптогены. Препараты, предотвращая активацию ПОЛ, вероятно, обеспечивают эффективную работу электрон-транспортных цепей митохондрий за счет предупреждения снижения активности НАД-зависимых дегидрогеназ.

Список литературы

1. Тодоров И.Н. Рос. хим. Журнал. 2007, 51, 93-106
2. Гривенкова В. Г., Виноградов А. Д. Успехи биологической химии, 2013, 53, 245–296
3. Лукьянова Л.Д. Бюл. эксперим. биол. мед. 1997, 124 (9) 244
4. Лукьянова Л.Д., Ушаков И.Б. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и клинические аспекты. М.: Истоки, 2004, 850 с.

Адгезия – мишень противоопухолевой терапии

Бочарова О.А.^{1*}, Карпова Р.В.¹, Бочаров Е.В.¹, Кучеряну В.Г.²

¹*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия;*

²*Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАН, Москва, Россия; imufarm@rambler.ru*

Нарушение дифференцировки клеток при потере контроля над пролиферацией считают неотделимой чертой опухолевых клеток. Пристального внимания заслуживает тот факт, что при этом клетки опухоли утрачивают взаимодействие друг с другом, с эффекторами иммунитета и как результат со всем организмом. При этом нарушение адгезионных взаимодействий мы можем полагать в качестве ключевого механизма неоплазии [1].

Началом серии наших работ, посвященных этой проблеме, послужили исследования определения силы сцепления клеток в ткани (печени и легкого) по методу Комана в раннем постнатальном онтогенезе у 7 различных инбредных линий мышей – СВА, СЗНА, СЗН, Balb/c, CC57Br, А, С57Bl. Так, было установлено неизвестное ранее явление увеличения сил сцепления при межклеточном взаимодействии в эпителиальных тканях в раннем постнатальном периоде, что приводит к завершению формирования гомеостатической системы ткани и обеспечивает повышение ее устойчивости, в том числе к процессам бластоогенеза [2,3,4].

Также было обнаружено, что экстракты адаптогенов (*Panax ginseng*, *Rhodiola rosea*) усиливают силу сцепления клеток в тканях, предрасположенных к опухолевому росту. При этом введение экстракта *Rhodiola rosea* высококорактовым мышам-самцам СВА в профилактическом и лечебном режимах повышало силу сцепления клеток ткани-мишени (печени), оказывало иммуно-, гормонотонизирующее и антистрессовое действие, а также снижала и частоту гепатокарцином во второй половине онтогенеза [5]. В онкоклинике также было продемонстрировано, что применение экстракта *Rhodiola rosea* усиливает силу сцепления клеток уротелия мочевого пузыря (гомотипическую гистоспецифическую адгезию), оказывая иммуномодулирующий эффект при повышении экспрессии бета2-лейкоцитарных интегринов (гетеротипической иммуноадгезии), снижая частоту рецидивов рака мочевого пузыря у пациентов [6].

Следует отметить, что из растений-адаптогенов (*Panax ginseng*, *Rhodiola rosea*, *Eleutherococcus senticosus* и др.), конечно, были выделены чистые биологически активные соединения. Однако их применение ограничено по многим причинам, включая низкую биодоступность, быстрое выведение из организма и высокую токсичность. Поэтому использование экстрактов остается предпочтительным. В свою очередь, применение экстрактов отдельных растений сопровождается нарастающей толерантностью, то есть утратой действия на организм. Мы попытались решить эту проблему при разработке комплексного препарата.

Мы разработали мультифитоадаптоген (МФА), включающий компоненты 40 экстрактов растений, в том числе адаптогенов (*Panax ginseng*, *Rhodiola rosea*, *Eleutherococcus senticosus* и др.), эффективный для профилактической онкологии и возрастных патологий и не вызывающий толерантности у пациентов. Однако в клинических исследованиях нам не удалось поэтапно и детально продемонстрировать коррекцию адгезивных механизмов, вероятно, играющих ключевую роль в противоопухолевой активности МФА. Мы решили исследовать роль иммуноадгезивных взаимодействий между опухолевыми клетками и эффекторами иммунитета в контроле опухолеобразования, продолжительности и качества жизни в большом эксперименте на высококорактовых мышках-самцах СВА (около 1000), генетически предрасположенных к гепатокарциномам.

Препарат вводили в профилактическом и лечебном режиме. Было показано, что усиление экспрессии бета-2 лейкоцитарных интегринов значимо для повышения противоопухолевой цитотоксичности Т-лимфоцитов и продолжительности жизни [7]. Вместе с тем, учитывая информацию международной базы данных Cortelis Drug

Discovery Intelligens (2022), стало известно, что некоторые перспективные синтетические активаторы противоопухолевого Т-клеточного иммунитета и, в частности, инфильтрации опухолей цитотоксическими Т-лимфоцитами, «первые-в-своем-классе» (first-in-class) находятся на 1 фазе клинических испытаний. Среди них агонист молекулы адгезии LFA-1 (7HP349, Hills Pharma, США), а также агонист молекулы адгезии Mac-1 (ADH-503, Leukadherin1-cholin, GossamerBio, США). Этим подчеркивается актуальность и своевременность наших исследований.

Реализация адгезионной концепции создает определенную перспективу для повышения эффективности способов диагностики, профилактики и лечения, что может быть шагом к решению проблемы злокачественных новообразований.

Список литературы

1. Бочарова О.А. Адгезионные взаимодействия в биологии рака. Вестник РАМН, 2002, №1: 22-25.

2. Маленков А.Г., Бочарова О.А., Модянова Е.А. Явление увеличения сил сцепления при межклеточном взаимодействии в эпителиальных тканях в раннем постнатальном периоде. Открытие №330, зарегистрированное в государственном реестре открытий СССР «Открытия в СССР» Сборник кратких описаний открытий, внесенных в Государственный реестр открытий СССР / ГК по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР. Москва. ВНИИПИ. 1988 г., С. 30-31.

3. Ямскава В.П., Модянова Е.А., Левенталь В.И., Ланковская Т.П., Бочарова О.А., Маленков А.Г. Тканевоспецифические макромолекулярные факторы из печени и легкого: очистка и действие на механическую прочность тканей и клеток. Биофизика, 1977, Т.22, №1: 168-169.

4. Модянова Е.А., Бочарова О.А., Маленков А.Г. Профилактическое действие контактинов-кейлонов на спонтанный канцерогенез у линейных мышей. Экспериментальная онкология, 1983, Т.5, №3: 39-42.

5. Бочарова О.А., Серебрякова Р.В., Бодрова Н.Б. Профилактический эффект *Rhodiola rosea* на спонтанное опухолеобразование в печени на модели высококорактовой линии мышей. Вестник РАМН, 1994, № 5: 41-43.

6. Бочарова О.А., Матвеев Б.П., Барышников А.Ю. и др. Влияние экстракта *Rhodiola rosea* на частоту рецидивов поверхностного рака мочевого пузыря у людей. Урология и нефрология, 1995, № 2:46-47.

7. Bocharova O.A., Ionov N.S., Kazeev I.V. et al. Computer-Aided Evaluation of Polyvalent Medications' Pharmacological Potential. Multiphytoadaptogen as a Case Study. Molecular Informatics. 2023, Vol. 42, No 1, P. 1-11: e2200176, doi.org/10.1002/minf.202200176.

Активность глутаматных рецепторов в нейронах гиппокампа крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией

Курмашова Е.Д.¹, Гатаулина Э.Д.¹, Яковлев А.^{1*}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет ;
alv.yakovlev@gmail.com

Гомоцистеин – серосодержащая аминокислота, образующаяся из метионина, является фактором риска развития целого ряда патологий. Повышение уровня гомоцистеина (гипергомоцистеинемия, ГГЦ) во время беременности приводит к различным осложнениям беременности, гипоксии плода и, как следствие, развитию ранних и отсроченных постнатальных патологий. Одним из механизмов нейротоксического действия гомоцистеина является активация ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в клетках, стимуляция которых приводит к развитию гипервозбудимости нейронов, а длительное воздействие высоких доз в пренатальный период может приводить к изменению экспрессии, регуляции или активности ионотропных глутаматных рецепторов. Цель исследования проанализировать роль глутаматных рецепторов в развитии пренатальной ГГЦ в нейронах гиппокампа крыс в первую неделю постнатального развития. Эксперименты проводились на горизонтальных срезах гиппокампа крысят в первую неделю после рождения. Для создания хронической модели пренатальной ГГЦ использовалась пищевая метиониновая нагрузка в течение всей беременности самок крыс. Регистрация синаптической активности и соотношения АМПА/НМДА рецепторов в синапсах пирамидных нейронов гиппокампа осуществлялась при помощи пэтч-кламп регистрации: АМПА-рецептор-опосредованные возбуждающие постсинаптические токи (АМПА-ВПСТ) регистрировались при потенциале фиксации равном -70 мВ, а НМДА-рецептор-опосредованные ВПСТ (НМДА-ВПСТ) при +40 мВ и в присутствии блокатора АМПА-рецепторов CNQX (10 μM). Регистрация активности постсинаптических НМДА или АМПА-рецепторов осуществлялась с помощью фокальной аппликации NMDA (50 μM, 50 μM глицин, 10 мкM CNQX), или глутамата (1 mM, 40 μM d-APV) на расстоянии 150-200 μm от сомы нейронов. Для избежания десенситизации рецепторов агонисты апплицировались 5 мин интервалом. Все эксперименты по регистрации возбуждающих постсинаптических токов в синапсах CA3 гиппокампа выполнялись в присутствии блокатора ГАМК(A) рецептора – бикуккуллина (10 μM). В контрольных условиях в первую неделю постнатального развития мозга амплитуда и время спада спонтанных НМДА-ВПСТ в нейронах CA3 области гиппокампа

составляли 27 ± 1 пА и 76 ± 13 мс и ($n=20$) соответственно, а частота событий - 0.2 ± 0.1 Гц ($n=20$). В срезах гиппокампа крыс с пренатальной ГЦ регистрировалось уменьшение амплитуды и увеличение частоты спонтанных событий, без изменения времени спада. Фокальная аппликация агониста в контрольных условиях вызывала НМДА-опосредованный входящий ток в нейронах гиппокампа с амплитудой 0.9 ± 0.1 нА ($n=26$), а в условиях пренатальной ГЦ наблюдалось увеличение амплитуды ответов, постсинаптических НМДА-рецепторов до 1.6 ± 0.2 нА ($n=39$, $p < 0.05$). Анализ амплитудно-временных характеристик АМРА-ВПСТ показал увеличение как амплитуды, так и частоты спонтанных возбуждающих токов в нейронах гиппокампа. Амплитуда и время спада спонтанных АМРА-ВПСТ в контрольных условиях составили 17 ± 1 пА и 20 ± 2 мс ($n=16$), соответственно, а частота - 0.06 ± 0.01 Гц ($n=16$). Регистрация АМПА-опосредованных спонтанных событий в нейронах СА3 области гиппокампа крыс с пренатальной ГЦ показало достоверное увеличение как амплитуды, так и частоты АМРА-ВПСТ, без достоверного изменения времени спада. Анализ распределения амплитуд АМРА-ВПСТ в нейронах гиппокампа показал увеличения количества событий с высокой амплитудой в условиях пренатальной ГЦ. Фокальная аппликация глутамата в контрольных условиях вызывала АМРА-опосредованный входящий ток в нейронах гиппокампа с амплитудой 0.4 ± 0.02 нА ($n=55$), а в условиях пренатальной ГЦ наблюдалось увеличение амплитуды ответов, постсинаптических АМРА-рецепторов до 0.6 ± 0.03 нА ($n=29$, $p < 0.05$). Таким образом, полученные данные свидетельствуют что хроническая высокая концентрация гомоцистеина в пре и постнатальный период развития мозга крыс вызывает изменение активности НМДА и АМПА-рецепторов нейронов гиппокампа. Можно предположить, в условиях пренатальной ГЦ в нейронах происходит изменение субъединичного состава или количеством рецепторов на постсинаптической мембране, что лежать в основе повышенной чувствительности гиппокампа крыс с пренатальной ГЦ к генерации эпилептоформной активности. Работа выполнена за счёт средств РНФ 20-15-00100.

Анализ активности нейронной сети гиппокампа *in vivo* у свободно движущейся мыши

Герасимов Е.И.^{1*}, Митенев А.В.¹, Пчицкая Е.И.¹, Ерофеев А.И.¹, Чуканов В.С.¹, Власова О.Л.¹,
Безпрозванный И.Б.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого;

²Юго-западный медицинский центр Техасского университета;
evgeniigerasimov1997@gmail.com

Визуализация нейрональной активности определённой области головного мозга свободно передвигающегося животного *in vivo* позволяет получить обширный массив информации о паттернах работы нейронов, изменениях в их возбудимости и взаимосвязи между друг другом [1]. Методом, который позволяет регистрировать активность отдельных групп нейронов у мыши, находящейся в свободном движении, является миниатюрная флуоресцентная микроскопия – минископ [2]. При массе микроскопа в 3 грамма минископ обладает разрешением, достаточным для визуализации отдельных нейронов, что позволяет детектировать изменения в работе нейронов при помощи экспрессии в них генетически кодируемых кальциевых индикаторов – GCaMP6f.

В данном исследовании инъекция вируса AAV1-Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40 была выполнена в гиппокамп (AP -2.1, ML +2.1, DV -1.8) 5-месячных мышей линии B6SJL, и через 3 недели над областью интереса фиксировалась градиентная линза, которая является оптическим путем для минископа. Далее осуществлялась имплантация опорной площадки, на которую в последствии фиксировался минископ для визуализации кальциевой динамики нейронов гиппокампа. Аккомодация к миниатюрному флуоресцентному минископу Miniscope v3 проводилась в экспериментальных условиях теста «открытое поле» в течении 3 дней. Для перехода от качественного анализа данных о нейрональной активности, полученных методом минископ, был разработан программный пакет на языке Python, который дает возможность исследователям количественно оценить данные, за счет вычисления статистических данных о нейронной сети, в данном случае гиппокампа. На начальном этапе определяется активное состояние нейрона, поиск промежутков, когда внутриклеточная концентрация кальция увеличивается, что приводит к увеличению интенсивности кальциевого индикатора GCaMP6f. Активное состояние нейрона определяется, опираясь на производные входных сигналов после первичной обработки посредством программного продукта Minian. Нейрон находится в активном состоянии, если производная его сигнала превышает пороговое значение, которое высчитывается по данной формуле: **$threshold = median(x) + mad(x)$** , где x – значения производной сигнала, mad – среднее абсолютное отклонение. Далее производится вычисление статистик, описывающих поведение нейронной сети: уровень активности нейронной сети – количество активных нейронов за определенный промежуток времени; расчет попарных корреляций между нейронами с вычислением коэффициента Пирсона; всплесковая активность нейронов - количество «активаций клетки» за установленный промежуток времени. По полученным

распределением значений корреляции вычисляется связность – доля связанных нейронов в зависимости от порогового уровня. Также реализован модуль оценки зависимости коэффициента корреляции между нейронами от расстояния между ними.

На следующем этапе, был реализован модуль перемешивания. Этот модуль необходим для определения закономерности полученных статистик (они имеют биологическую/ физиологическую природу) или же они являются случайными величинами. При сравнении значений статистик, полученных на исходных данных, а также перемешанных, наблюдается уменьшение среднего значения каждой из представленных статистик для каждого из дней регистрации минископом. Это, вероятно, связано с тем, что при перемешивании данных происходит утеря информации о связях между нейронами, которая обуславливает исходные значения статистик. На основе этих данных можно предположить, что регистрируемое изменение внутриклеточной концентрации кальция, которое коррелирует с изменениями возбудимости нейронов, и статистики, вычисленные на основе анализа кальциевых сигналов, являются биологически значимыми, определяющими функционирование нейронной сети гиппокампа.

Данный подход к изучению работы нейронных сетей головного мозга, в частности гиппокампа, позволит определить и зарегистрировать нарушения в их работе, при патологических состояниях головного мозга в неврологических и нейродегенеративных заболеваниях, в том числе и при болезни Альцгеймера.

Работа была поддержана программой стратегического академического лидерства “Приоритет 2030” Российской Федерации (Соглашение 75-15-2021-1333 от 30.09.2021 с СПбПУ).

1. Lütcke H. Steady or changing? Long-term monitoring of neuronal population activity / H. Lütcke, D.J. Margolis, F. Helmchen // Trends in Neurosciences. – 2013. – Vol. 36. – № 7. – P. 375-384.

2. Miniature fluorescent microscope: History, application, and data processing / E.I. Gerasimov [et al.] // Zhurnal Vysshei Nervnoi Deyatelnosti Imeni I.P. Pavlova. – 2020. – Vol. 70. – № 6. – P. 852-864.

Анализ гомоцистеин-тиолактон индуцированной эпилепсии в гиппокампе крыс разного возраста

Герасимова Е.В.², Яковлев А.В.¹, Еникеев Д.Р.³, Богатенков Г.Е.¹, Ситдикова Г.Ф.^{1*}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

²Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия;

³ФГБУН Институт физиологии им. И.П.Павлова Российской академии наук;

sitdikovaguzel@gmail.com

Актуальность. Эпилепсия — хроническое неврологическое заболевание, характеризующееся повторяющимися припадками, которые возникают в результате чрезмерных нейронных разрядов и сопровождаются разнообразными нарушениями двигательных, чувствительных, вегетативных и психических функций.

Одним из этиологических факторов в развитии эпилепсии может являться накопление в организме серосодержащей аминокислоты – гомоцистеина. Даже небольшое повышение уровня гомоцистеина в плазме коррелирует с возрастными когнитивными нарушениями, нейродегенеративными и цереброваскулярными заболеваниями, развитием эпилепсии [1, 2]. Одним из механизмов нейротоксического действия гомоцистеина является активация ионотропных и метаболитных рецепторов глутамата в нейронах, избыточная стимуляция которых вызывает гипервозбудимость [3,4,5].

Цель исследования: исследование влияния метаболита гомоцистеина -гомоцистеин-тиолактона (ГЦ-ТЛ) на электрическую активность в гиппокампе крыс.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на крысах линии Wistar двух возрастов р6–8 и р35–90. 16-канальный электрод помещали в гиппокамп, электрическую активность регистрировали в зоне СА1. Раствор ГЦ-ТЛ или искусственную цереброспинальную жидкость объемом 2 мкл вводили в зону СА1 с помощью микроинъектора со скоростью 200 нл/с. ГЦ-ТЛ вводили в дозах 0.24*10⁻⁶ мг, 0.24*10⁻³ мг, 0.03 мг, 0.06 мг или 0,12 мг. С помощью пакета программ MatLab оценивали общую спектральную мощность локальных полевых потенциалов (ЛПП) и частоту множественных потенциалов действия (МПД).

Результаты.

В контроле в СА1 зоне гиппокампа у животных р6-8 наблюдалась низкая электрическая активность, включающая редкие низкочастотные волны в тета диапазоне и вспьшки МПД продолжительностью от 0,5 до 3 с. У животных р35-95 наблюдалась высокая электрическая активность соответствующая возрасту животных.

Введение ACSF (2 мкл) или ГЦ-ТЛ в низких дозах 0.24*10⁻⁶мг, 0.24*10⁻³мг в гиппокамп не приводило к изменению электрической активности в исследуемых группах.

ГЦ-ТЛ в дозах 0.03-0.12 мг приводил к развитию эпилептиформной активности в виде увеличения спектральной мощности ЛПП в альфа и тета-диапазонах. В группе р6-8 у 3 животных из 4 после введения ГЦ-ТЛ (0.03 мг) наблюдалось быстрое (в течение первых 1-2 минут) развитие эпилептиформной активности: спектральной мощности ЛПП повышалась до $1331 \pm 662\%$ ($p < 0.05$, $n=3$) и частота МПД - до $1155 \pm 598\%$ ($p < 0.05$, $n=3$). В группе р35-90 увеличение частоты МПД наблюдалось только у 2 из 4 животных до $212 \pm 82\%$ через 10 минут после аппликации ГЦ-ТЛ, которое достигало $343 \pm 61\%$ к 30-40 минутам ($p < 0.05$, $n=2$). Введение ГЦ-ТЛ в дозе 0.06 мг в группе р6-8 ($n=4$) приводило к возникновению эпилептиформной активности у всех животных: спектральная мощность ЛПП и частота МПД повышались до $463 \pm 156\%$ и $259 \pm 45\%$ ($p < 0.05$, $n=4$), соответственно. В группе р35-90 ($n=4$) ГЦ-ТЛ (0.06 мг) вызывал эпилептиформную активность у 3 из 4 животных: спектральная мощность ЛПП повышалась до $454 \pm 32\%$ ($p < 0.05$, $n=3$) и частота МПД - до $396 \pm 126\%$ ($p < 0.05$, $n=2$).

ГЦ-ТЛ в дозе 0.12 мг у всех животных в обеих группах вызывал эпилептиформную активность, наблюдалось увеличение спектральной мощности ЛПП и частоты МПД у группы р6-8 до $1205 \pm 596\%$ и $956 \pm 203\%$, а в группе р35-90 до $856 \pm 143\%$ и $296 \pm 98\%$ ($p < 0.05$), соответственно.

Латентный период возникновения эпилептиформной активности у животных р6-8 был достоверно короче, чем у животных группы р35-90 в дозах 0.06 и 0.12 мг, и составил у группы р6-8: 3.23 ± 0.29 мин и 2.01 ± 0.12 мин, соответственно. В группе р35-90 латентный период составил 6.2 ± 1.8 мин после введения ГЦ-ТЛ (0.06 мг), 4.92 ± 1.61 мин - ГЦ-ТЛ (0.12 мг) ($P_u < 0.05$).

Таким образом, ГЦ-ТЛ при введении в гиппокамп дозозависимо приводил к усилению электрической активности и вызывал эпилептиформную активность начиная с концентрации 0,03 мг у животных возраста р6-8 и 0.06 мг - у крыс возраста р35-90. Полученные данные свидетельствует о высокой чувствительности животных к ГЦ-ТЛ в первую постнатальную неделю развития и экспериментально подтверждают высокий риск развития эпилепсии у детей с высоким уровнем гомоцистеина в пренатальный или ранний постнатальный периоды. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-15-00100)

Список литературы:

1. Sitdikova, G.F.; Hermann, A.; Yakovlev, A.V. Neurotoxic and neuroprotective effects of homocysteine and hydrogen sulfide. *Uchenye Zap. Kazan. Univ. Seriya Estestv. Nauk.* 2018, 160, 686–704.
2. Gerasimova E, Yakovleva O, Burkhanova G, Ziyatdinova G, Khaertdinov N, Sitdikova G. Effects of Maternal Hyperhomocysteinemia on the Early Physical Development and Neurobehavioral Maturation of Rat Offspring // *BioNanoSci.* 2017 March; 7:155–158.
3. Yakovlev AV, Kurmashova ED, Zakharov A, Sitdikova GF. Network-Driven Activity and Neuronal Excitability in Hippocampus of Neonatal Rats with Prenatal Hyperhomocysteinemia // *BioNanoSci.* 2018 March; 8(1): 304–309.
4. Kurmashova ED, Gataulina ED, Zefirov, AL, Sitdikova GF, Yakovlev AV. Effects of Homocysteine and its Derivatives on Spontaneous Network Activity in the Hippocampus of Neonatal Rat Pups // *Neurosci Behav Physiol.* 2020 Oct 7; 50(7):1236-1246.
5. Gerasimova E, Burkhanova G, Chernova K, Zakharov A, Enikeev D, Khaertdinov N, Giniatullin R, Sitdikova G. Hyperhomocysteinemia increases susceptibility to cortical spreading depression associated with photophobia, mechanical allodynia, and anxiety in rats // *Behav Brain Res.* 2021 Jul 9;409:113324.

Анализ фагоцитарной активности дендритных клеток, сокультивируемых с умирающими и мертвыми клетками глиомы GL261, подвергшихся фотодинамическому воздействию на основе тетрацианотетра(арил)порфирина (pz IV)

Слепцова Е.Е.^{1*}, Савюк М.О.¹, Турубанова В.Д.¹, Редькин Т.С.¹, Ведунова М.В.¹, Крысько Д.В.^{1,2,3}

¹ИББМ, ННГУ им. Н. И. Лобачевского;

²Институт исследования рака, Гент, Бельгия;

³Лаборатория исследования и терапии гибели клеток (CDIT), факультет анатомии и реабилитации человека, Гентский университет, Гент, Бельгия;

ees222@list.ru

В предыдущих работах было показано наличие иммуногенного потенциала умирающих и мертвых клеток глиомы GL261, подвергшихся фотодинамическому воздействию (ФДТ) на основе pz IV. Эти клетки активно испускают ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны, такие, как АТФ и HMGB1, а также экспонируют белок кальретикулин на клеточную мембрану, что является сигналом для активации антигенпрезентирующих клеток.

В настоящей работе иллюстрируется, что клетки, умирающие в результате ФДТ активно фагоцитируются дендритными клетками.

Было проведено моделирование иммунного ответа на опухолевые антигены. Клетки глиомы GL261 предварительно метили CellTracker Green CMFDA и подвергали их фотоиндуцируемой клеточной гибели на основе рз IV. После чего их собирали и в течение 2 часов сокультивировали с незрелыми дендритными клетками, предварительно изолированными из костного мозга мыши C75/B17. Далее клетки окрашивали антителами PE-Cy-anti-CD11c и анализировали методом проточной цитометрии. В качестве контроля использовались дендритные клетки, сокультивированные с живыми неиндуцированными опухолевыми клетками и клетками, убитыми неиммуногенным путем.

Было показано, что клетки, подвергшиеся фотоиндукции на основе рз IV, активно фагоцитируются антигенпрезентирующими клетками, в отличие от живых клеток и клеток, убитых несколькими циклами заморозки-оттаивания. Таким образом, клетки глиомы подвергшиеся фотоиндуцированной клеточной гибели на основе рз IV могут вызывать более активный иммунный ответ. Однако для формирования полноценного вывода необходимо также рассмотреть фенотипическую активацию дендритных клеток, а также проанализировать процесс высвобождения основных сигнальных молекул IL-12 p70 и IL-6 активированными дендритными клетками.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00716, <https://rscf.ru/project/22-25-00716/>

Аспекты оценки метрологических характеристик биофизических методов в клинической практике

Семенова Е.В.^{1*}

¹*Первый Санкт-Петербургский государственный университет имени акад. И.П. Павлова;*
katemelnikova@mail.ru

Лабораторная медицина в ряду медицинских наук является самой восприимчивой к внедрению достижений наук фундаментальных. И именно лабораторные методы сформировали представления о саногенетических системах, а индивидуальная клиническая картина болезни формируется сочетанием патогенеза и саногенеза.

Оценка метрологических характеристик биофизических методов в формировании диагностической информативности лабораторных технологий основано на применении разнообразных методов медицинской информатики.

Алгоритмы информационной поддержки клинических решений позволяют из имеющихся данных выделять минимальный набор признаков, которые обеспечивают наилучшие результаты. Результаты чувствительных, но неспецифичных биофизических технологий приобретают значимую диагностическую эффективность при применении современных методов медицинской информатики и становятся инструментом доказательной медицины (В.С. Дюк и др, 2018).

Однако биофизические технологии практически не представлены в «Реестре нормативно-справочной информации системы здравоохранения», в частности, в «Федеральном справочнике лабораторных исследований. Справочник лабораторных тестов» (актуальная версия 3.36 от 29.07.2022).

Аналитическое преимущество биофизических методов заключается в том, что они не нарушают нативные свойства биоматериалов и межмолекулярные связи. В отличие, например, от биохимических исследований, которые, как правило, регистрируют продукты химических реакций. Цель биохимического исследования - измерение концентрации того или иного аналита в биологической пробе, которая при этом подвергается разрушению и становится средой для проведения химических реакций. Полученный результат *in vitro* аппроксимируется на содержание этого компонента в биологической среде *in vivo* (Ю.А.Митин и др., 2021; Landa, S et al. 2022)

Исследованы возможности интегрального биофизического метода «динамического светорассеяния» - метода лазерной корреляционной спектроскопии, который позволяет оценивать субфракционный состав биологических жидкостей по величине частиц в широком диапазоне значений от единиц до тысяч нанометров. Метод, неспецифичный с точки зрения состава биологической жидкости, но с перспективой возможности исследовать полидисперсные биологические среды, не нарушая их нативные свойства.

Расширяется применение метода изучения спектральных характеристик биологических субстанций с помощью инфракрасного излучения. Метод основан на регистрации колебательных спектров молекул, что дает детальную информацию о состоянии молекул или функциональных групп в исследуемом образце. Важным преимуществом метода ИК спектроскопии является возможность следить за межмолекулярными взаимодействиями с белками. Помимо этого, преимуществами являются: высокая чувствительность,

возможность использовать небольшие количества исследуемого образца, удобство нанесения и измерения. Также ИК-спектроскопия Фурье не требует оптической прозрачности образца, что позволяет измерять спектр белка в суспензии, в агрегированном состоянии, в составе крупных фрагментов мембран.

Актуальным представляется исследование особенностей белкового состава центров кристаллизации. Особым патохимическим процессом является нарушение коллоидной устойчивости биологических сред, прежде всего мочи, приводящих к патологической кристаллизации минеральных компонентов и развитию уролитиаза.

Так как это биофизический феномен фазового перехода из состояния золя в гель, но который зависит от состава биологической среды, изучение причинно-следственных связей и биохимического состава и биофизических свойств остаются актуальной проблемой как фундаментальной науки, так и важным компонентом прикладных исследований для повышения диагностики различных заболеваний.

Биомиметические носители биологически активных веществ, чувствительные к внешним физическим воздействиям

Потапенков К.В.^{1,2*}, Григорян И.В.^{1,4}, Спиридонов В.В.³, Ярославов А.А.³, Таранов И.В.⁴, Черепенин В.А.⁴, Гуляев Ю.В.⁴, Хомутов Г.Б.^{1,4}

¹Физический факультет МГУ им.М.В.Ломоносова;

²МИРЭА - Российский технологический университет;

³Химический факультет МГУ им.М.В.Ломоносова;

⁴Институт радиотехники и электроники им. Котельникова;

potapenkov.kirill@physics.msu.ru

Важным и актуальным направлением исследований в биофизике и ряде смежных областей науки, связанным с решением проблемы кардинального повышения эффективности лекарственной терапии онкологических и ряда других заболеваний, является создание биосовместимых средств капсулирования, адресной доставки и управляемого высвобождения биологически активных веществ (в том числе лекарственных препаратов) непосредственно в целевые области организма. Несмотря на постоянно возрастающее число научных групп по всему миру, активно работающих в данном направлении, поиски эффективных подходов к решению этой проблемы весьма далеки от завершения.

Нами были разработаны новые биосовместимые коллоидные носители для управляемой доставки биологически активных веществ в водных средах включая биологические жидкости. Основой для них послужили биомиметические везикулы - липосомы из фосфатидилхолина, функционализированные неорганическими наночастицами. Для функционализации липосом использовались наночастицы магнетита или золотые наночастицы, обеспечивающие восприимчивость носителей лекарственных препаратов к внешним управляющим физическим воздействиям. Функциональные неорганические наночастицы были локализованы непосредственно в гидрофобной области бислойной липидной мембраны. Возможность реализовать данную ключевую особенность описываемых везикул-носителей обеспечивалась путем предварительной гидрофобизации наночастиц.

Внутри полученных нанокомпозитных везикул-носителей были загружены такие модельные вещества, как противораковый антибиотик доксорубин и флуоресцентный краситель карбоксифлуоресцеин. Возможность выхода данных капсулированных модельных веществ из везикул можно количественно оценить, используя их флуоресценцию, обладающую характерным эффектом концентрационного тушения.

Было исследовано воздействие внешних импульсных электрических полей на нанокомпозитные везикулы с гидрофобизованными наночастицами золота в мембране, загруженные доксорубином. С этой целью образцы растворов, содержащие везикулы, подвергались воздействиям импульсов электрического поля напряженностью порядка $2,25 \cdot 10^6$ В/м и длительностью порядка 10 нс. До и после воздействия измерялась интенсивность флуоресценции доксорубина, а на основании относительного изменения интенсивности флуоресценции оценивалась степень разрушения липосом и изменения их проницаемости для капсулированных молекул.

Полученные данным образом экспериментальные данные указывают на выход капсулированного доксорубина из нанокомпозитных везикул в результате импульсного электрического воздействия. В качестве дополнительного метода, подтверждающего разрушение находившихся в растворе везикул, была использована просвечивающая электронная микроскопия.

Эффект разрушения нанокомпозитных везикул под действием внешних импульсов электрического поля объясняется значительным возрастанием напряженности электрического поля вблизи проводящих золотых наночастиц в результате их поляризации во внешнем электрическом поле. Это может приводить к локальному

пробую липосомальных мембран вблизи частиц и разрушению липосомы с высвобождением капсулированных веществ.

Магнетит обладает полупроводниковыми свойствами, что обеспечивает восприимчивость везикул, функционализированных наночастицами магнетита, к внешним электрическим полям, как и в случае с золотыми наночастицами. Однако наибольший интерес представляет воздействие внешними полями на везикулы, имеющие локализованные непосредственно в мембране наночастицы магнетита. Мембраны липосом с локализованными в гидрофобной области наночастицами магнетита можно рассматривать как магнитоэластик.

Нами изучалось воздействие внешних магнитных полей на липосомы, содержащие в мембранах гидрофобизованные наночастицы магнетита; в качестве модельного вещества, загружаемого внутрь, использовался краситель карбоксифлуоресцеин. Раствор, содержащий наноконструктивные везикулы, выдерживался в постоянном магнитном поле напряженностью 1,9 кЭ в течение часа. До и после воздействия производилось измерение интенсивности флуоресценции образца.

Изменение интенсивности флуоресценции карбоксифлуоресцеина указывает на выход красителя из везикул-носителей в раствор под действием внешнего магнитного поля. Как и в случае экспериментов с электрическим полем, везикулы, подвергавшиеся воздействию магнитного поля, были дополнительно охарактеризованы методом ПЭМ. Анализ полученных данным методом микрофотографий указывает на изменение формы липосом с квази-сферической на эллипсоидальную.

Теоретические расчеты на основе аналогии с электростатической моделью, а также численное решение уравнения Лапласа для сферического слоя феррожидкости во внешнем магнитном поле, указывают, что форма вытянутого вдоль направления напряженности внешнего магнитного поля эллипсоида является наиболее энергетически выгодной. Наноконструктивные магнитные липосомы меняют свою форму со сферической на эллипсоидальную под действием внешнего магнитного поля, мембраны таких везикул деформируются, что приводит к возрастанию их проницаемости для молекул красителя.

Обнаруженные нами эффекты открывают возможность создания новых биомиметических биосовместимых коллоидных систем капсулирования лекарственных препаратов, обладающих возможностью управляемого нетермического высвобождения капсулируемых веществ с использованием внешних физических воздействий.

I. Khomutov G.B., Kim V.P., Koksharov Yu.A., Potapenkov K.V., Parshintsev A.A., Soldatov E.S., Usmanov N.N., Saletsky A.M., Sybachin A.V., Yaroslavov A.A., Taranov I.V., Cherepenin V.A., Gulyaev Y.V., Nanocomposite biomimetic vesicles based on interfacial complexes of polyelectrolytes and colloid magnetic nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 532 (2017) P. 26–35.

Биофизические закономерности изменений содержания монооксида азота и меди в мозге крыс при моделировании ишемии головного мозга

Гайнутдинов Х.Л.^{1,2*}, Андрианов В.В.^{2,1}, Яфарова Г.Г.², Базан Л.В.¹, Богодвид Т.Х.^{2,3}, Июдин В.С.¹, Филипович Т.А.⁴, Шанько Ю.Г.⁴, Токальчик Ю.П.⁴, Кульчицкий В.А.⁴

¹Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского ФИЦ КазНЦ РАН, Казань;

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань;

³Поволжский университет физической культуры, спорта и туризма, Казань;

⁴Центр мозга, институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь;

kh_gainutdinov@mail.ru

Монооксид азота (NO) является одной из ключевых сигнальных молекул, которые регулируют функции организма, включая нервную систему, как в норме, так и при патологии [1]. Исследования роли NO в жизнедеятельности организмов начались вскоре после обнаружения регуляции NO нормального сосудистого тонуса, как медиатора вазодилатации [2,3,4]. С помощью синтаз уровень NO контролируется в нейронах, нейроглии и микроглии мозга в норме и при патологии путем ферментативных и неферментативных реакций. В естественных условиях функция NO согласуется и координируется с множеством иных регуляторных систем в нервной ткани. Большой интерес привлекает участие NO в механизмах развития различных патологических состояний организма [5]. Обнаружено, что при патологических процессах NO играет как протекторную роль, так и деструктивную, что определяется многими факторами [6]. При развитии патологических процессов в мозге (гипоксия и ишемия) регуляторные системы мозга (включая NO систему) увеличивают активность, что естественным образом сопровождается возрастанием потребления кислорода (что усугубляет гипоксию) и увеличением недоокисленных продуктов в ткани мозга [4,7].

Роль NO системы в этих условиях систематически изучается фактически во всех странах мира, но в этой проблеме фундаментального и прикладного характера есть много неясностей. Одной из причин такой пессимистической ситуации является техническая сложность контроля уровня NO, поскольку NO образуется в процессе быстрых химических реакций с вовлечением широкого спектра молекул и посредников, среди которых металлы, тиолы, свободные радикалы, аминокислоты, кальций, кислород. Поэтому является актуальным изучение биофизических закономерностей изменений содержания NO в мозге при ишемических процессах в головном мозге. Встает вопрос об использовании современного метода обнаружения и количественного определения содержания NO в тканях живых организмов в норме и при экспериментальном моделировании патологий. Одним из наиболее эффективных методов выявления и количественного определения NO в биологических тканях является метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [8]. Это произошло благодаря методике, разработанной профессором Ваниным и др., которая основана на реакции радикала (в данном случае NO) со спиновой ловушкой. В результате реакции образуется аддукт с характерным спектром ЭПР. Авторы применили комплекс Fe²⁺ с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) для захвата NO и формирования устойчивого тройного комплекса (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO в тканях животных. Эти комплексы характеризуются легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g-фактора $g=2.035 - 2.040$ и триплетной сверхтонкой структурой [8, 9]. Метод обладает чувствительностью 0.04–0.4 nM, позволяет проводить прямые измерения, является высокочувствительным за счет применения спиновых ловушек [8]. Авторы предприняли попытку детализировать отдельные биофизические закономерности образования монооксида азота при ишемии головного мозга. Целью данной работы было исследование методом ЭПР спектроскопии с применением методики спиновых ловушек последствий экспериментального ишемического повреждения мозга на интенсивность продукции NO и содержания меди (как показателя супероксиддисмутазы) в гиппокампе крыс.

Результаты показывают достоверное снижение содержания NO в гиппокампе через 1 день после моделирования ишемии, вызванной перевязкой сонных артерий. При проведении моделирования ишемии с одновременным интраназальным введением мезенхимальных стволовых клеток (МСК) не было обнаружено достоверного отличия содержания NO относительно ишемизированных крыс. Через 2 дня содержание NO в гиппокампе ишемизированных крыс восстановилось. В гиппокампе крыс, у которых было проведено моделирование ишемии с одновременным интраназальным введением МСК, через 2 дня не было обнаружено достоверного отличия содержания NO относительно ишемизированных крыс. Содержание меди в гиппокампе крысы через 1 день после моделирования ишемии, вызванной перевязкой сонных артерий, недостоверно снижалось, а через 2 дня наблюдалась тенденция к увеличению. Т.е., как и при измерениях NO прослеживалась тенденция к восстановлению уровня, характерного для интактных животных. Итак, обнаружена тенденция к усилению эффективности работы антиоксидантной системы как через 1, так и через 2 дня после ишемии.

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (грант М23РНФ-067), грантом РФФ № 23-45-10004, Программой стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (Приоритет – 2030).

1. Steinert et al. *Neuroscientist* 16 435-452 (2010) <https://doi.org/10.1177/1073858410366481>
2. Lakomkin et al. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 16(4) 413-418 (2007)
3. Андрианов и др. *Онтогенез*. Т. 39, №6. - С. 437-442 (2008)
4. Remizova et al. *Eur. J. Pharmacol.* 662(1-3) 40-46 (2011)
5. Pacher et al. *Physiol. Rev.*, 2007, v. 87, p. 315-427.
6. Calabrese et al. *Antioxidants and Redox Signaling* 11, 2717-2739 (2009).
7. Terpolilli et al. *J Cereb Blood Flow Metab* 32(7): 1332–1346 (2012)
8. Vanin et al. *Methods in Enzymology*. Vol. 359, pp. 27-42 (2003)
9. Гайнутдинов и др. *Биофизика*. Т. 58, N 2. С. 276-280 (2013)

Биофизические исследования функционирования нервной клетки

Максимов Г.В.^{1*}

¹*Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова ;*

gmaksimov@mail.ru

С помощью современных оптических методов (Раман спектроскопия, лазерная интерференционная микроскопия, конфокальная микроскопия) изучены молекулярные и клеточные изменения при функционировании нервной клетки. Установлено, что при проведении серии потенциалов действия или активации рецепторов изменяется не только мембранный потенциал, но и вязкость плазматической мембраны, а также состояние митохондрий и цитоскелета клетки.

Биофизические основы эпилептической активности: гипотеза контаминации мембран

Эрнандес-Касерес Х.^{1*}, Джимаков С.С.^{2,3}, Дроботенко М.И.³, Нечипуренко Ю.Д.^{4,5}

¹Кубинский центр нейронаук;

²Южный научный центр РАН;

³Кубанский государственный университет;

⁴Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН;

⁵Севастопольский государственный университет;

jose.caceres@cneuro.edu.cu

Общепринятым электрофизиологическим признаком эпилептической активности является пароксизмальный деполяризационный сдвиг (ПДС). Более пятнадцати лет назад была высказана гипотеза о том, что эпилепсия связана с контаминацией мембран. Эта гипотеза включает следующие предположения: 1) ПДС возникает при переходе пейсмекерных потенциалов в гипертрофированные длительные высокоамплитудные деполяризации; 2) нарушение упорядоченности липидного бислоя (например, в результате включения амфифильных веществ) вызывает трансформацию пейсмекерных потенциалов в ПДС [1].

Многие широко известные факты об эпилепсии могут найти объяснение в рамках этой гипотезы, например, тот факт, что рефрактерную эпилепсию можно лечить с помощью кетогенной диеты [2] и стимуляции блуждающего нерва [3], противоэпилептическое действие вальпроата, холестерина и других стабилизаторов текучести мембран.

Для уточнения пунктов 1 и 2 необходимы дополнительные исследования. Ранее было показано, что, изменяя параметры модели пейсмекерных потенциалов, можно проследить переход от пейсмекерного потенциала к пароксизмальной деполяризации [2]. Но открытым остается вопрос определения каналов, участвующих в генерации пейсмекерного потенциала. Для моделирования описанных процессов как экспериментально, так и математически [4] необходима новая биофизическая модель. Мы развиваем подходы к такой модели в работе [5].

Косвенные данные подтверждают идею о том, что загрязнение бислоя амфифильными примесями может усиливать эпилептогенность, но отсутствует четкая демонстрация того, что загрязнение способствует превращению пейсмекерного потенциала в пароксизмальную деполяризацию [6].

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания ЮНЦ РАН № 122020100351-9.

1. Altrup U., Marc Häder, s Hernández Cáceres J. L., Malcharek S., Meyer M., Galla H.-J. Epileptogenic drugs in a model nervous system: Electrophysiological effects and incorporation into a phospholipid layer. *Brain Research* 1122(2006) 65 – 77

2. Нечипуренко Ю.Д., Гарсия Рейес Р. С. и Эрнандес Касерес Х. Л. Гипотеза контаминации мембран нейронов, эпилепсия и кетогенная диета. *Биофизика*, т.66, № 6, с. 1123-1132 (2021); DOI: 10.31857/S0006302921060077

3. Abdullahi, A., Etoom, M., Badaru, U. M., Elibol, N., Abuelsamen, A. A., Alawneh, A., ... & Truijen, S. (2022). Vagus nerve stimulation for the treatment of epilepsy: things to note on the protocols, the effects and the mechanisms of action. *International Journal of Neuroscience*, 1-10.

4. Kononenko N. I. Mechanisms of membrane potential oscillation in bursting neurons on the snail, *Helix pomatia* // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. – 1993. – Т. 106. – №. 1. – С. 135-147.

5. Эрнандес Касерес Х.Л., Джимаков С.С., Семенов Д.А., Дроботенко М.И., Нечипуренко Ю.Д. Модели, описывающие генерацию и проведение нервного импульса. *Биофизика*. 2022. Т. 67. № 4. С. 728-740.

6. Murugan M., Boison D (2020). Ketogenic diet, neuroprotection, and anti-epileptogenesis. *Epilepsy Research*. Pub Date: 2020-08-19 , DOI:10.1016/j.epilepsyres.2020.106444

Биохимическая *in vitro* диагностика и направленная доставка лекарственных препаратов *in vivo* на основе магнитных наночастиц

Никитин П.И.^{1*}, Брагина В.А.¹, Орлов А.В.¹, Скирда А.М.¹, Горшков Б.Г.¹, Никитин М.П.²

¹*Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН;*

²*Московский физико-технический институт (государственный университет);*
gpiru@mail.ru

Магнитные наночастицы (МЧ) из оксидов железа, обладая рядом уникальных свойств, перспективны для многих биофизических и медицинских применений. Железо в разных формах присутствует в организме человека в количестве около 5 г, обеспечивая жизненно важные функции. Нанооксиды железа обладают низкой токсичностью и допущены во многих странах для внутривенных инъекций человеку.

Для метрологического обеспечения биофизических разработок авторами впервые был предложен принцип высокочувствительной количественной регистрации МЧ в непрозрачных 3D объектах по нелинейному перемагничиванию. На основе этого принципа и синтезированных МЧ разработаны новые способы:

1) неинвазивной «жидкостной биопсии», экспрессной биохимической диагностики и контроля безопасности пищевых продуктов;

2) эффективной доставки лекарственных препаратов к раковым опухолям и метастазам в организме лабораторных животных;

3) комплексного исследования долговременной биодegradации МЧ и их токсичности *in vivo*, а также выявления продуктов распада наночастиц в живом организме.

С помощью применения МЧ в качестве меток иммуно- и ДНК-реакций разработан ряд экспрессных методов измерений в биологических жидкостях человека концентраций малых молекул, белковых маркеров заболеваний, а также внеклеточных везикул (ВВ). ВВ, являясь носителями белковых и ДНК фрагментов раковых клеток, перспективны для неинвазивной «жидкостной биопсии» [1]. Предел обнаружения ВВ в клинических образцах пациентов с раком молочной железы составил $3,7 \cdot 10^5$ шт/мкл, что на 1-2 порядка лучше, чем у наиболее чувствительных коммерческих тестов. Достигнут предел обнаружения простат-специфического антигена (ПСА) в сыворотке крови 19 пг/мл при динамическом диапазоне, превышающем 3,5 порядка концентрации. Метод перспективен для выявления как самого рака простаты, так и его рецидивов после радикальной простатэктомии по следовым количествам ПСА [2]. Предел обнаружения сердечного тропонина I составил 0,08 нг/мл при динамическом диапазоне более 3 порядков, что важно для ранней диагностики инфаркта миокарда [3]. Разработан метод для быстрого (20 минут) измерения концентрации малых молекул, в частности охратоксина А, в продуктах питания от 11 пг/мл при динамическом диапазоне 5 порядков, что находится на уровне эталонных, но трудоемких и длительных способов [4].

Применительно к терапевтическим задачам заметим, что большинство наноносителей препаратов становятся малоэффективными *in vivo* из-за быстрого их выведения из кровотока системой мононуклеарных фагоцитов (МФС). Нами разработана прорывная технология в наномедицине, которая позволяет значительно (в 32 раза) увеличить время циркуляции в крови практически любых нанопрепаратов, повышая их терапевтическую эффективность [5]. Установлено, что применение этой технологии, названной «МФС-цитоблокадой», приводит к существенному увеличению доставки химиопрепаратов к пяти видам опухолей различной природы: от меланомы до рака молочной железы, включая два типа опухолей человека, привитых мышам. В частности, показано, что при использовании технологии в 23 раза возрастает эффективность «активной» магнитной доставки химиопрепаратов в раковые опухоли у животных. Это приводит к значительному подавлению опухолей при минимизации побочных эффектов. Впервые продемонстрировано, что нацеливание полимерных и магнитных наночастиц лектинами к профилю гликозилирования раковых клеток с последующей фотодинамической терапией является многообещающей стратегией лечения агрессивных опухолей [6].

Важным аспектом при создании агентов для адресной доставки препаратов является их быстрая биодegradация после выполнения терапевтических функций. В экспериментах с животными *in vivo* впервые проведено всестороннее исследование полного жизненного цикла МЧ, начиная с введения в кровоток и вплоть до биодegradации в живом организме [7,8]. Установлены закономерности долговременной (1 год) биодegradации для 17 типов наночастиц в зависимости от введенной дозы, гидродинамического размера, ζ -потенциала, типа покрытия поверхности и структуры наночастиц. В частности, показано, что покрытие частиц 39-нм слоем полистирола замедляет время дegradации МЧ с 40 дней до 1 года. Установлена динамика снижения контрастирующих свойств МЧ для МРТ и регистрации по нелинейному перемагничиванию. Обнаружено, что биодegradация МЧ приводит к усилению экспрессии генов железо-ассоциированных белков, увеличению количества эритроцитов и уровня гемоглобина в крови животных, а также отсутствию значимой токсичности МЧ. Полученные результаты важны для разработки и внедрения разных типов наночастиц в клиническую практику.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-12-00407.

- [1]. Bragina V.A. et al. Highly Sensitive Nanomagnetic Quantification of Extracellular Vesicles by Immunochromatographic Strips: A Tool for Liquid Biopsy. *Nanomaterials*. 12 (2022) 1579.
- [2]. Orlov A.V. et al. Kinetic Analysis of Prostate-Specific Antigen Interaction with Monoclonal Antibodies for Development of a Magnetic Immunoassay Based on Nontransparent Fiber Structures. *Molecules*. 27 (2022) 8077.
- [3]. Orlov A.V. et al. Multiplex Label-Free Kinetic Characterization of Antibodies for Rapid Sensitive Cardiac Troponin I Detection Based on Functionalized Magnetic Nanotags. *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 4474.
- [4]. Orlov A.V. et al. Express high-sensitive detection of ochratoxin A in food by a lateral flow immunoassay based on magnetic biolabels. *Food Chemistry*. 383 (2022) 132427.
- [5]. Nikitin M.P. et al. Enhancement of the blood-circulation time and performance of nanomedicines via the forced clearance of erythrocytes. *Nature Biomedical Engineering*. 4 (2020) 717.
- [6]. Kovalenko, V.L. et al. Lectin-Modified Magnetic Nano-PLGA for Photodynamic Therapy In Vivo. *Pharmaceutics*. 15 (2023) 92.
- [7]. Zelepukin I.V. et al. Long-Term Fate of Magnetic Particles in Mice: A Comprehensive Study. *ACS Nano*. 15 (2021) 11341.
- [8]. Yaremenko, A.V. et al. Influence of Magnetic Nanoparticle Biotransformation on Contrasting Efficiency and Iron Metabolism. *Journal of Nanobiotechnology*. 20 (2022) 535.

Блокада электростатических взаимодействий между вирусом и клеткой- новое направление защиты от высокозаразных штаммов SARS-CoV-2 и вируса гриппа

Оникиенко С.Б.^{1*}

¹*Санкт-Петербургский Научный Центр РАН;*
sergeionikienko@bk.ru

Высокая контагиозность SARS-Cov-2 связана с наличием вставки из четырех положительно заряженных аминокислот в спайковом белке коронавируса. Слияние коронавирусов с клеткой происходит под влиянием кулоновских электрических сил за счет энергии собственных электрических зарядов вируса. В спайковом белке штамма Омикрон обнаружена дополнительная вставка из трех положительно заряженных аминокислот (аргинин, лизин, гистидин). Высокий положительный электрический заряд белков на шипах коронавирусов штамма Омикрон (в 5 раз больше других штаммов) способствует проникновению вирусов и их размножению в клетках-мишенях. Электростатическое взаимодействие положительно заряженных белков коронавирусов с отрицательно заряженными АПФ-2 рецепторами вызывает слияние вирусов с клетками - мишенями за счет взаимного притяжения противоположных электрических зарядов.

Сверхвысокозаразный вариант «Кракен» штамма Омикрон может инфицировать более 20 чел, его спайковый белок содержит максимальное количество положительно заряженных аминокислот. Электрически заряженный белок на участках шипов варианта «Кракен» штамма Омикрон и противовирусные антитела имеют одинаковый положительный электрический заряд, что способствует «ускользанию» вируса от этих антител и снижает эффективность вакцинации. Высокая контагиозность и ускользание от противовирусного антительного иммунного ответа «электрического вируса» Омикрон обусловлена электростатическими взаимодействиями между положительно заряженными участками на шипах коронавирусов, противовирусными антителами и отрицательно заряженными рецепторами на поверхности клеток--мишеней

Вставки из положительно заряженных аминокислот (аргинин, лизин) выявлены также в молекулах гемагглютиниана сверхзаразных штаммов вируса гриппа- H1N1

Электрически заряженные участки на шипах коронавируса и молекулах гемагглютиниана вируса гриппа – перспективные мишени для разработки противовирусных средств на основе положительно заряженных веществ, которые подавляют взаимодействие между положительно заряженными участками вирусов и отрицательно заряженными рецепторами клеток-мишеней, способствует формированию защитного электростатического барьера на поверхности этих клеток. Для решения этой задачи можно использовать катионные липосомы на основе положительно заряженных аминокислот (например, аргинин и его метаболит оксид азота), тимохинона положительно заряженных микроэлементов в низкой степени окисления, а также использовать акцепторы электронов на основе, ксантогумола, тимохинона, окисленных форм глутатиона, тиосульфата натрия.

Композиция для защиты от COVID-19 содержит положительно электрически заряженные вещества: катионные лецитиновые липосомы с положительно заряженной аминокислотой аргинином, акцепторы электронов на основе ксантогумола (из масляного экстракта хмеля и окисленных форм сероводорода (тиосульфат натрия). Для усиления целевого противовирусного эффекта в состав композиции включены эфирное масло мирры, экстракт черного тмина, среднецепочечные триглицериды. Выявлена синергия-взаимное усиление защитного эффекта компонентов композиции.

Композиция для защиты от высокозаразного штамма вируса гриппа H1N1 включает положительно заряженные соединения: спермидин, катионный стероид скваламин, лецитиновые липосомы с аргинином. Для усиления целевого противовирусного эффекта использовали масляные экстракты Мирры, хмеля, корня женьшеня (гинзенозиды), янтарную кислоту, каррагенан, среднепочечные триглицериды

Исследовали защитный эффект разработанных композиций на зараженной коронавирусами культуре клеток Vero и зараженной вирусом гриппа H1N1 культуре клеток MDCK. Осуществляли ПЦР-диагностику вирусов в слизистых верхних дыхательных путей, определяли динамику клинических проявлений заболевания.

Положительный эффект от использования композиций включает предотвращение проникновения коронавирусов и вируса гриппа и блокаду их размножения в клетках-мишенях (эндоназальный электростатический барьер), блокаду вирусных протеаз и протеаз организма-хозяина, блокаду рецепторов коронавирусов и гемагглютинаина, активацию противовирусных иммунных реакций за счет синтеза защитных белков-интерферонов, стимуляции Т-клеточного иммунного ответа, снижения уровня провоспалительных цитокинов.

Выявлено снижение содержания коронавируса в культуральной среде более чем в 1000 раз через 2 сут после инкубации с разработанной композицией лекарственных веществ. Спрей подавлял размножение коронавирусов в слизистых носа и ротоглотки на 92-94% через 2 сут после начала лечения, вызывал полное их исчезновение на 3-5 день лечения (по данным ПЦР-диагностики). Выявлено ускорение исчезновения симптомов заболевания-признаков ринита, фарингита, ларинготрахеита. Клинические проявления выздоровления наступали на 3-6 сутки в 85% случаев у основной и у 13 % пациентов COVID-19 в контрольной группе. Сопоставимые результаты получены при использовании композиции для профилактики и лечения гриппозной инфекции H1N1.

Броуновская-но-негауссова диффузия в паренхиме мозга: экспериментальное проявление и математическое моделирование

Постников Е.Б.^{1*}, Лаврова А.И.^{2,3}, Постнов Д.Э.⁴

¹*Курский государственный университет;*

²*Санкт-Петербургский государственный университет;*

³*Санкт-Петербургский Научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии;*

⁴*Саратовский национальный исследовательский государственный университет;*

postnicov@gmail.com

Броуновская-но-негауссова (БнГ) диффузия, открытая около десяти лет назад [1] в некоторых сложных биофизических средах, характеризуется нетривиальным сочетанием особенностей: при исследовании среднеквадратичного смещения маркеров, осуществляющих случайные блуждания, обнаруживается обычная линейная зависимость от времени, но пространственный профиль их функции плотности вероятности не соответствует нормальному распределению.

Среди различных физических причин такого процесса было показано [2], что БнГ может возникать как следствие затухающего беспорядка при диффузии маркера в случайной среде с локальной корреляцией неоднородностей. Такая структура характерна для внеклеточного пространства паренхимы мозга, где локальные области, равномерно заполненные интерстициальной жидкостью, образуют сложную случайную пористую структуру в больших масштабах. Целенаправленный поиск признаков, характерных для БнГ, подтверждает их существование [3].

Таким образом, в данной работе исследуются данные, полученные с помощью МРТ-картирования концентрации контрастного вещества на основе Gd в мозге крысы *in vivo*. Показано, что регрессия динамической последовательности радиальных сечений пространственно-временного распределения концентрации соответствует лапласовой функции плотности вероятности на промежуточных временных масштабах. Затем следует переход к гауссовой на больших временных масштабах (но с сужением локализованного центрального пика в точке инъекции), что согласуется с теорией процесса гомогенизации БнГ.

В дополнение к непосредственной обработке биофизических экспериментальных данных будет представлен и обсужден подход к моделированию, основанный на управляющем уравнении, с особым фокусом на перспективы различения интерпретаций, лежащих в основе стохастических процессов. Также будут обсуждены открывающиеся возможности использования таких моделей для количественной оценки структуры и топологии внеклеточного пространства мозга по результатам макроскопических динамических картин транспорта веществ в паренхиме.

[1] Wang, B.; Kuo, J.; Bae, S.C.; Granick, S. When Brownian diffusion is not Gaussian. *Nat. Mater.* 2012, 11, 481–485.

[2] Postnikov, E.B.; Chechkin, A.; Sokolov, I.M. Brownian yet non-Gaussian diffusion in heterogeneous media: From superstatistics to homogenization. *New J. Phys.* 2020, 22, 063046

[3] Postnikov, E.B.; Lavrova, A.I.; Postnov, D.E. Transport in the Brain Extracellular Space: Diffusion, but Which Kind? *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 12401

Валидация математических моделей, используемых для оценки тромбогенности сосудистого русла

Салихова Т.^{1,2*}, Пономарев И.А.¹, Пушин Д.М.¹, Ивлев Д.А.¹, Узлова С.Г.¹, Гурия Г.Т.^{1,2}

¹"НМИЦ гематологии" Минздрава России, Москва, Россия;

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия;

salikhova.ty@gmail.com

Анализ быстротекущих биологических процессов с помощью физических методов является одной из задач современной биофизики. К числу таких процессов относится смена агрегатного состояния крови. Механизмы, отвечающие за смену агрегатного состояния крови, лежат в основе целого ряда серьезных патологий, таких как инсульт, инфаркт, тромбоэмболия легочной артерии.

Оценка потенциальной тромбогенности конкретного участка сосуда остается актуальной проблемой. В настоящее время существуют математические подходы, позволяющие изучать особенности течения крови в сосудах различной геометрии: в стенозированных сосудах, аневризмах, артериовенозных фистулах для гемодиализа [Carroll et al. 2020, Vassilevsky et al. 2020]. Такого рода подходы используются при анализе свертывания крови у «нормального» человека. Однако, полученные с их помощью результаты не учитывают персонализированных черт анатомии и физиологии пациентов. Благодаря развитию современных физических методов медицинской визуализации (МРТ, КТ, доплерография и ангиография) удается получать детальную информацию о геометрическом строении участков сосудистого русла и характере кровотока в них. Вопрос в том, в какой мере указанные персонализированные данные могут быть использованы для оценок внутрисосудистых тромботических рисков, обусловленных потерей устойчивости жидкого состояния крови [Erdemir et al. 2020].

Одна из перспективных методик оценки рисков активации тромбообразования в интенсивных потоках крови опубликована в работе [Pushin et al. 2021]. Целью настоящей работы была разработка экспериментальной *in vitro* методики валидации результатов численного моделирования активации тромбоцитов в персонализированных сосудистых конфигурациях.

В рамках исследования была разработана методика, позволяющая создавать силиконовые 3D-отливки, с высокой точностью воспроизводящие геометрические особенности сосудов пациентов. Для этого использовались данные УЗИ и МРТ-диагностики. Разработанная методика была применена для исследования активации тромбоцитов в артериовенозных фистулах для гемодиализа. Для данного типа сосудистых конфигураций характерны интенсивные потоки крови и высокая степень тромбогенной опасности.

В рамках разработанного подхода посредством 3D-печати создавались мастер-модели, воспроизводящие геометрию реальных сосудов. Затем на базе мастер-моделей из биологически нейтрального силикона изготавливались герметичные отливки. Они включались в экспериментальный контур [Ivlev et al. 2019], через который осуществлялось прокачивание крови в представляющем интерес диапазоне скоростей. Процессы смены агрегатного состояния крови детектировались оптически, посредством цифровой видеосъемки, а также акустически, с помощью ультразвуковых доплеровских методов. Кроме того, состояние системы свертывания крови в ряде случаев анализировалось с помощью стандартных методов агрегометрии и тромбоэластографии.

Проведенные испытания показали, что изготовленные герметичные силиконовые отливки воспроизводят геометрию сосудов пациентов с точностью до микрометров. Сам по себе материал отливки не вызывал контактную активацию свертывания крови. При этом агрегометрия и тромбоэластография показали, что степень общей тромбогенности отливки существенно зависит от характера течения в ней. При перфузии отливки плазмой крови (или цельной кровью) в ряде режимов удалось зафиксировать появление в потоке фибриновых и тромбоцитарных микросгустков. Натурные эксперименты показали, что основные положения, заложенные в математических модели для оценки тромбогенности сосудистых участков, находят свое подтверждение.

Авторы считают, что разработанная экспериментальная методика может быть использована для валидации математических моделей, применяемых для оценки степени тромбогенности сосудистых конфигураций (стенды, фистулы и т. д.).

Литература

Carroll, J. E., Colley, E. S., Thomas, S. D., Varcoe, R. L., Simmons, A., & Barber, T. J. (2020). Tracking geometric and hemodynamic alterations of an arteriovenous fistula through patient-specific modelling. *Computer methods and programs in biomedicine*, 186, 105203.

Vassilevsky, Y., Olshanskii, M., Simakov, S., Kolobov, A., & Danilov, A. (2020). Personalized Computational Hemodynamics: Models, Methods, and Applications for Vascular Surgery and Antitumor Therapy. Academic Press.

Erdemir, A., et al. (2020). Credible practice of modeling and simulation in healthcare: ten rules from a multidisciplinary perspective. Journal of translational medicine, 18(1), 1-18.

Pushin, D. M., Salikhova, T. Y., Biryukova, L. S., & Guria, G. T. (2021). Loss of Stability of the Blood Liquid State and Assessment of Shear-Induced Thrombosis Risk. Radiophysics and Quantum Electronics, 63(9), 804-825.

Ivlev, D. A., Shirinli, S. N., Guria, K. G., Uzlova, S. G., & Guria, G. T. (2019). Control of fibrinolytic drug injection via real-time ultrasonic monitoring of blood coagulation. PLoS ONE, 14(2), e0211646.

Взаимосвязь между конформацией гема цитохрома С, потенциалом внутренней мембраны митохондрий и активностью дыхательной цепи в норме и при патологии

Браже Н.А.^{1*}, Никельшпарг Э.И.¹, Байжуманов А.А.¹, Гривенникова В.Г.¹, Семенова А.А.², Новиков С.М.³, Волков В.С.³, Арсенин А.В.³, Якубовский Д.И.³, Бочкова Ж.В.¹, Сосновцева О.⁴, Максимов Г.В.¹, Рубин А.Б.¹

¹МГУ, биологический факультет;

²МГУ, ФНМ;

³МФТИ;

⁴Университет Копенгагена;

nadiya.brazhe@gmail.com

Редокс-состояние клеток тесно связано с активностью дыхательной цепи (электронтранспортной цепи, ЭТЦ) митохондрий. Регуляция работы дыхательной цепи митохондрий важна для обеспечения клеток АТФ, а также для оптимизации количества супероксид-анион радикала, образующегося в ЭТЦ. Генерация супероксид-анион радикала с последующим образованием других активных форм кислорода может использоваться в сигнальных процессах или приводить к развитию окислительного стресса. Цитохром С – важный компонент ЭТЦ, осуществляющий перенос электрона между комплексами III и IV в межмембранном пространстве митохондрий. При определенных условиях цитохром С может выходить из митохондрий и инициировать апоптоз. Несмотря на многочисленные исследования митохондрий остается неизвестным, существуют ли механизмы регуляции активности цитохрома С, влияющие на его конформацию и электрон-транспортные свойства.

Мы разработали новый методический подход, основанный на спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР, surface-enhanced Raman spectroscopy SERS) с использованием серебряных плазмонных наноструктур, позволяющий исследовать конформацию гема цитохрома С в интактных функционирующих митохондриях. Мы установили, что спектры ГКР, регистрируемые от изолированных митохондрий кардиомиоцитов, представляют собой набор пиков, характерных для колебаний атомов в пиррольных кольцах и метиновых мостиков гема окисленного цитохрома С и зависящих от конформации гема. Мы показали, что при работе ЭТЦ гем цитохрома С обратимо изменяет конформацию между плоской и искаженной, при этом деполяризация внутренней митохондриальной мембраны и уменьшение концентрации протонов в межмембранном пространстве увеличивают вероятность реализации плоской конформации гема, а гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны и увеличение концентрации протонов уменьшают вероятность плоской конформации. Известно, что для переноса электрона между цитохромом С1 и цитохромом С необходима правильная ориентация гемов друг относительно друга, при этом в случае цитохрома С оптимальной является плоская конформация гема. Мы предполагаем, что деполяризация внутренней мембраны митохондрий, происходящая при активном синтезе АТФ в АТФ-синтазе при увеличении клеточной активности, приводит к переходу гема цитохрома С в плоскую конформацию и ускорению переноса электрона между комплексом III и цитохромом С, увеличивая активность всей ЭТЦ и способствуя синтезу АТФ. Мы установили, что при гипертонии в изолированных митохондриях кардиомиоцитов потенциал на внутренней митохондриальной мембране не влияет на конформацию гема цитохрома С, что может приводить к ухудшению регуляции активности электронного транспорта. Мы полагаем, что предложенный подход к изучению цитохрома С в митохондриях может быть перспективным методом исследования механизмов регуляции свойств цитохрома С в интактных митохондриях.

Вклад NOS в увеличение продукции NO в сердце при ограничении двигательной активности

Зарипова Р.И.^{1*}, Яфарова Г.Г.¹, Андрианов В.В.^{1,2}, Гайнутдинов Х.Л.^{1,2}, Сунгатуллина М.И.¹,
Зиятдинова Н.И.¹, Зефилов Т.Л.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

²Казанский физико-технический институт – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ
РАН;
ratno1992@mail.ru

Значительная роль оксида азота (NO) во многих процессах, в том числе и в деятельности сердца, а также недостаточность сведений о функциях NO при изменении двигательной активности определяют значимость исследований в данном направлении. В течение жизни нередко под влиянием каких-либо требований внешней среды уровень двигательной активности изменяется в сторону его понижения. Если человек изменяет образ жизни так, что его двигательная активность по необходимости становится низкой, то его организм должен приспосабливаться к новому состоянию. В этих случаях развивается специфическая адаптация, сводящаяся к структурным и обменным нарушениям функции многих органов и систем организма. Дефицит движений сопровождается развитием в организме явлений, неблагоприятных для здоровья (детренированность сердечно-сосудистой системы, атрофия скелетной мускулатуры и атеросклероз, и остеопении и др.).

Одним из наиболее эффективных и прямых методов обнаружения и количественного определения NO в биологических образцах является метод ЭПР спектроскопии с использованием спиновой ловушки. Метод спинового захвата основан на реакции радикала NO со спиновой ловушкой. Был применен комплекс Fe²⁺ с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) для захвата NO и формирования устойчивого тройного комплекса (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO. Данный комплекс является парамагнитным (SFe=1/2, и IN=3/2) и может быть зарегистрирован методом ЭПР. Комплексы характеризуются легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g-фактора g=2.035 и триплетной сверхтонкой структурой. Количество NO оценивалось по интенсивности характерного сигнала ЭПР, принадлежащего комплексу (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO. Сигналы сравнивали по величине интегральной интенсивности, так как интегральная интенсивность сигнала ЭПР прямо пропорциональна концентрации парамагнитных комплексов. Через 30 минут после введения препаратов наркотизированную уретаном крысу фиксировали на операционном столе, вскрывали, извлеченные органы быстро просушивали и замораживали в жидком азоте в капиллярах для измерений. Для исследования забирали ткани сердца животных. Регистрация спектров ЭПР приготовленных образцов проводилась на спектрометре ЭПР X-диапазона ER-200E-SRC фирмы "Bruker" EMX/plus с температурной приставкой ER 4112HV при 77 К. Во всех экспериментах сохранялись постоянными следующие параметры: СВЧ мощность-30 мВт, модуляция-5 Гс, усиление- 4·10⁴, постоянная времени-100 мсек., время записи спектра-50 секунд и число накоплений – 8. При накоплениях и регистрации спектров использовался компьютер спектрометра "Aspect 3000" фирмы "Bruker". Непосредственно перед измерением готовый образец, усеченный по форме кюветы для измерений, взвешивается. Масса образцов должна составлять около 100 мг. Амплитуда спектров ЭПР всегда нормируется на вес образца и на амплитуду сигнала ЭПР эталонного образца. Применение L-NAME после 1 месяца проведенного в условиях дефицита движений, приводила к снижению уровня NO до значений, зарегистрированных у контрольной группы (естественная двигательная активность). Следовательно, повышение количества NO в сердце крыс при дефиците движений может быть обусловлено вкладом NOS.

Влияние доноров NO, субстратов и ингибиторов его синтеза на ноцицептивную активность тройничного нерва

Ананьев А.С.^{1*}, Буглинина А.Д.¹, Свитко С.О.¹, Королёва К.С.¹, Ситдикова Г.Ф.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

anton990124@mail.ru

Мигрень – одно из самых распространенных заболеваний, ведущих к временной нетрудоспособности и значительному снижению качества жизни пациентов. Главной жалобой при этом является головная боль. Для разработки эффективного лечения данной проблемы необходимо исследование возникновения причины боли. За ноцицептивную чувствительность в миненгеальных оболочках отвечает тройничный нерв.

В экспериментальных моделях мигрени используются различные вещества. В том числе, распространено использование нитроглицерина как донора оксида азота (NO). Известно, что введение нитроглицерина приводит к мигреноподобным головным болям. Однако исследования с данным веществом фокусируются на сосудистых реакциях, а нейрональные механизмы изучены недостаточно. В связи с этим целью данной работы было исследование влияния NO на ноцицептивную активность тригемино-вазкулярной системы.

Для регистрации ноцицептивной активности тройничного нерва использовался препарат твердой мозговой оболочки, представляющий собой изолированный череп крысы, в виде половины черепной коробки с извлеченным головным мозгом. Нетронутая твердая мозговая оболочка (*dura mater*), содержит в себе ветвь тройничного нерва (*nervus spinosus*), которая иннервирует среднюю менингеальную артерию. Под визуальным контролем выделялся *nervus spinosus* и помещался в регистрирующий электрод, закрепленный на манипуляторе. Запись потенциалов действия (ПД) осуществлялась при помощи усилителя DAM 80 (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Вначале регистрировалась базовая электрическая активность тройничного нерва. Затем в область расхождения средней менингеальной артерии апплицировались исследуемые вещества и записывалось их действие на протяжении 20-40 мин, после чего проводилась отмывка.

В ходе проведенной работы были получены следующие данные. Доноры NO, нитропруссид натрия (НПН) ($p = 0.04$; $n=4$) и SNAP ($p = 0.02$) в концентрации 200 μM вызывали двукратное повышение частоты ПД. Инактивированный светом НПН в той же концентрации не изменял активность тройничного нерва ($p = 0.62$; $n=4$). Однако использование нитроглицерина в концентрации 10, 100 и 200 μM в острой аппликации достоверно не влияло на электрическую активность тройничного нерва. Исходя из этого, наиболее эффективным в острых экспериментах является использование НПН или SNAP.

Для анализа роли эндогенного NO в регуляции активности тройничного нерва использовался субстрат NO-синтазы L-аргинин в концентрации 200 μM ($p = 0.04$; $n=4$). Его применение вызывало увеличение частоты ПД более чем в два раза. Блокатор NO-синтазы L-NAME (100 μM) не изменял базовую частоту ПД ($p = 0.72$; $n=4$). L-аргинин на фоне L-NAME не вызывал увеличения частоты ПД ($p = 0.18$; $n=4$). Полученные данные позволяют предположить, что NO образуется эндогенно в области иннервации тройничного нерва и повышает возбудимость его афферентов. На фоне ингибирования эндогенного синтеза NO мы наблюдали снижение интенсивности про-ноцицептивного действия АТФ и капсаицина, а также показали, что на фоне L-NAME снижается чувствительность рецепторов к низким концентрациям серотонина.

Циклические нуклеотиды, такие как цГМФ и цАМФ, участвуют в модуляции ноцицептивного сигнала за счет активации протеинкиназ, которые, в свою очередь, фосфорилируют мембранные каналы и рецепторы. С помощью аналогов цАМФ (8-Br-cAMP) ($p=0.013$, $n=5$) и цГМФ (8-Br-cGMP) ($p=0.01$; $n=5$) было показано увеличение ноцицептивной активности в афферентах тройничного нерва в два раза.

Для выявления роли растворимой гуанилатциклазы в эффектах NO использовался ингибитор ODQ в концентрации 10 μM . Инкубация препарата в ODQ не приводила к изменениям частоты ПД ($p = 0.87$; $n=4$). Последующее добавление НПН не вызывало достоверного изменения частоты ПД ($p = 0.62$; $n=4$). Напротив, использование ингибитора аденилатциклазы, MDL 12330A (5 μM), не предотвращало увеличение частоты после аппликации НПН ($p = 0.02$; $n=5$). Полученные данные свидетельствуют о ведущей роли гуанилатциклазы в эффектах НПН.

Результаты, полученные в ходе проведенной работы, демонстрируют, что оксид азота имеет ноцицептивное действие, так как вызывает активацию чувствительных волокон тройничного нерва. Основным механизмом действия NO связан с активацией растворимой гуанилатциклазы.

Работа поддержана грантом Президента РФ №МК-4584.2022.1.4

Влияние доноров оксида азота и сероводорода на степень дегрануляции тучных клеток в твердой оболочке мозга крысы

Королева К.С.^{1*}, Нурмиева Д.А.¹, Петрова К.А.¹, Ситдикова Г.Ф.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

k.s.koroleva@yandex.ru

Введение. Мигрень – это неврологическое заболевание, характеризующееся сильными головными болями и сложно поддающееся лечению. В патофизиологии мигрени задействована тригеминовазкулярная система, а также тучные клетки, которые, локализуясь в твердой мозговой оболочке вблизи кровеносных сосудов и афферентов тригеминального нерва, формируют нейроиммунный синапс. В данной структуре выделяемые тучными клетками активные вещества могут активировать близлежащие ноцицептивные волокна, а соединения, высвобождаемые из активных волокон, в свою очередь, способны приводить к их дегрануляции.

Для изучения мигрени была разработана модель с использованием нитроглицерина, донора NO, который провоцирует возникновение мигренозной боли. Однако в литературе преимущественно рассматривается сосудистая роль оксида азота в патогенезе мигрени и недостаточно данных о влиянии NO на состояние тучных клеток оболочек головного мозга. В то же время есть данные об участии другого газообразного посредника, такого как сероводород (H₂S), в процессе формирования ноцицептивного сигнала во время приступа мигрени. Известно, что эндогенный сероводород может оказывать про-ноцицептивное действие в афферентах тройничного нерва за счет активации TRP-рецепторов. Одновременно с этим, было показано, что донор сероводорода, гидросульфид натрия (NaHS), снижает активность P2X₃ рецепторов нервных окончаний тройничного нерва и в соме нейрона тройничного ганглия. Тогда как не рассматривается влияние H₂S на состояние тучных клеток оболочки головного мозга крысы.

Цель исследования. Влияние доноров NO и H₂S на степень дегрануляции тучных клеток в твердой оболочке мозга крысы.

Материалы и методы. Для изучения влияния газомедиаторов на состояние тучных клеток, интактные оболочки мозга инкубировали в растворе, содержащем исследуемое вещество. Для исследования дегрануляции тучных клеток мы применяли гистологический метод с окрашиванием твердой оболочки мозга крысы толудиновым синим. Съемку готовых препаратов осуществляли с помощью ПК при двадцатикратном увеличении. Степень дегрануляции тучных клеток оценивали визуально, расчеты вели в процентном отношении от общего количества клеток.

Результаты. Результаты экспериментов показали, что инкубация в доноре H₂S – NaHS – не приводила к изменению морфологии тучных клеток, и количество дегранулированных клеток не превышало контрольные значения (26.4±4.1%; n=4). Нами было показано, что предварительная инкубация в NaHS в течение 10 мин с последующим добавлением в раствор для инкубации АТФ (100 мкМ) на 20 мин, также не вызывала увеличения количества дегранулированных тучных клеток (28.4±2.9%; n=4). Тогда как инкубация оболочек в АТФ вызывала достоверное увеличение числа дегранулированных клеток (49.4±3.02%; n=4; p<0.05) по сравнению с контрольной группой (22.4±1.8%; n=4; p<0.05). Кроме того, было показано, что инкубация с добавлением агониста P2X-рецепторов VzATP приводил к увеличению числа дегранулированных клеток до 43.5±4.2% (n=4, p<0.05;) и этот эффект снижался на фоне предварительной инкубации в присутствии NaHS.

Таким образом, на уровне тучных клеток также может проявляться и модулирующее действие H₂S на про-ноцицептивное действие АТФ в тригеминальном нерве за счет снижения активности P2X₇ рецепторов и предотвращения АТФ-вызванной дегрануляции тучных клеток головного мозга крысы.

Тогда как инкубация препарата в растворе, содержащем донор NO (нитропруссид натрия, НПН 200 мкМ), не приводила к дегрануляции тучных клеток в оболочках головного мозга крысы, что согласуется с предыдущими исследованиями, где в условиях *ex vivo* экзогенные доноры NO не изменяли состояние тучных клеток. По-видимому, дегрануляцию вызывает системное введение донора NO, вследствие выделения про-воспалительных соединений из эндотелиальных клеток сосудов и нервных окончаний.

Выводы. Донор NO (НПН) и H₂S не вызывают дегрануляцию тучных клеток оболочек головного мозга. Однако, донор H₂S, NaHS, предотвращает дегрануляцию тучных клеток при действии АТФ, что может быть следствием снижения активности P2X₇-рецепторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 21-75-00042.

Влияние инфракрасного излучения на состояние энергетического метаболизма при нейроболовом синдроме в эксперименте

Диденко Н.В.^{1*}, Соловьева А.Г.¹, Полякова А.Г.¹, Беляева К.Л.¹, Перетягин П.В.¹

¹ПИМУ Минздрава России, Нижний Новгород, Россия;

Natalika-nv@mail.ru

Актуальность проблемы нейропатической боли и регенерации периферической нервной системы связана с высокой степенью инвалидизации и снижением качества жизни населения[1]. Нейродегенеративные процессы в нервных окончаниях негативно отражаются на регуляции всех обменных процессов организма человека. Использование инфракрасного (ИК) излучения является перспективным для ускорения регенерации нервных тканей, и улучшение метаболизма в целом, поскольку способствует стимуляции ангиогенеза, синтезу факторов роста и насыщению крови кислородом[2].

Цель исследования: оценить влияние инфракрасного излучения на метаболизм эритроцитов крыс с нейроболовым синдромом на 10 сутки после травмы.

Эксперименты проводили на крысах линии Wistar массой 300 гр. в строгом соответствии с этическими нормами и правилами лабораторной практики (GLP). Животные (n=30) были разделены на 3 группы: I группа -

здоровые животные, 2 группа- контроль, 3 группа - опытная. Крысам 2 и 3 групп под наркозом (Золетил+Ксила) моделировали нейропатический болевой синдром. Животным опытной группы ежедневно оказывалось ежедневное воздействие излучением в инфракрасном диапазоне с длиной волны 810 нм: облучалась зона затылочного бугра (время процедуры 10 минут), затем облучалась зона поражения седалищного нерва (время процедуры 10 минут). Для неинвазивного терапевтического воздействия в импульсном режиме оптическим излучением инфракрасного диапазона использовался сертифицированный матричный аппарат «Elmedlife M» (Россия). Кровь животных забирали спустя 10 суток путем декапитации под наркозом с использованием цитрата натрия в соотношении (1:9). Активность альдегиддегидрогеназы (АлДГ, лактатдегидрогеназы в прямой (ЛДГ пр.) и обратной (ЛДГобр.) реакциях, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ГлбфДГ) оценивали в гемолизате отмытых эритроцитов методом спектрофотометрии[3]. Результаты исследований обрабатывали с помощью программы Statistica 6.0. Для сравнения использовались методы непараметрического анализа.

Воздействие инфракрасного излучения в опытной группе животных с нейроболевым синдромом привело к нормализации показателей энергетического метаболизма в эритроцитах по сравнению контролем, так удельная активность ЛДГ обр. снизилась на 18,551% ($p < 0,001$). Удельная активность ЛДГ пр. при этом была снижена лишь на 5,833% ($p = 0,0024$) по сравнению с нормой. Такое смещение энергетического метаболизма в сторону анаболических процессов способствует снижению накопления лактата в тканях организма опытных крыс и снижает состояние ацидоза в целом.

Удельная активность АлДГ в эритроцитах крови крыс опытной группы при воздействии ИК излучения снижалась на 9,849 ($p < 0,001$) по сравнению с нормой и на 23,812% ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. Таким образом, воздействие ИК излучения снижало накопление альдегидов в крови крыс с нейроболевым синдромом. Удельная активность ГлбфДГ при воздействии излучения в ИК спектре была снижена на 3,576% ($p = 0,046$) по сравнению с нормой, и повышена на 31,966% ($p < 0,001$) по сравнению с контролем, что свидетельствовало о ускорении пентозофосфатного пути, и ускорении процессов дыхания в целом.

Таким образом, показано, что под влиянием ИК излучения улучшается метаболический статус эритроцитов крыс с нейроболевым синдромом с преобладанием анаболических процессов. Выявлено, что при воздействии ИК излучения отмечена нормализация уровней всех исследуемых ферментов (ЛДГ пр. и ЛДГ обр., АлДГ, ГлбфДГ), что способствовало нормализации процессов дыхания, а так же снижению интоксикации в крови крыс опытной группы.

Литература:

1. E.S.J. Smith, Advances in understanding nociception and neuropathic pain, J Neurol.. 265 (2), 231-238 (2018)
2. Л.Н. Катюхин, Влияние излучения инфракрасного спектра на реологические показатели эритроцитов in vitro, Международный научно-исследовательский журнал 6 (72), (2018).
3. А.Г. Соловьева, дис., Состояние и особенности регуляции оксидоредуктаз системы биотрансформации при термической травме и в условиях воздействия активными формами кислорода и азота, д-ра биол. наук (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва., 465 с., 2020).

Влияние ксилазин-золетиловой анестезии на радиочувствительность мышей при воздействии излучений с разными значениями линейной потери энергии

Белякова Т.А.^{1*}, Балакин В.Е.¹, Розанова О.М.², Смирнова Е.Н.², Стрельникова Н.С.¹

¹Филиал “Физико-технический центр” Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физического института им. П.Н. Лебедева РАН, Протвино, Россия;

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

belyakovata@lebedev.ru

Введение. В последнее время в связи с использованием ускоренных заряженных частиц для терапии рака, требующей высокоточного контроля позиционирования пациентов, часто возникает необходимость использования анестезии, особенно для детей и пожилых людей. Анестезия оказывает существенное влияние на многие физиологические параметры, которые влияют как на результат лечения, так и на радиочувствительность организма. Наблюдаемые эффекты зависят от состава анестезирующей смеси, концентрации, режима введения, вида и возраста животных, критерия регистрации поражения, вида излучения, диапазона доз при тотальном или локальном облучении. Актуальным является также поиск новых экспериментальных моделей на животных для исследования действия источников заряженных частиц, для которых необходимы удобные и безопасные способы иммобилизации животных, которые бы обеспечивали не только точное позиционирования мишени в

определенных координатах при облучении протонами или ионами углерода, но и позволили бы скорректировать программы планирования облучения с учетом движений, связанных с дыханием.

Цель. Исследование влияния анестезии на радиочувствительность мышей по тесту 30-суточной выживаемости при тотальном облучении мышей пучками протонов и ионов углерода *in vivo* до и в пике Брэгга, а также рентгеновского излучения.

Материалы и методы. Эксперименты проводили в соответствии с международными требованиями на 2-месячных самцах мышей колонии SHK. В работе было использовано 405 мышей. Животные были разделены на две группы для облучения с анестезией и без. Каждую из групп делили на подгруппы ($n=10-15$) для облучения разными видами излучения и дозами. По отдельным экспериментальным точкам проведено 2–3 независимых эксперимента.

Животных облучали тотально в индивидуальных хорошо вентилируемых контейнерах. Мышей анестезировали за 10 мин до облучения комбинацией селективных препаратов ксилазина (Interchemie, Нидерланды) – 0.7 мг/кг и золетила 100 (Virbac, Франция) – 3.4 мг/кг. Глубину наркоза оценивали визуально по отсутствию некоординированных движений у мыши и отрицательной реакции на болевой раздражитель в виде зажатия хвоста пинцетом. Выбранная схема анестезии обеспечивала обездвиживание мышей во время укладки и облучения, а также 100% выход мышей из наркоза без введения дополнительных антагонистических препаратов и отсутствие гибели животных.

Облучение животных протонами проводили на комплексе протонной терапии ФТЦ ФИАН (Протвино) тонким сканирующим пучком в дозах 6.5–8.5 Гр до пика Брэгга (ЛПЭ = 0.7 ± 0.04 кэВ/мкм) и в пике Брэгга (ЛПЭ = 2.5 ± 0.7 кэВ/мкм). Облучение мышей моноэнергетическим пучком ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в дозе 6.5 Гр до пика Брэгга (ЛПЭ = 15 кэВ/мкм) и в пике Брэгга (ЛПЭ = 39 кэВ/мкм) осуществлялось на установке “Радиобиологический стенд на углеродном пучке У-70” НИЦ “Курчатовский институт” – ИФВЭ (Протвино). В качестве положительного контроля мышей облучали рентгеновским излучением (РИ) в диапазоне доз 6.0–8.5 Гр на установке РУТ (ЛПЭ = 2 кэВ/мкм) в Центре коллективного пользования “Источники излучения” (ИБК, Пущино).

Результаты и обсуждение. Облучение мышей РИ в присутствии анестезии приводило к повышению 30-ти суточной выживаемости ($p \leq 0.01$) при всех дозах. Средняя продолжительность жизни (СПЖ) погибших мышей не зависела от наличия анестезии в исследуемом диапазоне доз.

Анестезия после облучения протонами в пике Брэгга в дозах 6.5 и 7.5 Гр, а также до пика Брэгга при всех дозах не влияла на динамику гибели мышей, характер течения лучевой болезни и СПЖ погибших животных, но при облучении в дозе 8.5 Гр в пике Брэгга наблюдалось значительное повышение выживаемости: к 30 сут выжило 43% животных по сравнению с не анестезированными мышами, где этот показатель был всего 7%. Для РИ и протонов был рассчитан фактор изменения дозы (ФИД) при действии анестезии. Для РИ ФИД=1.13, что свидетельствует о слабом защитном эффекте анестезии в исследованном диапазоне доз. Для протонов в пике Брэгга ФИД=0.94, а до пика ФИД=0.95, то есть не выявлено влияния анестезии на радиочувствительность мышей.

Влияние анестезии на 30-ти суточную выживаемость мышей при облучении ионами углерода в дозе 6.5 Гр оказалось значимым, как в положении до пика, так и в пике Брэгга. После облучения мышей без анестезии в пике Брэгга к 7 сут наблюдалась 100% гибель, а при использовании анестезии 30% животных дожило до 30 сут, основная гибель наблюдалась в течении 10 сут. При облучении мышей ионами углерода до пика Брэгга 30-ти суточная выживаемость в экспериментальных группах резко различалась: без анестезии составляла 30%, а с анестезией – 76%. СПЖ погибших животных не зависела от использования анестезии.

Таким образом, при облучении мышей РИ влияние ксилазин-золетиловой анестезии на радиочувствительность мышей была не значительна и не зависела от дозы. Наличие анестезии при облучении протонами как в пике Брэгга, так и до пика в дозах 6.5 Гр и 7.5 Гр не влияло на радиочувствительность животных, но при облучении в пике Брэгга дозой 8.5 Гр выживаемость возрастала в 1.7 раза. Этот эффект еще значительнее был выражен для ионов углерода, которые обладают более высокой ЛПЭ по сравнению с РИ и протонами, и он возрастал в 3.3 раза при облучении мышей в пике Брэгга, где была максимальная ЛПЭ, а при облучении до пика влияние анестезии уменьшалось до 1.2. Полученные результаты показывают, что для объяснения наблюдаемых эффектов при использовании данной анестезии, обладающей гипоксическим действием, недостаточно классических представлений, согласно которым плотноионизирующее излучение в отличие от рентгеновского имеет слабую зависимость от кислородного эффекта. Представленные данные имеют практическое значение при внедрении новых методов радиотерапии в ветеринарии, разработке адекватных моделей для биомедицины, доклинических испытаний новых источников излучения, а также исследования механизмов сочетанного действия фармакологических веществ и радиации.

Влияние лактоферрина и витамина D3 на маркеры галогенирующего стресса и нетоза в крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом 2 типа при индуцированной активации нейтрофилов ex vivo

Иванов В.А.¹, Галкина Н.В.¹, Максимов Д.И.¹, Гусев С.А.¹, Костевич В.А.^{1,2}, Горбунов Н.П.^{1,2}, Соколов А.В.^{1,2}, Островский Е.М.¹, Панасенко О.М.^{1,3*}

¹*Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия;*

²*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;*

³*Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия;*
o-panas@mail.ru

Наиболее значимым из всех метаболических заболеваний является сахарный диабет второго типа (СД2). Отсутствие или неадекватная сахароснижающая терапия в сочетании с нарушением режима питания и другими факторами ведёт к развитию гипергликемии, при которой уровень глюкозы в крови может достигать 10-12 мМ. СД2 и сопутствующая ему гипергликемия вызывают развитие целого ряда осложнений, снижающих качество жизни, например, диабетической ретинопатии, полинейропатии или диабетической стопы. Клеточная составляющая иммунного ответа в наибольшей степени обусловлена нейтрофилами, обеспечивающими врождённый иммунитет, реализующий множество защитных и сигнальных функций. Нейтрофилы мигрируют в очаг воспаления, где активируются, высвобождая путем дегрануляции или нетоза содержимое цитоплазматических гранул, в результате чего, во внеклеточную среду попадают различные биологически активные молекулы, в частности миелопероксидаза (МПО). МПО катализирует образование активных форм галогенов (АФГ), выполняющих бактерицидную функцию, но их чрезмерная продукция приводит к повреждению молекул, клеток и тканей организма, что вызывает формирование галогенирующего стресса [1]. Последний становится причиной развития сердечно-сосудистых, метаболических, нейродегенеративных и других заболеваний. В этой связи актуальным является поиск средств и подходов, позволяющих регулировать уровень МПО в крови и препятствовать развитию галогенирующего стресса. На эту роль могут претендовать лактоферрин (ЛФ) и витамин D3. ЛФ широко распространён во всех секреторных жидкостях организма, а также, локализован в специфических гранулах нейтрофилов, проявляет иммуномодулирующую, антимикробную, антиокислительную и другие биологически важные функции [2]. Витамин D3 и его метаболиты обладают противовоспалительными, антиокислительными свойствами, препятствуют нетозу [3].

Цель работы – изучение влияния ЛФ и витамина D3 на содержание в крови здоровых доноров и больных СД2 МПО, маркеров галогенирующего стресса и нетоза при индуцированной активации нейтрофилов в экспериментах ex vivo.

Материалы и методы. В исследовании участвовало 15 человек различного пола, в возрасте от 45 до 86 лет, среди которых было 8 здоровых доноров и 7 пациентов, страдающих СД2 со стойкой гипергликемией (уровень глюкозы в крови превышал 7 мМ, уровень гликированного гемоглобина 7-9%). Забор венозной крови производили в вакуумные пробирки с ЭДТА. ЛФ и витамин D3 добавляли в кровь соответственно до концентрации 1 мг/мл и 5 нг/мл и инкубировали 2 часа при 37°C, после чего нейтрофилы активировали добавлением форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА, 0,16 мкМ), инкубировали еще 0,5 часа. Далее в плазме методом ИФА определяли содержание МПО, маркеров галогенирующего стресса: хлорированного альбумина (ЧСА-С1), церулоплазмينا (ЦП-С1), липопротеинов низкой плотности (ЛНП-С1), а также комплекса ДНК-МПО – маркера нетоза [4].

Результаты. ИФА исследование показало, что добавление в кровь активатора нейтрофилов – ФМА приводило к значительному возрастанию уровня МПО, маркеров галогенирующего стресса (ЧСА-С1, ЦП-С1, ЛНП-С1) и нетоза (ДНК-МПО), как у доноров, так и у больных СД2. Преинкубация крови с ЛФ достоверно снижала все измеряемые параметры на 40-90% по сравнению с контролем. Инкубация крови с витамином D3 достоверно снизила уровень ДНК-МПО, наблюдалась тенденция к снижению МПО. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЛФ и витамин D3 способны снижать секрецию нейтрофилами МПО и препятствовать нетозу. В добавок к этому, ЛФ, воздействуя на активированные нейтрофилы, тормозил развитие галогенирующего стресса.

Наши результаты позволяют предположить, что ЛФ способен транслоцироваться в мембрану, затрудняя выход из клетки нейтрофильных внеклеточных ловушек, в состав которых входит МПО. Это должно способствовать уменьшению концентрации фермента в плазме и, как следствие, снижению маркеров галогенирующего стресса. Падение уровня ЛНП-С1 в крови можно объяснить способностью ЛФ конкурировать с МПО за связывание с поверхностью ЛНП. Вытесняя функционирующую МПО из комплекса ЛНП-МПО, ЛФ

препятствует модификации ЛНП под действием АФГ, образующихся при МПО-катализе [5]. Витамин D3 способен снижать уровень маркеров нетоза, что согласуется с полученными ранее данными [3].

Полученные результаты расширяют возможность использования ЛФ и витамина D3 в качестве основы для создания новых средств и подходов, направленных на регуляцию и коррекцию функции нейтрофилов и МПО с целью предотвращения галогенирующего стресса, что должно иметь положительный эффект при заживлении ран и течении хронических воспалительных заболеваний.

Работа поддержана грантом РФФИ (20-15-00390).

Литература

1. Panasenko O.M., Torkhovskaya T.I., Gorudko I.V., Sokolov A.V. The role of halogenative stress in atherogenic modification of low-density lipoproteins. *Biochemistry (Moscow)*. 2020. V. 85. Suppl. 1. P. S34-S55.
2. Терехова М.С., Горудко И.В., Григорьева Д.В., Семак И.В., Соколов А.В., Панасенко О.М., Черенкевич С.Н. Железосвязывающая способность лактоферрина при воспалении. *Докл. БГУИР*. 2018. №7(117). С. 80-84.
3. Basyreva L.Yu., Vakhrusheva T.V., Letkeman Z.V., Maximov D.I., Fedorova E.A., Panasenko O.M., Ostrovsky E.M., Gusev S.A. Effect of vitamin D3 in combination with omega-3 polyunsaturated fatty acids on NETosis in type 2 diabetes mellitus patients. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021. Article ID 8089696.
4. Соколов А.В., Костевич В.А., Горбунов Н.П., Григорьева Д.В., Горудко И.В., Васильев В.Б., Панасенко О.М. Связь между активной миелопероксидазой и хлорированным церулоплазмином в плазме крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. *Медицинская иммунология*. 2018. Т. 20. С. 699-710.
5. Vasilyev V.B., Sokolov A.V., Kostevich V.A., Elizarova A.Y., Gorbunov N.P., Panasenko O.M. Binding of lactoferrin to the surface of low-density lipoproteins modified by myeloperoxidase prevents intracellular cholesterol accumulation by human blood monocytes. *Biochem. Cell. Biol.* 2021. V. 99. P. 109-116.

Влияние локального нагрева на колебательные процессы в сердечно-сосудистой системе при сахарном диабете 2 типа

Тихонова И.В.¹, Гриневич А.А.¹, Гусева И.Е.², Танканаг А.В.^{1*}

¹*Институт биофизики клетки РАН;*

²*Больница Пуцинского научного центра Российской академии наук;*

tav@icb.psn.ru

В рамках концепции сетевой физиологии организм рассматривается как интегрированная сеть органов и систем, связанных в различных пространственно-временных масштабах для координации своих функций. Согласованное взаимодействие регуляторных механизмов обеспечивает нормальное функционирование как отдельных органов и систем, так и всего организма. Анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР) является одним из широко используемых неинвазивных методов оценки вклада симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы в регуляцию сердечной деятельности. Функционирование крупных центральных и мелких периферических сосудов регулируется разными физиологическими факторами, определяющими периферическую гемодинамику. Существуют различные неинвазивные методы мониторинга периферического кровотока, среди которых наиболее доступными и востребованными являются лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ) и фотоплетизмография (ФПГ). Использование этих методов в сочетании с локальной тепловой пробой является одним из распространенных методов исследования функционального состояния микрососудистого русла и выявления сопутствующих осложнений при различных патологиях, в том числе и при сахарном диабете 2 типа (СД2Т). Известно, что при СД2Т нарушается терморегуляция, что может приводить к снижению вазодилатации в коже конечностей вследствие развития нейрососудистой дисфункции. Анализ изменений в механизмах регуляции ВСР и колебаний кожной гемодинамики в ответ на локальный нагрев у пациентов с СД2Т может служить индикатором ранних микрососудистых нарушений при неинвазивной диагностике. Целью исследования было изучение изменений спектрального состава и фазовых взаимоотношений между ВСР, динамикой кровенаполнения мягких тканей и колебаниями кожной перфузии верхних и нижних конечностей у здоровых добровольцев и больных СД2Т в ответ на локальный нагрев.

В исследовании участвовали 22 пациента с СД2Т (5 мужчин и 17 женщин) и 22 условно здоровых добровольца (8 мужчин и 14 женщин). Измерения проводили в тихом помещении при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$ после 15-минутного периода адаптации, испытуемые находились в положении лежа на спине. Для каждого испытуемого одновременно регистрировали пять 35-минутных записей – электрокардиограмму (ЭКГ), динамику кровенаполнения подушечки указательного пальца правой руки (ФПГрк) и подушечки второго пальца правой ноги (ФПГнг), а также динамику кожной перфузии с наружной поверхности правого предплечья вблизи лучезапястного сустава (ЛДФрк) и наружной поверхности правой стопы между головками 1й и 2й плюсневых костей (ЛДФнг). Тепловую пробу осуществляли путем локального нагрева обоих участков кожи в области

расположения ЛДФ зондов от 32 до 38 0С. Для каждого участника анализировали два 15- минутных участка из общей записи: первые 15 минут без нагрева (покой) и последние 15 минут при температуре 38 0С (нагрев). Анализировали амплитудно-частотные спектры с использованием адаптивного вейвлет-преобразования и фазовые взаимоотношения между парами регистрируемых сигналов по величине функции фазовой вейвлет-когерентности (ФВК). Статистическую достоверность полученных значений ФВК оценивали методом суррогатов, количество которых было равным 100. Статистический анализ различий проводили на основе тестов Вилкоксона для независимых выборок, достоверными считали различия при $p < 0.05$.

Обнаружено, что у больных амплитуды сверхнизко- (< 0.04 Гц) и низкочастотных ($0.04 - 0.15$ Гц) компонентов ВСР были достоверно ниже как в покое, так и при локальном нагреве по сравнению со здоровыми участниками. Амплитуды респираторных колебаний (~ 0.3 Гц) кровотока предплечья (по данным ЛДФ) были выше в покое и при нагреве у пациентов по сравнению с контрольной группой. В сравнении со здоровыми участниками на стопе у пациентов амплитуды миогенных ($\sim 0,1$ Гц) колебаний кровотока были ниже в покое, а амплитуды колебаний с частотой сердечного ритма (~ 1 Гц) - при нагреве. Достоверных различий в спектральном составе колебаний кровенаполнения подушечек пальцев (по данным ФПГ) между пациентами и здоровыми участниками ни в покое, ни в ответ на локальный нагрев не обнаружено. У пациентов для пар ЛДФрк – ЛДФст и ФПГрк – ФПГст значения ФВК в покое были ниже для миогенных (~ 0.1 Гц) колебаний по сравнению с контрольной группой, а для нагрева достоверных различий не обнаружено. Кроме того, не выявлено достоверных изменений между значениями ФВК, характеризующими фазовые взаимосвязи между ВСР и динамикой кожной перфузии обеих конечностей. Для фазовых взаимосвязей между ВСР и динамикой кровенаполнения подушечки пальца стопы выявлено достоверное снижение ФВК у больных на частотах ~ 0.1 и ~ 0.3 Гц как в покое, так и при нагреве, в то время как для пальца руки достоверных различий не обнаружено. Полученные результаты могут служить основой для разработки методов ранней неинвазивной диагностики микрососудистых нарушений и способов их терапевтической коррекции при различных социально-значимых заболеваниях, включая СД2Т.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00215).

Влияние модифицированного метилглиоксальем сывороточного альбумина человека на ферментативную активность миелопероксидазы и функции нейтрофилов

Панасенко О.М.^{1,2*}, Иванов В.А.¹, Михальчик Е.В.¹, Горудко И.В.³, Григорьева Д.В.³, Басырева Л.Ю.¹, Гусев С.А.¹, Костевич В.А.^{1,4}, Горбунов Н.П.^{1,4}, Соколов А.В.^{1,4}

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия;

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия;

³Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь;

⁴Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

o-panas@mail.ru

Метилглиоксаль (МГ) – это высокореакционный α -кетоальдегид, образующийся в организме человека как побочный продукт ряда метаболических путей, в частности, в результате неферментативного окисления глюкозы при гипергликемии и сахарном диабете [1]. Миелопероксидаза (МПО; ЕС 1.11.2.2), локализованная в азурофильных гранулах нейтрофилов, катализирует образование активных форм галогенов, что является ключевым фактором антибактериальной активности нейтрофилов [2]. Было показано, что воздействие конечных продуктов гликирования (КПГ) на нейтрофилы стимулирует экспрессию клетками МПО [3]. Обнаруженный ранее парадоксальный рост фагоцитарной способности и экспрессии МПО вместе с увеличением внутриклеточной персистенции бактерий в КПГ-стимулированных нейтрофилах заставил нас предположить, что КПГ могут ингибировать активность МПО и, следовательно, бактерицидную функцию нейтрофилов [4]. Нашей целью было выяснить, влияет ли модификация сывороточного альбумина человека (ЧСА) в условиях гипергликемии на ферментативную активность МПО, ее высвобождение из нейтрофилов путем дегрануляции и нетоза, генерацию нейтрофилами активных форм кислорода (АФК) и галогенов (АФГ), которые являются ключевыми факторами бактерицидной активности нейтрофилов. С этой целью ЧСА, основной белок плазмы крови человека, модифицировали с помощью МГ, моделируя вызванное гипергликемией повреждение белка. Было изучено влияние ЧСА, модифицированного МГ (ЧСА-МГ) на ферментативную активность МПО и функциональную активность нейтрофилов.

Методы исследования. Пероксидазную активность МПО регистрировали по окислению 2,2'-диазинобис(3-этилбензотриазолин-6-сульфоната) аммония, хлорирующую – по обесцвечиванию красителя целестинового синего В. Связывание МПО с ЧСА-МГ исследовали методом диск-электрофореза, а также на твердой фазе с использованием моноклональных антител против МПО. Продукцию нейтрофилами АФК и АФГ регистрировали методом хемилюминесценции в присутствии люцигенина и люминола, соответственно. Дегрануляцию нейтрофилов исследовали методом проточной цитофлуориметрии, регистрируя экспрессию на поверхности клеток маркеров азурофильных (CD63) и пероксидазо-негативных (специфически/желатиназных) гранул (CD11b) с использованием флуоресцентно меченых антител. Нетоз оценивали по образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек в мазках крови, окрашенных по Романовскому.

Результаты. Показано, что ЧСА-МГ связывается с МПО, образуя прочный комплекс ($K_d = 1,1$ нМ), что подтверждает конкуренция ЧСА-МГ с моноклональными антителами против МПО. ЧСА-МГ ингибировал пероксидазную и хлорирующую активности МПО по неконкурентному механизму. Установлено, что ЧСА-МГ стимулировал дегрануляцию пероксидазо-негативных гранул, но не вызывал экзоцитоз содержимого азурофильных гранул, в том числе МПО. Кроме того, ЧСА-МГ увеличивал хемилюминесценцию нейтрофилов в присутствии люцигенина сам по себе, а также в ответ на добавление активатора форбол-12-миристат-13-ацетата, что свидетельствует о прайминге и активации НАДФН-опосредованной продукции нейтрофилами АФК. В то же время ЧСА-МГ не влиял на хемилюминесценцию нейтрофилов в присутствии люминола, то есть на продукцию АФГ, образующихся при участии МПО. ЧСА-МГ не вызывал нетоз и не влиял на нетоз, активированный форбол-12-миристат-13-ацетатом.

Выводы. Таким образом, ЧСА, модифицированный в условиях моделирования гипергликемии, стимулирует НАДФН-оксидазу нейтрофилов, но не активирует их функции, связанные с дегрануляцией азурофильных гранул и секрецией МПО, ингибируя при этом ее ферментативную активность. Это может лежать в основе снижения бактерицидной активности МПО и нейтрофилов в целом, ослабления врожденного иммунитета, трудностей при заживлении ран и повышенной чувствительности к инфекции при гипергликемии.

Работа поддержана Российским научным фондом (20-15-00390).

Литература

1. John W.G., Lamb E.J. The Maillard or browning reaction in diabetes. *Eye*. 1993, 7, 230-237.
2. Klebanoff S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 2005, 77, 598-625.
3. Lu H., Xu S., Liang X., Dai Y., Huang Z., Ren Y., Lin J., Liu X. Advanced glycated end products alter neutrophil effect on regulation of CD4+ T cell differentiation through induction of myeloperoxidase and neutrophil elastase activities. *Inflammation*. 2019, 42, 559-571.
4. Collison K.S., Parhar R.S., Saleh S.S., Meyer B.F., Kwaasi A.A., Hammami M.M., Schmidt A.M., Stern D.M., Al-Mohanna F.A. RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). *J. Leukoc. Biol.* 2002, 71, 433-444.

Влияние полиморфизма гена 8-оксигуанин-ДНК-гликозилазы hOGG1 на чувствительность периферической крови доноров к действию электромагнитного поля

Текуцкая Е.Е.^{1*}

¹ФГБОУ ВО "Кубанский государственный университет";
tekytska@mail.ru

Наиболее распространенным продуктом окислительного повреждения ДНК в условиях окислительного стресса (ОС) является 8-оксо-7,8-дигидрогуанин (8-охоG) который является основным биомаркером конформационных перестроек генома – показателем его дестабилизации [1]. По данным ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage) уровень эндогенного 8-охоG в ДНК составляет около 1 8-охоG на 106G. При генотоксическом стрессе этот показатель может увеличиваться в несколько раз [1]. Появление 8-охоG в наследственном материале клетки свидетельствует о дестабилизации генома в результате ОС организма или отдельных его тканей и клеток. При эксцизионной репарации поврежденные участки вырезаются из цепи ДНК, затем образовавшиеся бреши заполняются неповрежденным материалом. У человека выделено и описано 11 гликозилаз. Это 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (OGG1, КФ 3.2.2.23), которые удаляют 8-ОН-гуанин, оставляя после себя одонитевый разрыв [2]. Накапливаясь в биологических жидкостях, 8-охоG служит одним из лучших биомаркеров генотоксического ОС при различных патофизиологических состояниях, как это показано нами ранее [3].

Для исследования влияния чувствительности генов к действию низкочастотного электромагнитного поля (НЧ ЭМП) был проведен анализ полиморфизма гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы hOGG1 у здоровых лиц. Полиморфизм гена hOGG1 оценивали в сыворотке крови в выборке из 18 условно здоровых доноров (мужчины 20 - 25 лет, некурящие). Кровь собирали в пластиковые пробирки объемом 2,5 мл с добавлением в качестве

антикоагулянта ЭДТА в конечной концентрации 2,0 мг/мл. При изучении полиморфных вариантов rs1052133 гена hOGG1 использовали готовый коммерческий набор, разработанный ООО «Синтол». Реакционную смесь для определения полиморфизма Pro332Ala гена 8-oxoguanin DNA glycosylase OGG1 готовили согласно протоколу. После завершения амплификации анализировали результаты исследования с помощью программного обеспечения Rotor-Gene Q, установив значение пороговой линии 0,1 и выделив области соответствующих генотипов (Define Genotype, Wild Type, Heterozygous, Mutant). При интерпретации результатов проводили учитывали фланкирующую последовательность, частоту минорного аллеля G принимали равным 30,21 %, что соответствовало 1000 Genomes.

Результаты ПЦР образцов сыворотки крови доноров, проведенные с помощью генотипирования и анализа распределения показали, что у здоровых доноров наблюдается в основном гомозиготный генотип C/C гена hOGG1, но наряду с этим присутствуют гетерозиготный C/G- и гомозиготный по аллелю G/G генотипы.

По результатам ПЦР-анализа доноры были разделены на две группы: имеющие C/C генотип hOGG1 (11 человек) – 1 группа и C/G- и G/G генотипы (7 человек) – 2 группа. Для определения устойчивости геномного материала к окислительной модификации в условиях окислительной нагрузки образцы цельной крови доноров двух групп обрабатывали ЭМП с частотами 3, 30 и 50 Гц согласно методике, изложенной в [3].

Степень окислительного повреждения ДНК оценивали по уровню концентрации 8-охоG в сыворотке крови, содержание которого определяли методом, описанным в [3]. Обработка образцов крови доноров ЭМП частотами 3 и 30 Гц приводила к достоверно большему содержанию окислительных повреждений 8-охоG в ДНК сыворотки крови доноров второй группы по сравнению с первой. Исходный уровень в контрольных образцах без воздействия ЭМП составлял 7,4 нг/мл для 1-й группы и 6,3 нг/мл для 2-й группы. При воздействии ЭМП частотой 3 Гц содержание 8-охоG достоверно увеличивалось, достигая 14,8 нг/мл и 25 нг/мл соответственно. Это свидетельствует о максимальной подверженности к окислительной модификации ДНК при воздействии ЭМП в условиях нормально функционирующей системы антиоксидантной защиты.

Таким образом, к воздействию низкочастотным ЭМП более чувствительны доноры с C/G- и G/G- полиморфизмом гена 8-oxoguanin DNA glycosylase OGG1, в то время как доноры с C/C- полиморфизмом hOGG1 гораздо менее восприимчивы к ЭМП, о чем свидетельствует повышенное содержание 8-охоG в сыворотке крови доноров второй группы по сравнению с первой после обработки образцов их крови in vitro ЭМП.

1. Попов А.В., Юдкина А.В., Воробьев Ю.Н., Жарков Д.О. Каталитически компетентные конформации активного центра 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека // Биохимия. – 2020. – Т. 85, вып 2. – С. 225-238 DOI: 10.31857/S0320972520020062

2. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease // Cancer Letter. 2012. V. 327. P. 26 – 47

3. Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Гусарук Л.Р., Ильченко Г.П. Окислительные повреждения ДНК при действии переменного магнитного поля // Биофизика, 2020. Т.65, №.4, С.664-669 DOI: 10.31857/S0006302920040055

Влияние последовательности действия нейтронного и протонного излучений на опухолевый ответ и реакции кожи при облучении солидной карциномы Эрлиха у мышей

Балакин В.Е.¹, Розанова О.М.^{2*}, Белякова Т.А.¹, Смирнова Е.Н.², Стрельникова Н.С.¹, Шемяков А.Е.^{1,2}, Смирнов А.В.¹

¹Физико-технический центр Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Протвино, Россия;

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия;

rozanova.iteb@gmail.com

Введение. Протонная терапия успешно используется для лечения наиболее распространенных и сложных видов рака. Для дальнейшего развития этого вида терапии разрабатываются методы и подходы усиления действия протонного излучения с помощью FLASH-терапии, наноэнхансеров, и сочетанного действия с другими видами излучений, обладающими синергетическими или аддитивными свойствами. В последние годы сформировалось представление о сложном клеточном строении злокачественных образований и присутствия в них опухолевых стволовых клеток, которые обладают способностью формировать опухоль, поддерживать ее рост, а также отвечают за радиорезистентность агрессивных опухолей и возникновение рецидивов после радиотерапии. Поскольку существует достаточно экспериментальных доказательств о роли опухолевых стволовых клеток в развитии отсроченных вторичных опухолей как на месте первичной, так и в другой

локализации, то для повышения эффективности протонной терапии необходимо усиление воздействия именно на эту популяцию клеток опухоли.

Цель. Исследование влияния последовательности действия протонного излучения (ПИ) в суммарной дозе 80 Гр и нейтронного в дозе 5 Гр при сочетанном облучении солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) на опухолевый ответ и лучевые реакции кожи у мышей-опухоленосителей.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на белых беспородных мышках-самцах линии SHK в возрасте 8–9 недель. Всех мышек содержали в виварии ИТЭБ РАН в стандартных условиях со свободным доступом к сухому корму и воде. Было использовано 120 мышек, по 15–30 мышек в каждой группе. В качестве модели опухоли была выбрана быстрорастущая немезастизирующая солидная форма АКЭ. Для индукции солидной АКЭ, мышкам внутримышечно вводили 2×10^6 клеток в бедро левой задней лапы. При такой имплантации опухолевых клеток частота индукции АКЭ у мышек через 5 сут составляла 100%, и животные гибли через 47 ± 5 сут.

Первое локальное облучение опухолей у мышек тонким сканирующим пучком протонов в пике Брэгга или нейтронами проводили на 5-й день после инокуляции АКЭ, когда опухолевый узел пальпировался у всех животных. Перед каждым облучением мышек анестезировали внутривенной инъекцией селективных препаратов ксилазина (Intechemie, Нидерланды) в дозировке 0,7 мг/кг и золетила 100 (Virbac, Франция) – 3,4 мг/кг.

Опухоль у мышек в первой группе облучали только двумя фракциями ПИ по 40 Гр через 24 ч («протоны»), во второй группе предварительно за 3 ч до первой фракции ПИ мышек с АКЭ облучали нейтронами в дозе 5 Гр («нейтроны + протоны»), третью группу облучали нейтронами в дозе 5 Гр через 3 ч после второй фракции ПИ («протоны + нейтроны»), а в четвертой – опухоль однократно облучали нейтронами в дозе 5 Гр («нейтроны»), пятая контрольная группа включала необлученных мышек с опухолями, подвергавшихся транспортировке к источникам излучений, анестезии и имитации условий облучения.

Результаты и обсуждение. В группах «протоны», «нейтроны+протоны» и «протоны+нейтроны» наблюдалась регрессия первичного опухолевого узла через неделю после облучения и отсутствие вторичного роста опухоли в течение месяца. В группе «нейтроны» у всех животных наблюдалась задержка индукции роста опухоли на 15 сут, затем скорость роста опухоли была такая же как в контроле. Задержка роста опухолей после нейтронного облучения увеличила максимальную продолжительность жизни мышек с опухолями до 77 сут по сравнению с контролем, где она равна 54 сут, а средняя продолжительность жизни (СПЖ) животных облученной группы увеличилось на 15 дней.

В связи с тем, что пальпируемый объем опухоли был соизмерим с размером лапы животного, и опухолевый узел примыкал к кожным покровам, то при облучении кожа получала значительную дозу. В группе «нейтроны» развитие 4 степени кожных повреждений наблюдалось у 40% мышек, почти столько же, что и у группы «протоны», а сочетанное облучение нейтронами до протонов почти в 2 раза увеличивало частоту наиболее тяжелых кожных реакций по сравнению с одним только ПИ. В группе «протоны+нейтроны» наблюдалась самая благополучная картина лучевых последствий: низкая доля мышек с 4 степенью поражения кожи, и у 30% мышек была 1 степень выраженности поражений.

У мышек, подвергшихся комбинированному облучению, все случаи возобновления роста опухоли наблюдались в течение 5–12 недель после облучения в отличие от мышек, облученных только ПИ, у которых возобновление роста опухоли наблюдалось в более поздние сроки, через 19–35 недель. На протяжении всего периода наблюдения доля мышек с возобновившимся ростом опухоли той же локализации, что и первичная, составил 36% в группе «протоны» и 50% и 43% в группах «нейтроны + протоны» и «протоны + нейтроны» соответственно. СПЖ мышек без рецидивов в группах с воздействием нейтронов и протонов была достоверно меньше (118 и 124 сут) по сравнению с группой «протоны» (278 сут). СПЖ мышек с рецидивами в группе «протоны» составляла 115 сут после облучения; в группах «нейтроны+протоны» и «протоны+нейтроны» она была меньше, 65 и 80 дней соответственно.

Мыши, у которых опухолевый узел не развивался в месте облучения на протяжении всей жизни, в группах, подвергшихся комбинированному облучению, гибли значительно раньше, чем в группе, подвергавшейся только ПИ. Максимальная продолжительность жизни в группе «нейтроны + протоны» составила 7 мес, в группе «протоны + нейтроны» – 11 мес, в группе «протоны» – 21 мес.

Таким образом, анализ таких отдаленных последствий облучения, как время ремиссии, частота и скорость роста вторичных опухолей, продолжительность жизни мышек-опухоленосителей показал, что дополнительное воздействие на АКЭ нейтронов как до, так и после ПИ значительно ухудшает показатели эффективности терапии.

Влияние ресвератрола на экспрессию функциональных белков аксонов и шванновских клеток при повреждении и регенерации периферического нерва

Пиняев С.И.^{1*}, Пьянзина А.Е.¹, Отряскин Я.С.¹, Сюсин И.В.¹, Ревин В.В.¹

¹ФГБОУ ВО "МГУ им. Н.П. Огарёва";

komrad.pinyaev2009@yandex.ru

Исследование механизмов повреждения периферических нервов – ключевая проблема физиологии, биофизики и медицины. До настоящего времени не найдены механизмы, способные эффективно восстановить или усилить регенерационные процессы. Повреждение периферических нервов может привести к потере нейронной связи по сенсорным и двигательным нервам между ЦНС и периферическими органами, и они часто приводят к болезненным невралгиям из-за снижения двигательных и сенсорных функций и могут иметь катастрофические последствия для пациентов, резко влияя на их жизнедеятельность. Для отслеживания процесса регенерации могут выступать такие белки, как нулевой белок миелина и рост-ассоциированный белок-43.

Целью работы было исследование экспрессии аксонального белка (GAP-43) и белка шванновских клеток (P0) при повреждении седалищного нерва крысы и при действии ресвератрола.

Объектом исследования служили седалищные нервы половозрелых крыс линии Wistar. Животные были разделены на 3 экспериментальные группы: интактные животные, животные с поврежденным седалищным нервом, выводимые из эксперимента на протяжении месяца, с инъекцией ресвератрола.

В ходе выполнения работы были использованные следующие методы: препарирование седалищного нерва, выделение миелиновой фракции, определение количества белка по Лоури, электрофорез миелин-специфических белков, вестерн-блоттинг, иммуоферментный метод анализа количества NGF, измерения функционального седалищного индекса и потенциала действия седалищного нерва.

Нулевой белок миелина является основным белком миелина, экспрессируемый шванновскими клетками, составляющий примерно 50 % всех белков миелина ПНС и необходимый как для нормальной функции, так и для нормальной структуры миелина. Травма нерва способствует изменению миелиновой оболочки, которая вызывает изменение межаксональных взаимодействий шванновских клеток и тем самым ведет к дегенерации аксонов. Рост-ассоциированный белок-43 (GAP-43) представляет собой белок фосфорилирования клеточной мембраны с мембраной нервных окончаний, который относится к семейству кальмодулин-связывающих белков. GAP-43 – это нейроспецифический белок, который регулирует множество аспектов развития нейронов, пластичности и регенерации. Он тесно связан с ростом нервов и формированием синапсов, особенно при регенерации нервов. Данными фактами обусловлен выбор для исследования именно этих белков.

В ходе выполнения исследования нами было установлено, что травма нерва способствует изменению количества нулевого белка миелина как в проксимальном, так и в дистальном участке нерва. При этом, ресвератрол оказывает положительное влияние на восстановление количества нулевого белка миелина. Изменение количества нулевого белка подтверждает тот факт, что он является маркером восстановления шванновских клеток, а ресвератрол влияет на экспрессию белков шванновских клеток. Полученные нами результаты о наличии в поврежденных нервах такого аксонального белка, как рост-ассоциированный белок-43, свидетельствуют об протекании интенсивных регенерационных процессах после травмы, так как этот белок регулирует актиновый цитоскелет нейронов, являясь тем самым маркером восстановления аксонов. Обнаруженное нами увеличение этого белка при инъекции ресвератрола говорит о том, что это соединение оказывает влияние на синтез рост-ассоциированного белка-43, и тем самым, влияет на регенеративные процессы в ПНС. Также нами была установлена зависимость количества фактора роста нервов (NGF) от концентрации ресвератрола. Анализ функционального седалищного индекса поврежденного периферического нерва в норме и после травмы и потенциала действия показал восстановление иннервации поврежденным нервом мышцы, при чем, использование ресвератрола интенсифицировало данный процесс.

Таким образом, на основании полученных нами результатов, мы можем заключить, что ресвератрол оказывает влияние на экспрессию функциональных белков аксона (GAP-43) и шванновских клеток (P0) крыс при травме и регенерации периферических нервов, способствуя более выраженному протеканию регенерационных процессов в травмированном нерве. Говоря о механизме его действия, можно сказать, что эффект может быть, как от прямого действия, так и от опосредованного, так как известно, что многие полифенолы, в том числе и ресвератрол, оказывают модулирующее действие на различные сигнальные пути клетки, но здесь требуется дальнейшее, более детальное изучение данного факта.

Влияние сублингвального применения аминокислоты глицин на реактивность сосудов головного мозга

Машковцева Е.В.^{1,2*}, Рудникова Н.А.³, Копылова В.С.¹, Нарциссов Я.Р.^{1,4}

¹*НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, Россия;*

²*Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;*

³*Академия постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА, Москва, Россия;*

⁴*Группа биомедицинских исследований, БиДиФарма ГмбХ, Зик, Германия;*
mashkovtseva@icmph.ru

Цереброваскулярная реактивность (ЦВР) – способность резистивных сосудов расширяться и сужаться в ответ на изменяющиеся условия функционирования для оптимизации кровотока в головном мозге, поддержания стабильного уровня рН, поступления кислорода и питательных веществ. ЦВР является интегративным показателем адаптационных возможностей системы мозгового кровообращения, следовательно, его определение позволяет косвенно оценить риск развития в течение жизни сердечно-сосудистых нарушений, снижения когнитивных функций, а также неблагоприятного исхода в случае серьезных черепно-мозговых травм или острой ишемии головного мозга. Большой интерес представляет изучение реактивности церебральных сосудов у практически здоровых людей в динамике, под воздействием различных физических факторов и химических соединений.

Хорошо известны терапевтические эффекты сублингвального применения 1 г аминокислоты глицин при ишемических поражениях головного мозга, а также выраженное влияние длительного приема терапевтических доз на вегетативную нервную систему и коррекцию сосудистых нарушений. Экспериментально показано, что непосредственное воздействие раствора глицина на артериолы приводит к их дилатации. Тем не менее, до сих пор не изучалось его непосредственное действие на ЦВР человека.

В данной работе проводилось дуплексное сканирование внечерепных отделов брахиоцефальных артерий и транскраниальная доплерография передних, средних и задних мозговых артерий 30 здоровых добровольцев с использованием ультразвукового сканера Mindray DC-80. Оценивались проходимость сосудов, их диаметр, наличие деформаций, состояние периваскулярных тканей, линейная скорость кровотока, индексы резистентности (RI) и пульсации (PI). Реактивность сосудов головного мозга изучалась на фоне однократного сублингвального приема 1 г глицина в сравнении с группой плацебо, а также с помощью гиперкапнической пробы (произвольная задержка дыхания) до и после приема препарата.

Линейные скорости и индексы до и после 30 дней сублингвального приема терапевтических доз глицина достоверно различались в исследуемой группе, а также по сравнению с группой плацебо. Наиболее выраженная динамика наблюдалась у пациентов с асимметрией потоков левого и правого полушарий, что может отражать снижение необходимости в гиперкомпенсации после нормализации кровотока. Более существенное увеличение пиковых скоростей при гиперкапнической пробе после приема 1 г глицина также подтверждает его непосредственный эффект на ЦВР.

Воздействие протонного излучения высокой энергии на зрительно-моторное поведение обезьян

Терещенко Л.В.^{1*}, Бородачева Ю.В.¹, Жиганов Л.С.^{1,2}, Шамсиев И.Д.², Латанов А.В.¹

¹*МГУ, биологический факультет;*

²*Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН;*
lter@mail.ru

Резюме: Двух обезьян (самцы *Macaca mulatta*) обучали выполнять условнорефлекторную инструментальную задачу, включающую совершение зрительно вызванных саккад к периферическим стимулам и мануальных реакций. Исследовали эффективность выполнения инструментальной задачи, латентные периоды саккад и мануальных реакций до и после краниального облучения протонами высоких энергий (170 МэВ, 3 Гр). В течение трёх месяцев после облучения животные продемонстрировали устойчивый уровень выполнения инструментальной задачи, но при этом увеличивались латентные периоды саккад и мануальных реакций. Результаты свидетельствуют об устойчивости системных механизмов, обеспечивающих инструментальную деятельность, к радиационному воздействию протонами. Однако замедление инициации движений глаз и рук,

предположительно, свидетельствует о ранних нарушениях процессов зрительно-моторной интеграции и исполнительного контроля, как компонентов систем внимания.

Ключевые слова: обезьяны, инструментальное поведение, радиационное излучение, протоны, саккады, мануальные реакции, внимание

Во время дальних космических полетов радиационные воздействия галактических космических лучей (ГКЛ) на организм человека являются главным лимитирующим фактором, который неизбежно вызывает риск ранних поражений функций мозга. ГКЛ представляют собой высокоэнергетические ускоренные ядра химических элементов, среди которых протоны составляют 92%. ГКЛ могут вызывать нарушения поведения, когнитивной сферы в целом и, как следствие, операторской деятельности у космонавтов. В обеспечении операторской деятельности центральная роль принадлежит зрительной системе, а также функционально связанными с ней глазодвигательной и экстрапирамидной системам. Эти системы достигли наибольшего развития у приматов, включая человека. Поэтому исследования нарушений зрительно-моторного поведения (включающего также движения глаз), вызванных радиационными воздействиями, необходимо исследовать на обезьянах.

Целью работы является изучение зрительномоторной и манипулятивной деятельности обезьян после облучения мозга высокоэнергетическими протонами.

Двух обезьян О1 и О2 (*Macaca mulatta*) предварительно обучали выполнять условнорефлекторную инструментальную задачу, включающую совершение зрительно вызванных саккад к периферическим стимулам (ПС) с последующим выполнением мануальных инструментальных реакций в ответ на включение пускового стимула на месте ПС. ПС предъявляли в одном из 34-х положений в прямоугольном зрительном поле 39х26 угловых градусов. После завершения обучения задаче обезьян подвергли краниальному облучению протонами (170 МэВ, 3 Гр, экспозиция 5 мин.) 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 зрительных стимулов. По результатам экспериментов анализировали поведенческие показатели работы животных в инструментальной задаче, в т.ч. латентные периоды (ЛП) саккад и мануальных реакций.

После протонного облучения обе обезьяны продолжали успешно выполнять инструментальную задачу (90-95% корректных реакций) на протяжении всего периода наблюдений.

У обезьяны О1 в период 60-72 дней после облучения отмечалось увеличение ЛП саккад на 10-13% в пике на 67-й день с последующим возвратом к контрольным значениям и повторное увеличение ЛП саккад в период 81-87 дней на 5-10% в пике на 84-й день. У обезьяны О2 при смене зрительных стимулов (фиксационного в центре зрительного поля и ПС) с временной задержкой (GAP интервал) на протяжении трёх месяцев после облучения отмечалось увеличение ЛП саккад на 5,0-7,5% от контрольных значений. ЛП мануальных инструментальных реакций также увеличивались и высоко коррелировали с ЛП саккад.

У обеих обезьян увеличивалось время переключения зрительного внимания на ПС в течение трёх месяцев после облучения. В конце периода наблюдений у О2 такие увеличения времени переключения зрительного внимания сохранялись как при смене зрительных стимулов без задержки (NoDelay), так и с временной задержкой, в то время как у О1 достоверно наблюдались только при смене зрительных стимулов с временной задержкой.

Полученные результаты свидетельствуют об устойчивости выполнения обезьянами инструментальной задачи к протонам высоких энергий используемой дозы. Однако при этом возможны нарушения процессов зрительно-моторной интеграции, переключения зрительного внимания и исполнительного контроля, что отражалось в увеличении ЛП саккад и мануальных реакций. 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».

Возможности флуоресцентной время-разрешенной микроскопии в дифференцировании глиом от нормальных тканей мозга – пилотное исследование

Комарова А.Д.^{1,2*}, Яшин К.С.², Киселева Е.Б.², Можеров А.М.², Лукина М.М.², Щеславский В.И.², Ширманова М.В.²

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского;

²Приволжский исследовательский медицинский университет;
komarova.anastasii@gmail.com

Глиомы - первичные опухоли центральной нервной системы, являются наиболее распространенным злокачественным новообразованием головного мозга у взрослых. Порядка 70 % первичных опухолей головного мозга представлены различными глиомами, из них более половины на момент постановки диагноза имеют высокую степень злокачественности. Лечение глиом включает микрохирургическое удаление опухоли, при этом объем резекции опухоли достоверно коррелирует с продолжительностью жизни пациентов. В связи с агрессивным ростом глиом с диффузной инвазией в здоровую ткань головного мозга, возникают сложности в определении границ резекции опухолевой ткани. Актуальной задачей в данной области является разработка новых высокочувствительных методов быстрой интраоперационной диагностики. В качестве перспективной технологии рассматривается FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging) собственной (или авто-) флуоресценции тканей (Lukina et al. *Frontiers in Oncol.* 2019; Yuzhakova et al. *Frontiers in Oncol.* 2022).

Целью работы являлось *ex vivo* исследование автофлуоресценции глиальных опухолей и нормальных тканей мозга пациентов методом FLIM-микроскопии.

Нативные образцы глиальных опухолей пациентов исследовали с помощью FLIM-микроскопии в спектральном канале метаболического кофактора НАД(Ф)Н. Было исследовано 12 образцов глиом различной степени злокачественности: Grade II (диффузная астроцитома) n=5, Grade III (анапластическая астроцитома) n=3 и Grade IV (глиобластома) n=4, а также образцы белого вещества, перитуморальной области, и коры головного мозга. Образцы транспортировали в лабораторию в 10% БСА (бычий сывороточный альбумин) на льду, в течение 30 мин после хирургического удаления опухоли. Анализ автофлуоресценции методом FLIM проводили на лазерном сканирующем микроскопе LSM 880 (Carl Zeiss, Германия), оснащенном FLIM модулем, основанном на время-коррелированном счете единичных фотонов TCSPC (Becker&Hickl GmbH, Германия). Возбуждение автофлуоресценции осуществлялось в двухфотонном режиме на длине волны 750 нм фемтосекундным лазером Mai Tai HP (Spectra-Physics, США). Флуоресценцию детектировали в диапазоне 450-490 нм. Мощность лазерного возбуждения на образце составляла 6 мВт. Время сбора сигнала составляло 120 с. В экспериментах использовался масляно-иммерсионный объектив C-Apochromat W Corr с x40/1.2. Параметры затухания флуоресценции оценивали в программе SPCImage (среднее время жизни τ_m , время жизни короткой τ_1 и длинной τ_2 компонент, относительные вклады короткой a_1 и длинной a_2 компонент).

Методом FLIM-микроскопии показано, что глиальные опухоли разной степени злокачественности имеют отличия во времени жизни автофлуоресценции. Продемонстрировано, что глиобластомы (Grade IV) статистически значимо отличаются от астроцитом (Grade II и Grade III) по среднему времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н: τ_m (Grade IV) = 1,02(0,88;1,14), τ_m (Grade II) = 1,05(0,93;1,14) ($p=0,042$), τ_m (Grade III) = 1,04(0,95;1,11) ($p=0,00075$); по относительному вкладу короткой компоненты: a_1 (Grade IV) = 71,42(68,78;73,83), a_1 (Grade II) = 69,62(66,59;73,76) ($p=9,5*10^{-6}$), a_1 (Grade III) = 70,40(67,95;73,02) ($p=0,0096$). Зарегистрированные значения параметров затухания флуоресценции в образцах опухолей ($\tau_m \sim 1$ нс, $\tau_1 \sim 0,4$, $\tau_2 \sim 2,5$, $a_1 \sim 72\%$) соответствовали типичным значениям метаболического кофактора НАД(Ф)Н. Поэтому на основании полученных данных можно сделать предположения о сдвиге метаболического статуса глиобластом в сторону гликолиза, что ведет к повышению вклада свободного НАД(Ф)Н. Образцы белого вещества головного мозга и перитуморальные области характеризовались большим вкладом длинной компоненты: $69,08 \pm 3,72\%$ и $68,74 \pm 3,46\%$, соответственно, по сравнению с образцами астроцитом и глиобластом.

Таким образом, метод FLIM позволяет различать между собой глиальные опухоли разной степени злокачественности и отличать опухолевую ткань от нормальной (белое вещество головного мозга) и от перитуморальных областей по параметрам затухания автофлуоресценции НАД(Ф)Н.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект № 22-25-01198.

Возрастные изменения кальциевой активности астроцитов in vitro

Митрошина Е.В.^{1*}, Мищенко Т.А.¹, Ярков Р.С.¹, Кривоносов М.И.¹, Ведунова М.В.¹

¹ННГУ;

helenmitroshina@gmail.com

Исследования последних лет показали важную роль астроцитов в обеспечении функционирования нейронных сетей головного мозга. Выполняя исключительную роль в поддержании гомеостаза нейронов, астроциты способны модулировать активность мозга и могут тормозить или ускорять процессы нейродегенерации. Особое значение, в возрастном аспекте, имеет ответ клеток головного мозга на действие гипоксии, одного из основных патогенетических факторов ишемического повреждения головного мозга [1]. В связи с этим исключительную важность представляет исследование возрастных изменений астроцитов.

Изучение возраст-зависимой функциональной реорганизации кальциевой активности астроцитов проводилось на моноастроцитарных культурах головного мозга и первичных диссоциированных культурах гиппокампа с использованием D-галактозной модели старения (D-галактоза добавлялась в культуральную среду с 3 по 14 день культивирования).

Моделирование гипоксии in vitro проводили на 14 DIV путем замены нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода. Кальциевый имиджинг проводился на 21 DIV. Для визуализирующих исследований функциональной кальциевой активности нервных клеток использовали лазерный сканирующий микроскоп LSM 800 (Zeiss, Германия). Методика позволила визуализировать функциональную архитектуру нейрон-глиальной сети на клеточном уровне. В качестве кальциевого сенсора был использован Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (Invitrogen, США).

Показано, что при фармакологическом моделировании старения с использованием D-галактозы изменения основных параметров кальциевой активности в моноастроцитарных культурах заключаются в снижении числа функционально значимых связей, сформированных клеткой («Контроль» $5,8 \pm 0,85$; «D-галактоза» $3,27 \pm 0,32$), однако уровень корреляции кальциевой активности, а также скорость распространения сигнала при этом не изменяется. Моделирование гипоксии приводило к снижению показателей связанности сети как в опытной, так и в контрольной группе.

Исследование реорганизации сетевой активности нейрон-глиальных первичных культур гиппокампа показало, что моделирование ускоренного фармакологического старения приводит к выраженному угнетению кальциевой активности и нарушению связности нейрон-глиальной сети по всем исследуемым параметрам. При моделировании гипоксии в группе с D-галактозой наблюдаются более выраженные деструктивные нейросетевые процессы.

Работа выполнена в рамках проекта создания и развития Научного центра мирового уровня «Центр фотоники» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2022-293.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Charvériat, M., Naus, C.C., Leybaert, L., Sáez, J.C. & Giaume, C. Коннексин-зависимая нейроглиальная сеть как новая терапевтическая цель. Границы клеточной неврологии. 11 (2017). doi:10.3389/fncel.2017.00174

Возрастные изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера крыс, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию

Деттерер А.С.^{1*}, Яковлев А.В.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

anna.detterer@gmail.com

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) – структура, обеспечивающая избирательную проницаемость между компонентами крови и паренхимой головного мозга. Гомоцистеин – серосодержащая аминокислота, участвующая в цикле метионина. Повышенное содержание в крови гомоцистеина (гипергомоцистеинемия, ГГЦ) вызывает нарушение структуры ГЭБ, через усиление производства активных форм кислорода и активацию матриксных металлопротеиназ, которые играют важную роль в разрушении белкового матрикса и приводит повышенной проницаемости сосудов. Цель исследования: анализ возрастных изменений проницаемости ГЭБ крыс в условиях хронического действия гомоцистеина и его производных.

В экспериментах использовались следующие группы животных: контрольная группа, животные с пренатальной ГГЦ и с введением гомоцистеин-тиолактона. Для создания хронической модели пренатальной ГГЦ

использовалась пищевая метиониновая нагрузка (7.7 г/кг корма) в течение всей беременности самок крыс. Эксперименты проводились на потомстве в возрасте 1.5 и 6 месяцев после рождения. Для оценки проницаемости ГЭБ определили экстравазацию альбумина в ткани головного мозга с использованием красителя Evans Blue (ЕВ, 2мл/кг). Прохождение красителя Evans Blue через ГЭБ оценивали спустя 60 мин после его внутривенного введения. Определение содержания красителя в гомогенате мозжечка животного осуществляли спектрофотометрически (620 нм) с использованием планшетного ИФА ридера Multiscan FS (Thermo scientific, США) по калибровочным кривым. Для анализа действия производных гомоцистеина – гомоцистеин-тиолактон (10 мг/кг) вводился подкожно за 60 мин до введения красителя.

Анализ экспериментальных данных показал, что в контрольных условиях после внутривенного введения ЕВ не отмечалось выхода красителя за пределы церебральных сосудов. Концентрация ЕВ в гомогенате клеток мозжечка контрольной группы животных в возрасте 1.5 месяца составляла 0.1 ± 0.04 мкг/мг ткани (N = 11). Предварительное введение гомоцистеин-тиолактона вызывало увеличение проницаемости ГЭБ и концентрация ЕВ составляла 0.4 ± 0.2 мкг/мг ткани (N = 9; $p < 0.05$). В условиях пренатальной ГГЦ и в тканях мозга потомства наблюдалось нарушение проницаемости ГЭБ и содержание ЕВ в тканях мозжечка составляла 0.6 ± 0.09 мкг/мг ткани (N = 8; $p < 0.05$). Индекс проницаемости ГЭБ составил $16 \pm 2\%$ (N=8) у крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией и не превысил 1% у контрольной группы. В тоже время, у крыс экспериментальной группы в возрасте 6 месяцев наблюдалось восстановление проницаемости ГЭБ и концентрация ЕВ в гомогенате мозжечка составляла 0.14 ± 0.01 мкг/мл (N=6, $p > 0.05$) относительно контроля.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что гомоцистеин и его производные оказывают негативное влияние на проницаемость гематоэнцефалического барьера крыс в пренатальный период развития. Возможно, токсическое действие гомоцистеина связано с нарушением структуры эндотелия сосудов мозга, дисфункцией астроцитов и нейронов.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030)

Временные паттерны спонтанной активности нейронов слуховой коры мыши в условиях поверхностной анестезии и бодрствования

Хорунжий Г.Д.^{1*}, Егорова М.А.¹
¹ИЭФБ РАН;
khорунzhii.gd@gmail.com

Высокая спонтанная (фоновая) активность является характерной особенностью нейронов слуховой области коры млекопитающих (Egorova, 2005; Luczak et al., 2009; Sakata, Harris, 2012), отличающей корковый уровень слуховой системы от стволового. В работах, выполненных на наркотизированных животных, показана упорядоченная пачечная временная организация фоновой импульсации одиночных нейронов первичной слуховой коры (Egorova, 2005), а также обоснована ее роль в формировании функционального шаблона синхронизации процессов возбуждения и торможения в кортикоталамических нейронных сетях (Molnar et al., 2020). При этом, выполненная нами вероятностная оценка формирования пачечных временных паттернов спонтанной активности нейронов слуховой коры наркотизированных мышей показала, что характер их возникновения отличается от случайного (Хорунжий, Егорова, 2022). Однако, влияние фоновой импульсации одиночных нейронов слуховой коры на протекающие при их участии процессы анализа звука остается не вполне понятным. Особенности временной организации спонтанной активности нейронов слуховой коры бодрствующих животных, при этом, остаются практически неизученными. Настоящее исследование направлено на оценку и сопоставление временных паттернов фоновой импульсации одиночных нейронов слуховой коры наркотизированных и бодрствующих мышей.

В работе внеклеточно регистрировали спонтанную активность одиночных нейронов первичного (AI) и переднего (AAF) полей слуховой коры наркотизированных и бодрствующих домашних мышей. Все нейроны, как у наркотизированных, так и бодрствующих животных проявляли высокую, упорядоченную во времени спонтанную активность.

У наркотизированных мышей упорядоченность временных паттернов фоновой активности нейронов проявлялась в группировке их спонтанных спайков в пачки, содержащие 4-9 импульсов у разных нейронов. Число спайков в пачках отличалось не только у различных нейронов, но и, в пределах 2-3 импульсов, между разными пачками одного и того же нейрона. Оценка дисперсии числа импульсов в пачках, выполненная для каждого нейрона, показала, что у 49% исследованных нейронов она не превышала одного спайка, а у 68% нейронов – двух. Пачки спонтанных импульсов, как правило, группировались в более продолжительные временные паттерны длительностью до нескольких секунд, состоящие из 9-10 пачек. Эти паттерны,

обнаруженные нами в спонтанной активности 70% корковых нейронов, были условно названы «гиперпачками». У исследованных нейронов в пачки были объединены от 40 до 100% спонтанных спайков, в «гиперпачки» – 90 – 95% пачек импульсов. Таким образом, фактическая вероятность формирования наблюдаемой нами как пачечной, так и «гиперпачечной» упорядоченной временной структуры спонтанной активности нейронов слуховой коры наркотизированных мышей была близка к единице, что на много порядков превышало вероятности независимого и случайного возникновения такого же числа событий на временных интервалах, соответствующих периоду регистрации. Нейроны полей AI и AAF достоверно не различались по особенностям временных паттернов их спонтанной активности ($p > 0.5$).

Анализ временной структуры спонтанной активности нейронов первичной слуховой коры бодрствующих мышей выявил аналогичную картину – отдельные импульсы объединялись в пачки, содержащие 2-27 спайков у разных нейронов. У 47 % исследованных нейронов дисперсия числа импульсов в пачках не превышала 2 спайков. Величина межимпульсного интервала в пачках у разных нейронов занимала диапазон 6.5 – 41 мс. Пачки у разных нейронов включали от 73 до 100% спонтанных импульсов, т.е. вероятность пачечной структуры спонтанной активности у исследованных нейронов слуховой коры составляла 0.7 – 1. Между нейронами полей AI и AAF отсутствовали достоверные различия по временным свойствам пачек спонтанных импульсов ($p > 0.5$).

Сравнение свойств спонтанной активности нейронов слуховой коры бодрствующих и наркотизированных мышей не выявило достоверных различий по таким показателям, как доля фоновых импульсов, объединенных в пачки, средняя длительность пачки импульсов, а также величина межимпульсного интервала в пачке ($p > 0.5$). Средняя частота импульсации в пачках спонтанных спайков также достоверно не различалась у нейронов бодрствующих и наркотизированных мышей, но нами была отмечена тенденция к более высокой частоте спонтанной импульсации корковых нейронов у бодрствующих животных ($p = 0.08$, тест Манна-Уитни). Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что упорядоченная временная структура спонтанной активности нейронов слуховой коры наркотизированной мыши отличается высокой стабильностью и относительно слабо изменяется при пробуждении животного.

Обнаруженная нами строгая упорядоченность временной структуры спонтанной активности нейронов слуховой коры мыши послужила основанием для дальнейшего анализа ее фрактальных свойств. Для их оценки использовали показатели, описывающие вариабельность и периодичность системы, состоящей из определенного числа спонтанных импульсов, происходящих на данном временном интервале – т.н. факторы Фано и Аллана. Полученные результаты свидетельствуют, что временная структура фоновой импульсации нейронов слуховой коры как наркотизированных, так и бодрствующих мышей имеет признаки периодического процесса. Вместе с тем, данный вопрос требует дальнейшего детального изучения.

Литература

1. Хорунжий Г.Д., Егорова М.А. // Сборник материалов XXXIV сессии Российского акустического общества: сб. статей. Москва, 2022. С. 901-907.
 2. Egorova M.A. // J. Evol. Biochem. Physiol. 2005. V. 41(4). P. 476.
 3. Luczak A., Bartho P., Harris K.D // Neuron. 2009. V. 62. P.413-425.
 4. Molnár Z., Luhmann H.J., Kanold P.O. // Science. 2020. V. 370(6514). P. eabb2153.
 5. Sakata S., Harris K.D. // Frontiers Neural. Circuits. 2012. V. 6. P. 109.
- Работа поддержана федеральным бюджетом по госзаданию № 075-00967-23-00

Гепатопротекторное действие пероксиредоксин 6 при ренальной ишемии

Курганова Э.А.^{2,1*}, Гордеева А.Е.¹, Новоселов В.И.¹

¹Институт биофизики клетки РАН;

²Пушчинский государственный естественно-научный институт;

kurganova.ezhena@yandex.ru

Между почками и печенью существуют многоуровневые связи, что приводит к их совместному повреждению при травме только одного из них. Так ишемически-реперфузионное (И-Р) поражение почки приводит к повреждению печени. Считается, что в основе этого процесса ключевую роль играет окислительный стресс. Для элиминации повреждающего действия реперфузии почки на печень требуется использование антиоксидантных агентов. В настоящей работе в качестве протектора печеночной ткани от окислительного стресса при ренальном И-Р поражении был выбран антиоксидант – фермент пероксиредоксин 6 (Prx6). Prx6 представляет собой уникальный полифункциональный фермент, выполняющий ключевую защитную антиоксидантную функцию в клетке. Prx6 наряду с пероксидазной активностью обладает пероксинитритредуктазной и фосфолипазной активностями и участвует во внутриклеточной сигнализации клетки.

Цель работы - исследование влияния экзогенного Rrx6 на состояние печени в начальный реперфузионный период после ишемии почки. В экспериментах были использованы крысы-самцы линии Вистар. Экзогенный Rrx6 вводили внутривенно за 15 минут до ишемии почки. Срок ишемии 45 минут, реперфузии - 2, 5 и 24 часа. Рекомбинантный Rrx6 получен в лаборатории механизмов рецепции Института биофизики клетки РАН.

Повреждения в печени были отмечены через 2 часа реперфузии почки - расширение синусоидных капилляров и сосудов портальных трактов, очаговая инфильтрация лейкоцитов в портальной зоне. С нарастанием времени реперфузии отмечается усиление сосудистой реакции, развитие очагов гидропической дистрофии гепатоцитов, отек в портальных зонах, с выраженной очагово-диффузной лейкоцитарной инфильтрацией и апоптоз клеток. Морфологические изменения в печени при поражении почки отразились на активности печеночных ферментов в крови. Их активность в крови максимально возростала через 5 часов реперфузии: активность аланинаминотрансферазы - в 3 раза, аспартатаминотрансферазы - в 9 раз относительно контрольных значений. Напротив, при использовании Rrx6 не было отмечено дистрофии гепатоцитов, выявлена слабовыраженная сосудистая реакция и лейкоцитарная инфильтрация, отмечено снижение апоптоза и нормализация активности печеночных ферментов.

И-Р поражение почек приводит к росту уровня интерлейкинов в ткани печени в течение 24 часов, напротив, в условиях использования белка не происходит роста уровня цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10 в печени. Кроме того, при И-Р почек в ткани печени отмечен рост концентрации ТБК-реактивных продуктов в 10 раз через 5 часов реперфузии ишемизированной почки. Использование Rrx6 не приводит к росту концентрации ТБК-реактивных продуктов в печени в течение всего периода реперфузии ишемизированной почки. Их концентрация остаётся на уровне контрольных значений.

Таким образом, И-Р почки приводит к развитию патологических процессов в печени, которые максимально проявляются через 5 часов реперфузии. Использование Rrx6 снижает поражение печени, что связано с его мощными антиоксидантными свойствами, которые позволяют нейтрализовать гиперпродукцию активных форм кислорода уже в начальный период реперфузии.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФИЦ «ПНЦ БИ» РАН (№ 075-01512-22-00).

Гипотермическая консервация сердца крысы в растворе Кустодиол под давлением газовой смеси монооксида углерода и кислорода

Гурин А.Е.^{1*}, Гагаринский Е.Л.¹, Фесенко (мл.) Е.Е.¹

¹*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН»;*
gurinae@pbcras.ru

Трансплантация органов в современном мире для многих людей остается единственно возможной процедурой продления жизни и улучшения ее качества. Несмотря на наблюдающийся от года к году рост числа трансплантаций в России, количество пациентов в листах ожидания превышает число выполненных операций. Так, общее число операций по пересадке сердца в России в 2021 году составило 290, в то время как в листе ожидания в течение 2021 г. состояло 736 потенциальных реципиентов. [1] Такое несоответствие объясняется тем, что срок хранения сердца при использовании стандартных методов статической холодовой консервации составляет 4-6 часов. Столь малый срок хранения накладывает существенные ограничения на доступность трансплантационного материала, в частности на возможность забора данного органа в удаленных регионах. Для пролонгации времени хранения донорских органов, в последнее время получили развитие такие направления исследований, как оптимизация существующих консервирующих растворов, кислородная персуфляция и нормотермическая аппаратная перфузия. Одним из новых методов, обещающих перспективы серьезной пролонгации предельных сроков хранения донорского сердца, является газовая гипотермическая консервация под давлением газовых смесей на основе монооксида углерода и кислорода.

Нами было проведено исследование по восстановлению функциональной активности сердца крысы после гипотермической консервации под избыточным давлением газовой смеси CO+O₂, отмытого раствором «Кустодиол», являющимся золотым стандартом в трансплантологической практике России. Экспериментальные группы включали: «Контроль», «Кровь+Газ», «Кустодиол+Газ», с подгруппами по времени хранения органа 6, 12 и 24 часов. После консервации, сердца реперфузировали на стенде isolatedHEART-SR (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, Германия) и регистрировали данные развиваемого давления в левом желудочке и частоты сердечных сокращений.

Показано, что «Кустодиол», являющийся золотым стандартом хранения сердца в России, не проявляет синергических эффектов при сочетанном использовании с консервирующей газовой смесью. После 12 ч хранения сократимость в группе «Кустодиол+Газ» по показателю давления, развиваемого левым желудочком,

снизилась до $34 \pm 9\%$ от показателя интактного контроля, принятого за 100%. В то же время в группе без «Кустодиола» данный показатель оказался достоверно выше, составив $61 \pm 9\%$. При сроках хранения 6 и 24 ч мы не зафиксировали достоверные отличия давления, развиваемого левым желудочком, в обеих группах при уровнях падения сократимости порядка 75% (6 ч) и 30% (24 ч) от контроля. Показана высокая сохранность сердца при консервации органа, не отмытого от крови. Данный факт может найти свое применение при длительной газовой гипотермической консервации с применением кровяной кардиopleгии или плегии с добавлением элементов крови к кристаллоидным растворам [2].

1. Готье С.В., Хомяков С.М., Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2021 году. XIV сообщение регистра Российского трансплантологического общества. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2022. 24 №3: 8-31.

2. Гурин А.Е., Гагаринский Е.Л., Фесенко Е.Е. (мл.), Влияние кустодиола на сохранность изолированного сердца крысы при газовой гипотермической консервации под давлением смеси монооксида углерода и кислорода. // Биофизика. 2022. 67 №5: 1002–1008.

Деацетилирование фактора транскрипции E2F1 с участием гистондеацетилазы 1 при аксотомии периферических нервов

Дзряян В.А.^{1*}, Гузенко В.В.¹, Калюжная Ю.Н.¹, Романченко Е.Д.¹

¹Южный Федеральный Университет;

dzreyan2016@mail.ru

Посттрансляционному ацетилированию/деацетилированию с помощью гистонацетилтрансфераз (НАТ) и деацетилаз гистонов (HDAC) подвергаются не только гистоны, но и негистоновые белки, такие как шапероны, сигнальные белки, факторы транскрипции. Через ацетилирование/деацетилирование регулируется активность негистоновых белков, белок-белковые взаимодействия, их клеточная локализация, что определяет рост, дифференцировку, миграцию и выживание клеток как в норме, так и при патологии.

Травмы периферических нервов (ТПН) – одна из распространенных причин инвалидизации и смертности населения и, как следствие, одна из актуальных проблем здравоохранения не только в России, но и во всем мире. Ситуация ухудшается отсутствием эффективных нейропротекторов, способных защитить нервные клетки, особенно в первые часы после повреждения.

Согласно последним исследованиям фактор транскрипции E2F1 является одним из негистоновых субстратов некоторых HDACs. Известно, что он регулирует экспрессию проапоптотических белков, таких как каспазы 3, 7, 8 и 9, SMAC/DIABLO, Araf-1, p53, p73, белки семейства Bcl-2 и тем самым стимулирует апоптоз. Однако, исследований, направленных на изучение ацетилирования/деацетилирования негистоновых белков, включая E2F1, в условиях нейродегенерации крайне мало, а исследования этих процессов при травмах периферических нервов практически отсутствуют.

Цель работы. Исследование процессов ацетилирования и деацетилирования фактора транскрипции E2F1 в нейронах и глиальных клетках ПНС млекопитающих в различные периоды после аксотомии периферических нервов.

Материалы и методы. Модель нейротравмы периферических нервов – аксотомированные ганглии корешков спинного мозга крысы (DRG, dorsal root ganglion), полученные путем перерезки седалищного нерва. Опыты с перерезкой седалищного нерва проводились на взрослых крысах-самцах (Wistar, беспородные), весом 200–250 г. Перерезку седалищного нерва и изоляцию DRG осуществляли согласно стандартному протоколу, описанному Savastano et al. Количественную ПЦР проводили с помощью qPCRmix-HS SYBR. Праймеры были синтезированы в ЗАО «Евроген». Методы иммуноблоттинга и двойной иммунофлуоресцентной микроскопии использованы для оценки экспрессии и внутриклеточного распределения ацетилированных форм E2F1 в клетках дорзальных ганглиев крыс. Иммуноблоттинг проводили методом полусухого переноса с помощью системы Trans blot Turbo через 1, 4, 24 часа или 7 дней после аксотомии, объединяя 4 и 5 DRG от трех крыс. Для подтверждения факта межбелкового взаимодействия между HDAC1/ацетилированный E2F1(K120) была проведена ко-иммунопреципитация с помощью набора компании Sileks с использованием магнитных частиц с белком G в соответствии с рекомендациями производителя. В полученном иммунопреципитате определяли гистондеацетилазную активность HDAC1 в отношении E2F1. Исследование проводили с использованием коммерческого набора твердофазного иммуноферментного анализа для HDAC1. Визуализация белок-белковых взаимодействий была проведена с помощью технологии Duolink® PLA (анализ бесконтактного лигирования). Для изучения механизмов участия исследуемых белков, процессов ацетилирования и деацетилирования в гибели клеток ганглиев, а также возможности нейропротекции после нейротравмы (перерезки седалищного нерва) был использован неселективный ингибитор HDAC I класса вальпроат натрия (i.p. 300 мг/кг). Статистическая обработка производилась с использованием t-критерия Стьюдента и метода ANOVA.

Результаты. В аксотомированных ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы наиболее ранние и специфичные изменения наблюдаются со стороны гистондеацетилаз HDAC1, экспрессия которой увеличивалась уже через 1 час после перерезки седалищного нерва. Экспрессия фактора транскрипции E2F1 в аксотомированных нейронах ганглиев повышается через 4 часа. Уровень ацетилированного E2F1 (K120) снижаются в цитоплазме нейронов ганглиев через 24 часа после аксотомии. Нейротравма вызывает транслокацию HDAC1, фактора транскрипции E2F1 из ядра в цитоплазму в первые 24 часа после повреждения. Аксотомия седалищного нерва ассоциирована с повышением экспрессии и активности HDAC1 в аксотомированных ганглиях крыс, что приводит к снижению ацетилированного E2F1 (K120) в цитоплазме нейронов. Введение ингибитора HDAC в течение 7 дней после перерезки седалищного нерва снижает уровень E2F1 в цитоплазме, но увеличивает в ядре, что свидетельствует о перераспределении фактора транскрипции между ядром и цитоплазмой, на что также указывает коэффициент колоколизации с ядерным маркером. Таким образом, введение ингибитора HDAC I класса вальпроата натрия отменяет вызванную аксотомией транслокацию E2F1 из ядра в цитоплазму и увеличивает уровень ацетилирования E2F1 по K120 в нейронах ганглиев, защищая их клетки от апоптоза. Это говорит о том, что, во-первых, уровень ацетилирования белка зависит от деацетилазной активности HDAC1, во-вторых, влияет на внутриклеточную локализацию белка.

Суммируя все данные:

1. Изучены белок-белковые взаимодействия фактора транскрипции E2F1 с HDAC1.
2. После выявления пары белков «субстрат-фермент» определена деацетилазная активность HDAC1 в отношении E2F1.
3. Это позволило при помощи ингибитора HDAC I класса перейти к установлению зависимости между ацетилированием регуляторного белка и его активностью в отношении нижестоящих мишеней, а также апоптозом клеток ганглиев после аксонального повреждения.

Полученные данные позволят по-новому взглянуть на функции гистонацетилтрансфераз и деацетилаз гистонов, которые могут быть более обширными, чем регуляция транскрипции. Эти знания лягут в основу теоретической базы, которая может быть далее использована для разработки новых селективных ингибиторов HDAC в качестве потенциальных нейропротекторов, защищающих нейроны и глиальные клетки на ранних сроках после аксонального стресса.

Выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-15-00188.

Действие Уридина на физиологическую активность в лимфоцитах крови в Ротеноновой модели болезни Паркинсона у крыс

Хундерякова Н.В.^{2*}, Медведева В.П.^{1,2}, Мосенцов А.А.^{1,2}, Хмиль Н.В.^{1,2}, Миронова Г.Д.^{1,2}

¹Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пуццо, Россия;;

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуццо, Россия;

nkhunderyakova@gmail.com

Болезнь Паркинсона (БП) является хроническим нейродегенеративным заболеванием, связанным с гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции. Известно, что одним из путей развития БП, является митохондриальная дисфункция, которая сопровождается снижением их энергетической эффективности и развитием окислительного стресса. В нашей работе исследовалось влияние уридина на активность ключевого фермента митохондрий сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и цитозольной-лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в лимфоцитах крови на мазках, а также уровень малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови, в модели БП индуцированной ротеноном. Предшествующими работами нашей группы было показано, что уридин приводит к увеличению образования, в клетке, уридиндифосфата - активатора митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала (митокАТФ-канал). Активация митокАТФ-канала, приводит к снижению окислительного стресса [1,2], поэтому, мы использовали уридин в модели БП для лечения митохондриальной дисфункции у крыс.

Материалы и методы: Исследование проведено на самцах крыс (n=25) линии Вистар, весом 280-320 г, содержащихся на базе ИТЭБ РАН, с соблюдением правил Европейской конвенции по обращению с лабораторными животными. Для моделирования БП у крыс применяли раствор ротенона (SIGMA) в дозе 1,7 мг/кг веса животного, который вводили путем подкожного хронического введения на протяжении 28 дней, по схеме 2 дня введение, 2 дня перерыв. Ротенон является ингибитором клеточного дыхания, он блокирует перенос электронов с железосерных кластеров с комплекса I на убихинон. Уридин вводили внутривнутрибрюшинно в концентрации 30 мг/кг веса животного, с периодичностью 2 дня введение, 2 дня перерыв.

Активности СДГ (биомаркера аэробного дыхания митохондрий) и ЛДГ (биомаркера анаэробного дыхания - гликолиза) проводили ЦБХ методом в иммобилизованных лимфоцитах крови на мазках [3]. ЦБХ метод основан

на реакции восстановления нитросинего тетразолия хлорида до темно-синего диформаза (ДФ) на втором участке дыхательной цепи митохондрий. Тонкие мазки крови фиксировали в течение 30 сек 60 % ацетоном и 10 мМ НЕРЕС, рН 5,2-5,4, затем окрашивали в среде инкубации содержащей: 125 мМ КСl, 10 мМ НЕРЕС, 1,22 мМ НСТ в течение 1 часа при 37°C, рН 7,2 ±0,05 и добавки; 5мМ Succinic acid - основная проба, характеризующая активность СДГ и Lactic acid 5мМ, Malonic acid 5мМ и 0,5мМ NAD - активность ЛДГ. Мазки изучали при увеличении 1000X на микроскопе Лейка DM-2000. Цитоморфологический и количественный анализ цветных микрофотографий лимфоцитов проводили программами «Bloodrunner» и «Cell Composer», позволяющих определять количество и распределение красителя ДФ в каждой клетке. Уровень перекисей липидов, определяли по МДА, в сыворотке крови, с тиобарбитуровой кислотой диагностическим набором «ТБК-АГАТ». Статистическую обработку данных осуществляли с помощью лицензионного программного обеспечения Microsoft Office Excel-2007 и Statistica 10.0. Оценка значимости различий данных между группами, проводилась с использованием t- критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при значениях *p<0,05.

Результаты. Подкожное ведение ротенона крысам, для моделирования БП, привело к достоверному (p≤0,05) увеличению в 2 раза активности СДГ (контроль 1,3 ±0,37 у.е.; БП 2,4 ±0,85 у.е. (у.е.- количество ДФ)), и активности ЛДГ, которая также увеличивалась в 2 раза (p≤0,01) (контроль 2,24 ±1,19; БП 3,9 ±1,0 у.е). Введение уридина достоверно снижало на 25 % повышенную активность СДГ (гиперактивацию митохондриальной ЛДГ. Измерение радиуса лимфоцитов, у больных и контрольных животных, без разделения их на субпопуляции, не имело достоверных отличий. Однако в группе с уридином размер лимфоцитов достоверно увеличился по сравнению с контролем (контроль 3,2 ±0,2; уридин 3,9 ±0,4 μм2). Размах вариативности размеров лимфоцитов, на фоне введения уридина, был шире, чем у контрольных животных. Определение МДА в сыворотке крови у животных с БП достоверно выше в 2 раза, чем в группе контроль (контроль 4,44 ±0,85; БП 7,68 ±1,34 мМоль/л, p≤0,01), а введение больным животным уридина, снижает этот показатель в 2,5 раза до уровня ниже контрольного (БП + уридин 2,72 ±0,67 мМоль/л, p≤0,01). Подобное действие уридина, как фактора, снижающего окислительный стресс, было показано и в других работах нашей группы [1]. Известно, что ротеноновая модель - одна из экспериментальных моделей БП, которая вызывает нигростриальную дегенерацию, вызванную ингибированием комплекса I дыхательной цепи митохондрий и появлением телец Леви. В нашей работе, на этой модели, впервые обнаружено существенное увеличение активности СДГ и ЛДГ т.е. повышение как аэробного, так и анаэробного дыхания в лимфоцитах крови, а также увеличение уровня МДА в сыворотке крови, что подтверждает развитие у этих животных окислительного стресса. Введение уридина - активатора митоКАТФ-канала животным с БП, приводило к снятию гиперактивации СДГ митохондрий лимфоцитов крови на 25%, и значительному снижению уровня перекиси липидов в сыворотке. Эти данные подтверждают наше предположение, что уридин уменьшает окислительный стресс и нормализует функцию митохондрий в лимфоцитах, что позволяет его рекомендовать для профилактики и лечения БП.

Работа поддержана грантом РФФ №23-25-00441.

Список литературы

1. Кветной И.М., Миронова Е.С., Крылова Ю.С. и др. Молекулярная медицина 2022, т. 20, №1, 25-28
2. Мосенцов А.А. и др. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2020, т. 170, № 10, 438
3. Хундерякова Н.В., Захарова Н.М. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020, т. 169, № 4. 426–430
4. Ставровская А.В. и др. Нейрохимия, №3. 2020

Диагностика состояния перитуморального белого вещества с помощью оптической когерентной томографии

Ачкасова К.А.^{1*}, Моисеев А.А.², Яшин К.С.¹, Киселева Е.Б.¹, Бедерина Е.Л.¹, Гладкова Н.Д.¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия;

²Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, Россия;

achkasova.k@bk.ru

Введение. Оценка морфологического состояния перитуморального белого вещества и возможности дифференцировки поврежденных участков от опухоли и нормальных проводящих путей является важной научной и практической задачей. Она может значительно улучшить качество проводимых резекций опухолей головного мозга двумя способами: с одной стороны, предотвратить случайное повреждение здорового белого вещества и, с другой стороны, избежать сохранения поврежденных нежизнеспособных участков, обильно инфильтрированных опухолевыми клетками. Оптическая когерентная томография (ОКТ) является многообещающим инструментом для визуализации ткани головного мозга, и в настоящем исследовании мы

впервые показываем способность кросс-поляризационной (КП) ОКТ обнаруживать белое вещество с поврежденными миелинизированными волокнами и отделять его от здоровых проводящих путей и опухолевой ткани.

Материалы и методы. В исследование было включено 215 образцов ткани головного мозга, полученных от пациентов с различными опухолями головного мозга. Оценка полученных массивов данных ОКТ проводилась в три этапа: 1) визуальный анализ В-сканов на основе оценки трех основных параметров (интенсивность сигнала, скорость затухания сигнала, равномерность затухания); 2) количественная оценка на основе оценки коэффициентов затухания в ко- (Att(co)) и кросс-поляризациях (Att(co)) 3) построение цветокодированных en-face карт распределения значений оптических коэффициентов с последующим визуальным анализом. Для каждого исследуемого типа ткани (нормальное белое вещество/поврежденное белое вещество/опухоль) были определены характерные особенности структурных КП ОКТ-изображений и цветных карт, а затем классификационные тесты, содержащие набор из 100 КП ОКТ-изображений и два набора из 100 оптических карт в ко- и кросс-поляризациях, были предложены 8 респондентам для прохождения после предварительного обучения. Для определения диагностической способности визуальной оценки данных ОКТ различать типы изучаемых тканей рассчитывали F-показатель, позволяющий оценить точность теста при мультиклассовой классификации.

Результаты. На основании оценки трех основных параметров В-сканов можно выявить участки белого вещества с поврежденными миелинизированными волокнами и дифференцировать их от нормального белого вещества и опухолевой ткани. Использование коэффициентов затухания в ко- и кросс-поляризациях также позволяет различать все исследуемые типы мозговой ткани. Показано, что деструкция миелиновых волокон в исследуемой зоне вызывает статистически значимое снижение значений коэффициентов затухания по сравнению с нормальным белым веществом; при этом значения остаются статистически более высокими, чем у опухоли. Тем не менее, оценки одного числового значения, полученного из массива данных 3D ОКТ, может быть недостаточно, так как оно не отражает структурной неоднородности исследуемой области. В связи с этим более перспективным выглядит использование цветокодированных оптических карт, сочетающих, с одной стороны, объективность коэффициентов затухания, а с другой - наглядность визуальной оценки, что приводит к повышению диагностической точности метода, по сравнению с визуальным анализом структурных ОКТ-изображений.

Выводы. Повреждение миелинизированных волокон приводит к снижению рассеивающих свойств белого вещества, что отражается на характере регистрируемого КП ОКТ-сигнала, что можно выявить с помощью качественных и количественных подходов к анализу данных. Визуальная оценка В-сканов и оптических en-face карт позволяет дифференцировать участки поврежденного белого вещества, нормального белого вещества и опухоли друг от друга, а использование цветных карт демонстрирует более высокую диагностическую точность по сравнению со структурными изображениями (F-показатель = 0,84 и 0,79 соответственно). Дополнительное использование числовых значений оптических коэффициентов демонстрирует достоверные различия между различными типами тканей с высокой точностью ($p < 0,0001$). Таким образом, результаты исследования подтверждают перспективность использования ОКТ в качестве инструмента поиска края резекции в хирургии опухолей головного мозга.

Динамика импульсной активности определяет эффективность межмодульной связи в модульных сетях *in vitro*

Пигарева Я.И.^{1,2*}, Гладков А.А.^{1,2}, Колпаков В.Н.^{1,2}, Букатин А.С.^{3,4}, Землянсков М.С.¹, Казанцев В.Б.¹,
Пимашкин А.С.¹, Мухина И.В.^{1,2}

¹ННГУ;

²Приволжский исследовательский медицинский университет;

³Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж. И. Алфёрова Российской академии наук;

⁴Институт аналитического приборостроения Российской академии наук;
pigareva@neuro.nnov.ru

Множество работ посвящено изучению сложной организации структурных и функциональных сетей мозга, однако связь топологии и информационной обработки все еще недостаточно понятна. В последние годы было показано, что нейронные сети мозга обладают модульной организацией, которая способствует эффективной интеграции и распределению информации, устойчивости к повреждениям и быстрой адаптации. Сегрегация нейрональных культур на связанные участки (модули) приводит к формированию паттерна спонтанной активности, отвечающей свойствам модульных систем. Так, каждый из модулей обладает

собственной спонтанной пачечной активностью, и в тоже время, часть пачек распространяется от одного модуля к другому с последующей инициацией в нем ответной пачки импульсов. Микрофлюидные методы позволяют сформировать нейронные сети с контролируемым числом модулей и межмодульных связей, а совмещение их с микроэлектродными матрицами - изучать их функциональное взаимодействие с высоким пространственным и временным разрешением. Целью исследования было исследовать взаимосвязь внутримодульной активности нейрональных культур *in vitro* и эффективности межмодульного взаимодействия.

Методы исследования. Исследование выполнено на экспериментальной модели первичных культур клеток гиппокампа эмбрионов мышей линии C57BL/6. Экспериментальная модель однонаправленно связанных нейронных сетей разработана с использованием методов микрофлюидики и мягкой литографии. Культивирование клеток проводилось в двух камерах микрофлюидного чипа из полидиметилсилоксана (ПДМС), соединенных асимметричными микроканалами так, что между сетями образовывалась направленная связь от сети-Источника в сеть-Приемник. Чипы совмещались с микроэлектродными матрицами с 60 электродами (Multichannel systems, Германия). Регистрация биоэлектрической активности проводилась при помощи установки MEA2100-2x60-System-E (Multichannel systems, Германия) с частотой дискретизации 20 кГц. Детектирование импульсов и пачек импульсов проводилось с помощью разработанных ранее методов в среде Matlab [1]. Данные представлены в виде медианы и перцентилей (75 и 25).

Результаты. Показано, что спонтанная активность, наблюдаемая в модулях, может быть отнесена к двум разным типам по форме распределения таких характеристик, как частота импульсов в пачке и длительность пачки. Нейрональные сети, характеризующиеся наличием кластера “крупных” пачек обладали более высокими уровнями внутримодульной активности, а именно более длинными пачками и большим числом импульсов в пачке. Такая динамика соответствовала и большим уровням межмодульной активности, которая представляла из себя пачки, распространяющиеся из модуля Источника и вызывающие пачку в модуле Приемник. Число распространяющихся пачек составляло 23% (+16.75 -4; n = 11), если активность содержала кластер “крупных” пачек. В нейросетях с активностью без “крупных пачек”, процент таких пачек был менее 4% (+2 -12.25; n = 9; p<0.05; критерий Манна-Уитни).

Выводы. Эффективность взаимодействия модулей, выраженная через процент пачек нейронной сети модуля Источника, иницирующих пачку в модуле Приемнике, определяется не только сформированной связью, но и большей эффективностью внутримодульной активности.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-75-10154, <https://rscf.ru/project/21-75-10154/>.

Литература

1. Gladkov A., Pigareva Y., Kutyina D., Kolpakov V., Bukatin A., Mukhina I., Kazantsev V., Pimashkin, A. Design of cultured neuron networks *in vitro* with predefined connectivity using asymmetric microfluidic channels. Scientific reports. 2017, 7(1), 15625.

Еще раз о старении, стабильности и копияности митохондриальной ДНК, уровне активных форм кислорода

Колтовая Н.А.^{1*}, Христова Р.², Господинов А.²

¹Объединенный институт ядерных исследований, ул. Жолио-Кюри 6, 141980 Дубна, РФ;

²Институт молекулярной биологии БАН, ул. Акад. Георгий Бончев 21, 1113 София, Болгария;
koltovaya@jinr.ru

Дисфункция митохондрий и митохондриального (мт) генома часто является причиной не только заболеваний, но и старения. С возрастом происходит снижение общего количества митохондрий, нарушение их внутренней структуры, снижается общее количество мтДНК, накапливаются различные повреждения мтДНК. Изучение механизмов стабилизации мт генома представляет несомненный научный и практический интерес. Хорошей моделью являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, для которых даже удаление мтДНК (*rho0* мутанты) не является губительным. В своих исследованиях мы используем штаммы производные от коллекционного штамма X2180-1A (референсный дрожжевой штамм S288с также является его производным). Этот штамм характеризуется высокой частотой мт делеционных мутаций дыхательной недостаточности (*petite*, *rho-*). Генетический анализ показал, что высокая *rho--* мутабельность обусловлена одновременным присутствием не менее 5 генов, каждый из которых вызывает лишь относительно слабое повышение спонтанной *rho--* мутабельности (Devin, Koltovaya, 1987). В дальнейшем полногеномное секвенирование выявило четыре дефектные аллели генов MIP1, SAL1, CAT5 и MKT1, обуславливающих высокую мт мутабельность (Dimitrov et al., 2009). Эти гены кодируют мтДНК-полимеразу, мт АТФ/АДФ-транспортер, мт монооксидазу, участвующую в синтезе убихинона и ДНК эндонуклеазу. Мутации имеют аддитивный эффект и в сумме приводят к высокой частоте *petites*. На фоне повышенной мт мутабельности нам удалось выделить несколько ядерных мутаций *srmt*

(spontaneous rho--mutability), понижающих мутагенез и стабилизирующих мт геном (Devin et al., 1990; Koltovaya et al., 2003). При этом каждая из мутаций *sgm* супрессировала общий аддитивный эффект *mip1*, *sall*, *cat5* и *mkt1*. Три из мутаций *sgm* локализованы в генах *SRM5/CDC28-CDK1*, *SRM12/HF11-SAGA* и *SRM8/NET1* (*Sir2*), кодирующих субъединицы комплексов, отвечающих за фосфорилирование, ацетилирование и деацетилирование. Для оставшихся двух мутаций, *sgm1* и *sgm2*, проводится идентификация. Полногеномное секвенирование позволило определить предварительных кандидатов *SRM1/TOP2* (топоизомераза) и *SRM2/HUL4* (убиквитинлигаза).

Используя метод амплификации ПЦР–РТ провели анализ копийности мтДНК. Из пяти проанализированных мутантов у всех кроме одного (*sgm1*), копийность мтДНК возросла примерно в два раза. Таким образом, стабилизация мт генома произошла на фоне повышения копийности мтДНК.

Анализ хронологического старения показал, что *sgm1* не влияет на время жизни, *sgm2* повышает жизнеспособность, а *sgm5*, *sgm8* и *sgm12* снижают время жизни стационарных культур по сравнению с исходной культурой. Известно, что мутация *ada1/sgm12* ускоряет и репликативное старение (Sinclair et al., 1997). Однако удаление мтДНК (*rho0* мутации) приводило к повышению продолжительности жизни клеток *SRM*, *sgm2* и *sgm5*, но сильно снижало у клеток *sgm1*, *sgm8* и *sgm12*. Таким образом, на фоне стабилизации мт генома может происходить как ускорение хронологического старения, так и замедление. Основной причиной хронологического старения является накопление в среде продукта метаболизма дрожжей — уксусной кислоты, которая индуцирует апоптотическую гибель клеток. Действительно, при обработке перекисью, которая также индуцирует апоптоз, картинка для *rho+* клеток совпадает, однако для *rho0* мутантов расходятся, по-видимому, влияние мутаций *sgm* на старение для *rho+* и *rho0* различается.

Старение клеток сопровождается усилением образования активных форм кислорода (АФК), которые, в свою очередь, активируют апоптотический путь, приводящий к гибели клеток. Уровень АФК может оказывать влияние также на копийность мтДНК. Провели оценку влияния мутаций *sgm* на оксидативную активность штаммов с помощью жидкостной цитометрии и специализированных красителей АФК (*H2DCFDA*, *DHR123*, *DHE*). Используемые нами штаммы получили от исходного штамма *X2180-1A* мутацию *hap1*, нарушающую работу транскрипционного фактора, регулирующего кислородный ответ, а именно синтез дыхательных ферментов, гема, эргостерола и белков, участвующих в окислительном стрессе (Kwast et al., 1998). Кстати, *hap1* слабо повышает частоту *petites* (*HAP1* - 2.8%, *hap1* - 5.8%). *hap1* вызывает снижение синтеза всех цитохромов (*aa3*, *b*, *c+c1*) и накопление пигмента *Zn-порфирина*. Дисбаланс дыхания может повышать уровень АФК. У используемых *hap1* штаммов снижен синтез эргостерола и антиоксидантных ферментов, в том числе цитоплазматической каталазы *Ctt1*, супероксид дисмутазы *Sod2* и флавогемоглобина *Yhb1* что может вызывать повышение проницаемости мембран и уровень АФК. Накопление *Zn-порфирина*, максимум флуоресценции которого наблюдается при 585 и 540 нм, влияет на автофлуоресценцию. На этом сложном биохимическом фоне эксперименты показали, что *sgm2*, *sgm8* и *sgm12* понижают автофлуоресценцию. При окраске красителями максимумы флуоресценции слегка смещаются, что свидетельствует о низком уровне АФК. Однако при обработке перекисью мутант *sgm1* характеризуется более высокой концентрацией перекиси в цитоплазме и митохондриях, а *sgm5* - пониженной. На фоне *rho0* высокий уровень перекиси в митохондриях у *sgm1* и *sgm8*, и низкий уровень у *sgm2* и *sgm12*. Таким образом, на фоне повышения концентрации перекиси в клетках в результате различных механизмов наблюдается разнонаправленное действие мутаций *sgm*. Для понимания процессов, в которых участвуют гены *SRM* необходимы дополнительные исследования. В дальнейшем планируется провести анализ транскриптома клеток, синтеза каталазы и супероксид дисмутазы, длины теломера, а также напрямую тестировать с помощью флуоресцентных красителей апоптоз (*AnnexinV-FITC/PI*) и мембранный потенциал (*JC-1* и *Rh123*).

Защитное влияние закисления внутриклеточной среды в токсических клеточных моделях болезни Паркинсона

Федотова Е.И.^{1,2}, Крицкая К.А.¹, Бережнов А.В.^{1,2*}

¹ИБК РАН - ФИЦ ПНЦБИ РАН;

²ОГУ имени И.С. Тургенева;

g_56@rambler.ru

В основе болезни Паркинсона (БП) лежит селективная гибель дофаминергических нейронов в среднем мозге. Понимание причин гибели этих клеток является первым шагом к разработке средств нейропротекции и излечению или замедлению болезни, не имеющей в настоящее время эффективных способов лечения. Хотя точные механизмы повреждения нейронов остаются неясными, аномальное функционирование митохондрий, по-видимому, является конвергентной точкой в процессах гибели клеток. В качестве нарушений, сопутствующих повреждению митохондрий, рассматриваются накопление агрегатов альфа-синуклеина, окислительный стресс,

стресс ретикулума, нарушения процессов ауто/митофагии и нарушения кальциевой сигнализации. Высказаны предположения, что умеренная активация митофагии может защищать клетки от гибели в результате нарушений, связанных с БП. При этом остается открытым вопрос о способах индукции этого процесса в клетках. Ранее нами было предложено, что закисление внутриклеточной среды активировало процессы аутофагии и митофагии в клетках. В связи с этим, целью данной работы было: оценить защитный потенциал кратковременного закисления внутриклеточной среды в токсической клеточной модели болезни Паркинсона.

Эксперименты проводились методами конфокальной, флуоресцентной микроскопии и с применением ПЩР в реальном времени на токсической клеточной модели БП – культуре нейробластомы SH-SY5Y, обработанных нейротоксином MPP+.

В работе был оценен базальный уровень внутриклеточного pH в культуре нейробластомы и показано, что при обработке клеток 500 мкМ MPP+ в течение 24–48 ч внутриклеточный pH значительно не изменялся.

Было исследовано изменение уровня ауто/митофагии по степени колокализации митохондрий и лизосом, и было показано, что в MPP+-индуцированной модели этот параметр повышен по сравнению с контрольной культурой. Также увеличена экспрессия некоторых генов-маркеров митофагии.

Были оценены морфология и динамика митохондриального ретикулума (сети) в клеточных моделях БП и было выявлено увеличение количества индивидуальных митохондрий, а также уменьшение средней относительной длины митохондрий в сети в клетках, обработанных MPP+, по сравнению с контролем. Данные подтверждены анализом экспрессии генов, в результате которого увеличивается уровень мРНК генов, отвечающих за митохондриальную динамику.

Была количественно определена степень продукции митохондриальных АФК и показано, что в MPP+-индуцированной модели БП скорость продукции АФК была увеличена по сравнению с контролем.

Были выявлены различия биоэнергетического состояния клеток в токсической модели БП, а именно наблюдалось снижение митохондриального потенциала, общего пула NADH и окислительно-восстановительного индекса, уровня восстановленного глутатиона в обработанных MPP+ культурах, что свидетельствует о нарушениях, связанных с биоэнергетикой клеток.

Была оценена жизнеспособность клеток в культуре SH-SY5Y: количество мертвых клеток увеличивалось при обработке клеток MPP+ по сравнению с контролем. Исследование генов-маркеров апоптоза также выявило увеличение экспрессии.

Таким образом, в работе было показано, что в токсической MPP+-индуцированной клеточной модели уровень внутриклеточного pH не изменялся. Однако степень митофагии в таких клетках была повышена, а также увеличено количество индивидуальных митохондрий и уменьшена их относительная длина, наблюдались также: сверхпродукция АФК, нарушения состояния митохондрий (понижены митохондриальный потенциал, окислительно-восстановительный индекс NADH, уровень восстановленного глутатиона) и увеличение нежизнеспособных клеток по сравнению с контрольной культурой нейробластомы.

В работе проводилось кратковременное закисление внутриклеточной среды посредством замены внеклеточного раствора на раствор с низким значением pH (pH 6.6 в течение 60 мин), а также добавления агентов, понижающих значение внутриклеточного pH, таких как пируват натрия (10 мМ) и лактат натрия (10 мМ), на токсической клеточной модели болезни Паркинсона. Было выявлено, что закисление запускает ауто/митофагию, изменяет морфологию и динамику митохондриального ретикулума, улучшает биоэнергетическое состояние клеток, а также увеличивает уровень жизнеспособных клеток, тем самым, защищая клетки от гибели в культуре нейробластомы SH-SY5Y, обработанной нейротоксином MPP+.

Работа выполнена в рамках госзадания № 075-01512-22-03 по теме: «Нейропротекторные препараты нового поколения» № 1022080100047-5-1.6.4.

Изменение конформации белка р53, ацетилированного по лизину 320, но не по лизину 373, способствует его переходу в цитоплазму и защищает нейроны перифокальной области фототромботического инсульта

Демьяненко С.В.^{1,2*}, Бачурин С.С.², Гузенко В.В.¹

¹Южный федеральный университет;

²Ростовский государственный медицинский университет;

demyanenko Svetlana@gmail.com

Путем ацетилирования остатков лизина гистоновых и негистоновых белков происходит регуляция важнейших функций клеток, включая апоптоз. Белок р53 является ключевым регулятором апоптоза. На модели фототромботического инсульта (ФТИ) у крыс (бенгальский розовый 20 мг/кг i.v., диодный лазер 532 нм, 60 мВт/см², Ø3 мм, 30 мин) и мышей (бенгальский розовый 150 мг/кг i.p., диодный лазер 532 нм, 0,2 Вт/см², Ø1 мм,

15 мин) было показано, что ишемия вызывает увеличение уровня ацетилирования p53 по лизинам в положении 320 (аср53К320) и 373 (аср53К373). В первые сутки после ФТИ происходит почти трехкратное снижение уровня аср53К320 в ядерной фракции ткани пенумбры и повышение уровня этой формы p53 в цитоплазме. Такая тенденция сохраняется до 7 суток после ФТИ. При этом суммарное содержание аср53К320 в нейронах перифокальной области ФТИ увеличивается в эти сроки. Ацетилированный белок p53 по лизину 373 имеет преимущественно ядерную локализацию в нейронах. Значительное увеличение аср53К373 происходит в первые сутки после ФТИ.

Молекулярно-динамическая симуляция, проведенная с помощью программы Gromacs 2022.3 [<https://doi.org/10.5281/zenodo.7037337>] показала, что при ацетилировании лизина 320 конформационная устойчивость фрагмента p53 (ALA 237 – ASP 354) меняется. Основное отличие в конформациях ацетилированного от неацетилированного фрагмента p53 по лизину 320 заключается в более компактной конформации фрагмента. По всей видимости ацетильный фрагмент в данном участке позволяет сформироваться гидрофобному домену, который направляет компактизацию свободных пептидных цепей. Напротив, в неацетилированном по К320 фрагменте наблюдается хаотичное положение свободных пептидных цепей относительно структурированного домена с альфа спиралями. Вероятно, более компактная конформация p53, которую тот приобретает при ацетилировании К320 после ФТИ и позволяет белку перемещаться между ядром и цитоплазмой в нейронах перифокальной области ФТИ. Напротив, ацетилирование p53 по лизину 373 не дает каких-либо значительных изменений в конформационных предпочтениях С-концевого фрагмента p53 (SER 367–LYS 386), что может быть обусловлено его ролью в белке – связывание с регуляторными участками ферментов или других служебных белков.

Анализ методами ко-иммунопреципитации и Duolink PLA (метод близкого лигирования) показал, что ацетируют белок p53 в клетках перифокальной области после ФТИ ацетилтрансферазы PCAF и в меньшей степени p300, но не NAT1. Введение ингибитора PCAF пламбагина (1 мг/кг, i.p., 3 суток после ФТИ, 1 раз в день) снижало ацетилирование p53 по лизину 320, но не ацетилирование по лизину 373, и повышало уровень апоптоза клеток перифокальной области ФТИ. Причем эффект был более выражен при сочетанном введении ингибитора p53, способного снижать уровень p53 в цитоплазме клеток, пифитрина-α (8 мг/кг, i.p., 3 суток после ФТИ, 1 раз в день). Напротив, введение ингибитора p300 эмбелина (0,6 мг/кг, i.p., 3 суток после ФТИ, 1 раз в день) снижало уровень ацетилирования p53 по лизину 373, а также апоптоз клеток перифокальной области через 3 суток после ФТИ. Совместное введение эмбелина с ингибитором p53 пифитрином-μ (8 мг/кг, i.p., 3 суток после ФТИ, 1 раз в день), способного снижать уровень p53 в ядрах нейронов, усиливало антиапоптотический эффект ингибитора p300.

Таким образом, ацетилирование p53 по лизину 320 изменяет конформацию белка и способствует его накоплению в цитоплазме нейронов перифокальной области после ФТИ. Ацетилирование p53 по лизину 320 более предпочтительно, чем ацетилирование по лизину 373 и, вероятно, способствует выживанию и репарации нейронов пенумбры после инсульта. Стратегии, направленные на увеличение ацетилирования p53 по К320 путем увеличения активности PCAF будут перспективны для нейропротекторной терапии инсульта.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-15-00188.

Изменение фазовых и корреляционных взаимосвязей между колебаниями параметров сердечно-сосудистой системы при нагреве у больных сахарным диабетом 2 типа

Тихонова И.В.¹, Танканаг А.В.¹, Гусева И.Е.², Гриневич А.А.^{1*}

¹ИБК РАН - ФИЦ ПНЦБИ РАН;

²Больница Пуцинского научного центра Российской академии наук;

grin_aa@mail.ru

Сахарный диабет 2 типа (СД2Т) – социально значимое хроническое метаболическое заболевание, характеризующееся инсулинорезистентностью, гипергликемией, а также секреторной дисфункцией бета-клеток. Оно приводит к патологическим изменениям в сердечно-сосудистой системе (ССС), развитию ангиопатий, и как следствие, к нарушениям периферического кровообращения конечностей. Поиск новых неинвазивных методов оценки периферического кровотока является актуальной задачей как для понимания механизмов патологических изменений, так и выявления этих изменений на ранних стадиях.

Считается, что колебания в ССС отражают работу различных регуляторных механизмов, обеспечивающих ее нормальное функционирование и адаптацию к различным воздействиям. Колебания разделяют на неперекрывающиеся функциональные частотные интервалы. Для вариабельности сердечного ритма (ВСР) это высокочастотный интервал (HF, 0.15–0.4 Гц), отражающий парасимпатическую регуляцию; низкочастотный интервал (LF, 0.04–0.15 Гц), отражающий симпатическую и парасимпатическую регуляцию; и

сверхнизкочастотные (меньше 0.04 Гц). Для кожного кровотока это сердечный (С, 0.6-2 Гц), респираторный (R, 0.145-0.6 Гц), миогенный (М, 0.056-0.145 Гц), нейрогенный (N, 0.021-0.056 Гц) и эндотелиальный (Е, 0.005-0.021 Гц) интервалы. Колебания в Е, N, М интервалах характеризуют низкочастотную локальную регуляцию, а в R и С интервалах – высокочастотную центральную регуляцию. В концепции сетевой физиологии предполагается наличие взаимосвязей между различными регуляторными механизмами и, соответственно, между колебательными процессами в ССС, что подтверждается экспериментально. Мы предположили, что изменение этих взаимосвязей может отражать патологические изменения в ССС и изменения, вызванные различными воздействиями. Целью исследования были оценка и анализ изменений взаимосвязей между различными колебаниями, формирующими ВСР и динамику кожного кровотока конечностей, в покое и при локальном нагреве конечностей у больных СД2Т.

В исследовании участвовали здоровые добровольцы (контроль) и больные СД2Т. Группа контроля состояла из близких по возрасту к пациентам добровольцев с нормальным уровнем артериального давления, липидного профиля, глюкозы, гликированного гемоглобина и других биохимических показателей. Критериями исключения были курение, прием любых лекарств, кофеина или алкоголя за 12 часов до измерений. Испытуемые давали письменное согласие. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2013 г.) и было одобрено Местным этическим комитетом (№2 от 10.04.2014 г.).

Измерения проводили после 15-минутной адаптации в положении лежа на спине с температурой окружающей среды $23 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 35 мин, из которых: 15 мин в состоянии покоя (32°C), 20 мин при локальном нагреве (38°C). Одновременно регистрировали 4 сигнала: 1) электрокардиограмму для определения ВСР; 2) пневмограмму; 3) динамику кожного кровотока методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) с двух участков кожи - внешняя поверхность правого предплечья (ЛДФр) и тыльная часть правой стопы (ЛДФн), используя ЛДФ-зонды с нагревателями. Анализ сигналов (15 мин покоя и последние 15 мин нагрева) проводили в среде Matlab. Оценку взаимосвязей между регуляторными процессами проводили с помощью вычисления групповой фазовой когерентности между всеми парами сигналов, усредненной по функциональным частотным интервалам (внешние связи) и корреляции Спирмена между спектральными компонентами для каждого сигнала (внутренние связи). Дискриминационную мощность силы и количества связей определяли с помощью ROC-анализа.

При сравнении пациентов с контролем были получены следующие результаты. Сила внешних связей была ниже в LF и выше в HF интервалах как между ВСР и ЛДФр, так и между ВСР и ЛДФн в состоянии покоя и во время теплового теста. Между конечностями сила внешних связей была ниже в М-интервале и выше в С-интервале в покое и при нагреве, но по-разному проявляла себя в R-интервале: была ниже в покое и выше при нагреве. Между дыханием и другими сигналами сила внешних связей была выше в покое и во время локального нагрева, особенно сильные различия наблюдались при нагреве на стопе. Оценка внутренних связей показала, что количество значимых связей было выше в покое для ВСР и ЛДФ конечностей, а при тепловом тесте только для ЛДФ конечностей, особенно для ЛДФн. При этом сила значимых внутренних связей была ниже для ВСР в покое и для ВСР и ЛДФр при нагреве, но выше для ЛДФн в покое и при нагреве. ROC-анализ выявил, что параметры внутренних связей являлись наиболее эффективными предикторами для различения групп. При этом количество таких предикторов уменьшалось при локальном нагреве. Результаты исследования показали, что локальный нагрев с последующим анализом взаимосвязей в ССС может стать хорошим тестом для выявления ранних изменений и степени сердечно-сосудистых нарушений при СД2Т.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00215).

Изменения редокс-состояния митохондрий и белок-липидного состава клеток опухолевой и перитуморальной областей при глиомах высокой и низкой степени злокачественности

Морозова К.И.^{1*}, Попов А.В.², Денисов П.А.², Паршина Е.Ю.¹, Медяник И.А.³, Яшин К.С.³, Браже А.Р.^{1,2}, Шестопалова М.С.², Залыгин А.В.², Олейников В.А.², Семьянов А.В.², Браже Н.А.¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;

²Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН;

³Приволжский исследовательский медицинский университет;

xenia.i.morozova@gmail.com

Глиомы являются наиболее распространенными опухолями головного мозга у взрослых пациентов. Их подразделяют на четыре степени в зависимости от их злокачественности, при этом глиомы высокой степени злокачественности несут наихудший прогноз для пациента. В настоящей работе для оценки окислительно-

восстановительного состояния митохондрий и белок-липидного состава цитоплазмы клеток опухолевой и перитуморальной областей применяли микроспектроскопию комбинационного рассеяния (КР) с лазерным возбуждением 532 и 633 нм. Исследуемые препараты представляли собой срезы головного мозга толщиной 200-250 мкм, приготовленные из образцов тканей головного мозга пациента, удаленных во время операции. Все исследования были одобрены этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета на основе добровольного информированного согласия пациентов в соответствии с необходимыми этическими конвенциями. Мы продемонстрировали, что спектроскопия комбинационного рассеяния позволяет различать глиомы низкой и высокой степени злокачественности и отличать перитуморальные области от опухолевой области и нормальной коры (ткани доступа). Наши результаты указывают на увеличение относительного количества белка в опухолевых клетках при глиомах как низкой, так и высокой степени злокачественности. С помощью определенных КР-пигов показано, что относительное количество восстановленных цитохромов типов b, c и a в дыхательной цепи (электронно-транспортной цепи, ЭТЦ) повышено в клетках перитуморальной области при глиомах низкой степени злокачественности и снижено в клетках перитуморальной области при глиомах высокой степени злокачественности. Снижение относительного количества восстановленных цитохромов указывает на меньший уровень загруженности ЭТЦ электронами и может свидетельствовать об ускорении их переноса за счет образования суперкомплексов, состоящих из комплексов III и IV, в клетках перитуморальной области при глиомах высокой степени злокачественности. Редокс-состояние митохондриальной ЭТЦ также изменялось в глиомах высокой степени злокачественности по сравнению с глиомами низкой степени злокачественности. Собранный массив данных спектров комбинационного рассеяния, зарегистрированных от разных областей срезов тканей мозга пациентов, и описанные метаболические характеристики могут быть использованы для разработки инструментов ИИ для диагностики степеней и областей опухоли головного мозга. В целом микроспектроскопия КР позволяет выявить особенности метаболизма, характерные для перитуморальных областей при глиомах разной степени злокачественности.

Изменения секреторной машинерии катехоламин-продуцирующих клеток организма, развивавшегося при воздействии эндокринных дисрапторов

Обернихин С.С.^{1*}, Яглова Н.В.¹, Тимохина Е.П.¹, Яглов В.В.¹, Назимова С.В.¹

¹*НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского;*
ober@mail.ru

Секреторная машинерия катехоламин-продуцирующих клеток включает оформление секреторных гранул, внутриклеточный транспорт, депонирование и выделение продуктов как путем экзоцитоза, так и молекулярной секреции. Изменения этих процессов эндокринными дисрапторами фактически не изучено. Дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) является самым распространенным загрязнителем на планете, обладает длительным периодом полураспада и относится к эндокринным дисрапторам, нарушающим продукцию половых, минералокортикоидных, глюкокортикоидных и тиреоидных гормонов [1,2]. Было показано, что воздействие эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм вызывало значительное снижение продукции адреналина и норадреналина хромаффинными клетками мозгового вещества надпочечников крыс [3]. В данной работе изучены механизмы этих нарушений секреторной деятельности хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников в постнатальном периоде у крыс, подвергавшихся низкодозовому воздействию ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии.

Самки крыс Вистар получали раствор о,п-ДДТ 20 мкг/л («Sigma-Aldrich», США) вместо водопроводной воды с момента спаривания, во время беременности и лактации (n=10) и только в период лактации с момента родов (n=10). После окончания подсосного периода потомство самок крыс получало тот же раствор о,п-ДДТ в постнатальном развитии. В основную экспериментальную группу вошли самцы крыс (n=20), получавшие малые дозы о,п-ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах. Для дифференциации эффектов пренатального воздействия в эксперимент была включена группа самцов (n=20), подвергавшихся воздействию ДДТ только в период постнатального развития. В качестве контроля использовали потомство мужского пола (n=22) интактных самок крыс. Половину контрольных и опытных крыс выводили из эксперимента в пубертатном периоде, остальных – после достижения половой зрелости. Для исследования надпочечников использовали световую и электронную микроскопию, компьютерную морфометрию. Проводили иммуногистохимическое исследование тирозингидроксилазы и иммуноферментное определение адреналина в плазме крови.

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ с момента зачатия, в пубертатном возрасте наряду с пониженной продукцией адреналина и снижением экспрессии тирозингидроксилазы были выявлены меньшие размеры клеток и ядер, значительное уменьшение количества митохондрий и секреторных гранул, что указывало на двоякий механизм снижения продукции адреналина. После достижения половой зрелости у интактных крыс

происходило физиологическое уменьшение продукции катехоламинов надпочечниками, несмотря на увеличение размеров мозгового вещества и высокий уровень экспрессии тирозингидроксилазы. Исследование выявило снижение содержания в хромоаффиноцитах митохондрий интактных крыс, которые обеспечивают выделение секреторных гранул за пределы клетки, что является фактором, обуславливающим снижение выделения секреторных гранул из клеток. У крыс, развивавшихся при воздействии дисраптора, наблюдалось отставание в развитии мозгового вещества и снижение синтеза тирозингидроксилазы. Ультраструктурное исследование выявило меньшее количество митохондрий и деструктивные изменения в них. У крыс, подвергавшиеся воздействию ДДТ после рождения, не было задержки роста мозгового вещества и, но происходило более раннее уменьшение числа митохондрий, что приводило к скоплению секреторных гранул в цитоплазме и более выраженному снижению выделения адреналина в кровоток. В цитоплазме наблюдались признаки оводнения секреторных гранул и растворения их содержимого.

Таким образом, наряду с дисморфогенетическим механизмом эндокринный дисраптор ДДТ изменял секреторную машинерию в хромоаффинных клетках, негативно влияя на перестройку митохондриального аппарата и экзоцитоз гранул, что приводило к активации молекулярной секреции как компенсаторного механизма в ответ на снижение продукции катехоламинов. Сравнение групп с различным режимом воздействия дисраптора показало, что нарушения секреторной машинерии были обусловлены в основном постнатальным воздействием ДДТ.

Работа выполнена по госзаданию № FGFZ-2022-0035.

Литература

1. Yaglova N.V., Tsomartova D.A., Yaglov V.V. Differences in production of adrenal steroid hormones in pubertal rats exposed to low doses of the endocrine disrupter DDT during prenatal and postnatal development // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2018, Vol. 12, N. 1, P. 80–86. Doi: 10.1134/S1990750818010122
2. Calsolaro V., Pasqualetti G., Niccolai F., Caraccio N., Monzani F. Thyroid disrupting chemicals // Int. J. Mol. Sci. 2017. Vol. 18. 2583. Doi: 10.3390/ijms18122583
3. Yaglova N., Tsomartova D., Yaglov V. Effect of prenatal and postnatal exposure to low doses of DDT on catecholamine secretion in rats in different period of ontogeny // Bull. Exp. Biol. Med. 2017. Vol. 163. P. 422–424. Doi: 10.1007/s10517-017-3819-6

Изменения структурных характеристик клеток крови у пациентов с COVID-19 и сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями

Чернов Я.В.¹, Широкова О.М.^{1*}, Архипова Е.В.¹, Ковылин Р.С.^{1,2}, Макарова Е.В.^{1,3}, Любавина Н.А.¹, Мухина И.В.^{1,4}, Галова Е.А.¹

¹Приволжский медицинский исследовательский университет;

²Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева Российской академии наук, 603950, г. Нижний Новгород, ул. Троицкая, 49;

³Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Российская Федерация;

⁴Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского, 603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23;
shirokovaom@gmail.com

Патофизиологические изменения клеток крови при COVID-19 и сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваниях исследованы не достаточно. Все больше свидетельств того, что биохимические и биофизические свойства эритроцитов могут активно способствовать гиперкоагуляции при различных клинических состояниях (Soma P. et al., 2022). Однако, ультраструктурных исследований клеток крови практически нет. Целью работы было определение ультраструктурных особенностей клеток крови пациентов с COVID-19, с подтвержденной внебольничной двухсторонней вирусной пневмонией с сердечно-сосудистой патологией и без сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний с помощью сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии.

Для проведения электронной микроскопии забор образцов крови осуществлялся у пациентов мужского пола с целью исключения влияния женских половых гормонов на изучаемые параметры. В основной группе были 8 пациентов – мужчины старше 18 лет с диагнозом новая коронавирусная инфекция, обусловленная COVID-19, подтвержденная, внебольничная двухсторонняя вирусная пневмония: 5 из них с сердечно-сосудистой патологией (гипертоническая болезнь сердца и ишемическая болезнь сердца) и 3 человека без сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний. Контрольную группу составили 8 пациентов, сопоставимых по демографическим показателям и сопутствующей патологией, подобранных по принципу «head-to-head», не

болевших новой коронавирусной инфекцией COVID-19 и не вакцинированных против SARS-Cov-2, имеющих отрицательные значения анализа крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) на содержание антител анти-SARS-Cov-2 IgG. Сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия осуществлялась на микроскопах Regulus SU8100 (Hitachi) и MERLIN VP (Zeiss), Morgagni 268D (FEI). Для сканирующей электронной микроскопии оценивался цельный мазок крови, без напыления. Для просвечивающей электронной микроскопии производили фракционирование клеток с получением, трех фракций - эритроциты, тромбоциты и лейкоциты.

Исследование мазков цельной крови выявило сильную агрегацию эритроцитов пациентов с COVID-19. Клетки склеивались между собой и с тромбоцитами. Тромбоциты имели активированную форму, увеличивая агрегацию красных клеток крови. Помимо этого у эритроцитов пациентов с COVID-19, независимо от сопутствующего диагноза настолько изменялись свойства мембраны, что на поверхности оседали частицы, различного генеза (например, солевой буфер, остатки клеток, тромбоциты и т.д.). Статистически достоверных различий в ультраструктурной организации эритроцитов между группами с сердечно-сосудистой патологией и без сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний не обнаружены.

Таким образом, для установления причин повышенной агрегационной способности клеточной мембраны эритроцитов при SARS-Cov-2 необходимы дополнительные исследования.

Первичный анализ мазков крови методом сканирующей электронной микроскопии осуществлялся с использованием оборудования центра коллективного пользования «Аналитический центр ИМХ РАН» при поддержке гранта «Обеспечение развития материально-технической инфраструктуры центров коллективного пользования научным оборудованием» (Уникальный идентификатор RF-2296.61321X0017, Номер Соглашения 075-15-2021-670). Ультраструктурные исследования по просвечивающей электронной микроскопии и морфометрии выполнены в Центре корреляционной микроскопии ПИМУ, в рамках Приоритет-2030.

Изменения экспрессии белка предшественника бета-амилоида, ADAM10, BACE1 и компонентов γ -секретазного комплекса пресенилина 1 и никастрина в спинномозговых ганглиях крыс после перерезки седалищного нерва

Дзррян В.А.^{1*}, Калужная Ю.Н.¹, Батальщикова С.А.¹

¹Южный Федеральный Университет;
dzreyan2016@mail.ru

Травмы головного и спинного мозга являются одной из ведущих причин смерти и инвалидности во всем мире. Белок предшественник бета-амилоида (APP, amyloid precursor protein) интенсивно изучается с 1980-х годов из-за его центральной роли в развитии болезни Альцгеймера (AD). APP участвует в развитии, дифференцировке и функционировании нейронов, росте нейритов, формировании синапсов и долговременной памяти, поддержании целостности мозга и реакциях нейронов на повреждения. Однако конкретные биохимические и физиологические функции APP и продуктов его протеолитического расщепления до сих пор неизвестны. Накопление APP в поврежденных нейронах после повреждения периферических нервов указывает на его важную роль в патологических процессах в нервной ткани, вызванных аксотомией.

Цель работы. В этой работе мы исследовали экспрессию и локализацию APP в ганглиях дорзальных корешков (DRG) спинного мозга крысы после перерезки седалищного нерва. Мы изучили экспрессию и локализацию α -секретазы ADAM10, β -секретазы BACE1 и компонентов γ -секретазного комплекса пресенилина 1 и никастрина, участвующих в протеолизе APP в DRG крыс на ранних стадиях после аксотомии.

Материалы и методы. Моделью повреждения периферических нервов были ганглии дорзальных корешков спинного мозга крысы (DRG) после перерезки седалищного нерва. В качестве контроля выступали симметричные ганглии с неаксотомированной контралатеральной стороны того же животного. Иммуноблоттинг использовали для оценки экспрессии и внутриклеточного распределения N- и C-концевых фрагментов APP и секретаз, участвующих в его протеолизе, в клетках DRG крысы после повреждения аксонов. Через 4, 24 часа или 7 дней после перерезки проводили декапитацию и выделение 4-го и 5-го DRG с последующей пробоподготовкой и иммуноблоттингом. Для более подробной картины внутриклеточного распределения APP использовали данные электронной иммуногистохимии.

Результаты. Согласно данным иммуноблоттинга перерезка седалищного нерва способствует накоплению C-концевого фрагмента APP в аксотомированных спинномозговых ганглиях крыс. Через 4 часа после аксотомии уровень C-APP в цитоплазматической фракции ганглиев был низким. Однако через 24 часа и 7 дней после повреждения уровень C-APP значительно увеличился в цитоплазматической фракции аксотомированных ганглиев по сравнению с контрольными ганглиями. Уровень N-APP также был низким в цитоплазматической фракции через 4 часа, но не через 24 часа и 7 дней после перерезки. Через 24 часа и 7 дней после аксонального

повреждения нейронов DRG аксотомией седалищного нерва уровень N-APP значительно увеличился по сравнению с контрольными ганглиями. α -секретаза, ADAM10, в основном присутствовала в цитоплазматической фракции клеток DRG. Достаточно высокий уровень белка был отмечен как в контралатеральных ганглиях, так и в аксотомированных DRG через 4 и 24 часа после перерезки. Однако уровень ADAM10 снижился в 2 раза в цитоплазматической фракции поврежденных ганглиев по сравнению с неаксотомированными ганглиями через 7 дней после перерезки аксонов. Таким образом, аксотомия вызвала значительное снижение ADAM10 в цитоплазматической фракции спинномозговых ганглиев на 7-й день после повреждения периферического нерва по сравнению с уровнем белка через 4 и 24 часа. Электронная микроскопия показала, что C- и N-концевые фрагменты APP были связаны с плазматическими мембранами отростков нервных клеток. Наше внимание было привлечено к выраженной кластеризации APP и ADAM10, но не BACE1. Это неожиданно, поскольку BACE1 и пресенилин1 (PS1), каталитическая единица γ -секретазы, локализованы главным образом в устойчивых к детергентам мембранах (DRM) или липидных рафтах, в то время как ADAM10 локализован главным образом в нелипидных рафтовых доменах. Однако в разное время после аксотомии не было обнаружено существенной разницы в экспрессии BACE1 (экспрессия BACE1 в DRG была низкая) и компонентов γ -секретазного комплекса пресенилина 1 и никастрина.

Мы показали, что C- и N-концевые фрагменты APP обнаруживаются только в цитоплазматической фракции, но не в ядерной фракции спинномозговых ганглиев крыс. Аксотомия седалищного нерва вызывает рост как C- так и N-концевых фрагментов APP уже через 24 часа после воздействия. Высокий уровень C- и N-APP сохраняется в цитоплазматической фракции аксотомированных нейронов на 7-й день после перерезки. Аксотомия вызвала значительное снижение ADAM10 в цитоплазматической фракции на 7-й день после перерезки седалищного нерва, влияя на баланс между амилоидогенными и неамилоидогенными путями протеолиза APP.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 21-15-00188.

Изучение механизмов гибели нигростриатных дофаминергических нейронов при паркинсонизме

Кучеряну В.Г.^{1*}, Бочаров Е.В.², Воронина Н.А.¹, Голоборщев В.В.¹, Бочарова О.А.²

¹НИИ общей патологии и патофизиологии ;

²Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России; vkucheryanu@mail.ru

Болезнь Паркинсона (БП) является распространенным нейродегенеративным заболеванием, часто приводящим к развитию инвалидности. БП развивается в результате гибели дофаминергических нейронов Черной субстанции (ЧС) мозга, что приводит к резкому снижению уровня дофамина (ДА) в стриатуме. Механизмы гибели нигральных ДА-ергических нейронов при БП в настоящее время до конца не раскрыты. В эксперименте БП моделируют у мышей линии C57BL, а в некоторых случаях, крыс с помощью нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП). МФТП вводят животным системно, он легко проникает через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ). В глиальных клетках мозга с помощью фермента моноаминоксидазы Б МФТП метаболизируется до 1-метил-4-фенилпиридиния в ионной форме (МФП+), который, имея высокое сродство к дофаминовому транспортеру (DAT), переносится в ДА-ергический нейрон. МФП+ вызывает разобщение процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях за счет ингибирования комплекса I, что приводит к прекращению синтеза АТФ, дефициту энергии и гибели нигральных ДА-ергических нейронов. МФП+ не проходит через ГЭБ, поэтому для индукции паркинсонического синдрома (ПС) его вводят непосредственно в ЧС.

Состояние окислительного стресса (ОС) в стриатуме изучали на модели ПС, вызванного внутривенным введением МФТП, интракаудатным или интранигральным введением МФП+ крысам. Выраженность паркинсонических симптомов: олигокинезии, ригидности и тремора коррелировала с уровнем малонового диальдегида (МДА) в стриатуме. При развитии ПС, вызванного введением интранигральным введением МФП+ наблюдалось максимальное увеличение уровня МДА в стриатуме [1]. В крови больных с БП обнаружено повышение уровня МДА и снижение активности ферментов антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы каталазы и глутатион-S-трансферазы [2]. Полученные результаты свидетельствуют об участии ОС в механизмах гибели нигростриатных нейронов при БП.

Системное введение МФТП крысам в течение 6 дней приводило к развитию олигокинезии и ригидности. Интранигральное введение глутамата усиливало развитие МФТП-индуцированных паркинсонических симптомов - олигокинезии и ригидности у старых крыс. Глутамат усугублял ригидность у животных с МФТП-индуцированным паркинсонизмом. Мышечная ригидность развивалась у 78 % крыс, которым вводили МФТП и

у 100% животных, которым, помимо МФТП, вводили интраназально глутамат. Эти данные выявляют способность глутамата потенцировать ПС. Предварительное параллельное с МФТП введение антагониста глутаматных NMDA-рецепторов мемантина снижало степень развития олигокинезии и ригидности и предупреждало усиление паркинсонической симптоматики, вызванной введением глутамата в ЧС у крыс с МФТП-индуцированным ПС. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли глутамата в механизмах дегенерации и гибели nigrostriatalных нейронов и развитии паркинсонизма и о перспективности применения антагонистов NMDA-рецепторов для коррекции БП [3].

Было установлено, что у больных с БП post mortem в ЧС снижается уровень ростового фактора – основного фактора роста фибробластов (oФРФ) до 4 %. Интраназальное введение oФРФ в дозе 3 мкг на мышь 3 раза до и на 3 и 5 сут от начала введения МФТП снижало развитие олигокинезии, ригидности у животных. Интраназальное введение кислого фактора роста фибробластов (кФРФ) снижало выраженность олигокинезии, ригидности и тремора, а также предупреждало резкое снижение уровня дофамина и его метаболитов ГVK и ДОФУК в стриатуме. При этом показано снижение числа поврежденных nigralных нейронов до 22,1±4,5% (P<0,01) в случае введения oФРФ и до 27,6±4,1% (P<0,01) при использовании кФРФ.

Таким образом, ФРФ способны ослаблять или задерживать дегенеративный процесс, предупреждать гибель или способствовать восстановлению обратимо поврежденных нейронов в черной субстанции при паркинсонизме.

Одним из главных механизмов гибели nigrostriatalных нейронов при БП является нейровоспаление в результате активации микроглии, что приводит к усиленному выделению провоспалительных цитокинов в мозге, которые активируют фермент циклооксигеназа-2 и транскрипционный фактор NF-κB, вызывающий апоптоз ядра. При моделировании ранней клинической фазы БП, вызванной введением МФТП (12 мг/кг, 4 раза) в nigrocaudate complex мышей было обнаружено увеличение уровня провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, интерферон-гамма (Ин-γ) и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа) [4]. В крови больных с БП выявлено повышенное содержание IL-6 и ФНО-альфа [2]. Предварительное введение производного адамантана-гиммантана (20 мг/кг) или включение в комплексную терапию БП мультифитоадаптогена, обладающего нейропротекторными свойствами, приводило к снижению уровня изученных провоспалительных цитокинов [4;5].

Выяснение механизмов гибели nigrostriatalных нейронов при паркинсонизме может служить основанием для поиска эффективных нейропротекторных средств, способных остановить или снизить темпы нейродегенерации и прогрессирование болезни Паркинсона.

Список литературы

1. Кучеряну В.Г., Атаджанов М.А., Никушкин Е.В. и др. Нарушение регуляции процесса перекисного окисления липидов в стриатуме крыс при паркинсоническом синдроме. Бюл. экспер. биол. и мед. 1989, Т. 107(1):39-1.
2. Бочаров Е.В., Крыжановский Г.Н., Полещук В.В., Кучеряну В.Г. и др. Нарушение иммунной и антиоксидантной защиты при болезни Паркинсона. Патогенез, 2012(2): 11-4.
3. Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н. Влияние глутамата и антагонистов N-метил-D-аспартат-рецепторов на экспериментальный паркинсонический синдром у крыс. Бюлл. эксп. биол. и мед. 2000, Т.130(7): 20-3.
4. Кучеряну В.Г., Воронина Н.А., Бочаров Е.В. и др. Роль нейровоспаления в механизмах гибели nigrostriatalных дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона. Патогенез. 2022, Т. 20(3):100-2.
5. Бочаров Е.В., Иванова-Смоленская И.А., Полещук В.В., Кучеряну В.Г. и др. Возможности фитоадаптогена-нейропротектора при лечении нейродегенеративного заболевания (на примере болезни Паркинсона). Бюлл. экспер. биол. и мед. 2010, Т. 149(6): 619-22.

Изучение эффективности комбинированной терапии с использованием микрометровых носителей для лечения рака легких

Рогова А.С.^{1,2,3*}, Матюшевская А.О.⁴, Тимин А.С.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого;

²Национальный исследовательский университет ИТМО;

³Санкт-Петербургская Государственная Химико-фармацевтическая Академия;

⁴САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ АКАДЕМИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Ж.И. АЛФЁРОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК;

anna.aroo@mail.ru

Введение: Одним из наиболее опасных и тяжелых видов онкологических заболеваний является рак легких. Мировая статистика показывает, что среди злокачественных опухолей он ежегодно занимает лидирующее место по числу летальных исходов. Заболевание тяжело поддается лечению, а существующие методы терапии: химиотерапия, иммунотерапия и лучевая терапия - неизбежно действуют не только на пораженные, но и на здоровые ткани. Именно поэтому важно найти эффективный терапевтический метод, который сочетал бы в себе плюсы уже существующих, и, кроме того, позволил бы уменьшить воздействие на здоровые органы. Наиболее эффективными методами терапии рака легких являются химиотерапия и радиотерапия. Таким образом, целью данного исследования является изучение эффективности комбинации этих двух методов.

Материалы и методы: Мышам линии BALB/C внутривенно вводили клетки линии СТ26 в концентрации 10^5 клеток/100 мкл для получения метастаз в легких. На 7 день после прививания опухолей мышью разделили на четыре группы: (i) ПБС (0,2 мл, внутривенная инъекция), (ii) Частицы с ^{177}Lu (4 МБк, 0,2 мл, внутривенная инъекция), (iii) Цисплатин (4 мг/кг внутривенная инъекция), (iv) Частицы с ^{177}Lu (4 МБк, 0,2 мл, внутривенная инъекция) + Цисплатин (4 мг/кг внутривенная инъекция). Спустя 21 день терапии мышью умерщвляли и собирали ткани легких и основные органы для гистологических исследований. Также был выполнен визуальный подсчет метастатических узлов в легких. Кроме того, был проведен тест на оценку выживаемости.

Результаты: По результатам гистологических исследований и визуального изучения тканей легких мышью с опухолями СТ26, был выявлен значительный положительный эффект комбинированной терапии в сравнении с монотерапией. Мыши, получавшие комбинацию Частиц ^{177}Lu и Цисплатина, демонстрировали значительное уменьшение метастатических узлов, а также более длительную выживаемость (80%, 27-й день) по сравнению с мышью, которые получали монотерапию (50-60%, 27-й день) или контрольными животными (0%, 27-й день).

Выводы: Таким образом, микрометровые частицы с ^{177}Lu продемонстрировали свою эффективность в комбинированном применении радио и химиотерапии для лечения метастазов в легких.

Работа была выполнена при поддержке государственного задания (FSEG-2022-0012).

Интенсивность продукции NO и сократимость миокарда крыс при гипокинезии

Зарипова Р.И.^{1*}, Сунгатуллина М.И.¹, Дикопольская Н.Б.¹, Зиятдинова Н.И.¹, Зефиоров Т.Л.¹,
Гайнутдинов Х.Л.^{1,2}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

²Казанский физико-технический институт – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН;

ratno1992@mail.ru

Дефицит движений в жизнедеятельности человека - важная медико-социальная проблема, вызванная образом жизни, профессиональной деятельностью, длительным постельным режимом и т.д. Происходит уменьшение нагрузки на мышечный аппарат, что приводит к изменениям функциональных и морфологических изменений до патологических состояний в зависимости от продолжительности и степени гипокинезии.

Оксид азота (NO) – важный биологический медиатор, вовлеченный во множество физиологических и патофизиологических процессов. NO-синтазная система широко представлена в разных структурах сердца. NO способен оказывать как активирующее, так и ингибирующее действие на различные метаболические процессы, протекающие в организме млекопитающих и человека. Показано также, что система NO играет важную роль при адаптации организма к различным изменениям внешней среды и внешних условий, например, при значительных

физических нагрузках. Длительное ограничение двигательной активности вызывает изменения сократительной функции и ослабление мышцы сердца, а также ослабление венозных и артериальных сосудов.

Было проведено ЭПР исследование интенсивности продукции оксида азота (NO) при моделировании дефицита движений у крыс путем анализа количества NO - содержащих парамагнитных комплексов в тканях сердца. Также было проведено исследование силы сокращения изолированного сердца крыс по Лангендорфу. Экспериментальные животные находились в условиях дефицита движений, начиная с 3- недельного возраста: первые два дня время гипокинезии составляло 1 час, а в дальнейшем увеличилось на 2 часа через каждые 2 дня. К 25 дню гипокинезии время пребывания животных в клетках-пеналах достигло 23 часов, и оставалась постоянным до конца эксперимента.

Количество NO оценивалось по интенсивности характерного сигнала ЭПР, принадлежащего комплексу (ДЭТК) $2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$. Сократимую (или инотропную) функцию сердца оценивали по показателю давления, развиваемого левым желудочком на установке Лангендорфа PowerLab 8/35 (ADInstruments, Австралия) при помощи программы LabChart Pro (Австралия).

Установлено, что нахождении крыс в условиях дефицита движений в течении 2-х месяцев приводит к увеличению содержания NO в тканях сердца в 2 раза. При дефиците движений было зафиксировано уменьшение силы сокращения сердца, что возможно связано с изменением уровня NO. Так как избыточное образование NO может значительно снижать тонус гладкомышечных клеток, ухудшать функцию эндотелия и непосредственно подавлять сократительную способность миокарда.

Использование псевдотриглицеридного подхода в синтезе новых липофильных производных 3'-азидо-3'-дезокситимидина и 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина

Дарнотук Е.С.^{1*}, Войтик К.Д.¹, Шастина Н.С.¹
¹МИРЭА - Российский Технологический Университет;
Mslizirichi@yandex.ru

На данный момент для лечения ВИЧ-инфекции применяется высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ), в основе которой лежит применение классических препаратов – нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ), проявляющих высокую эффективность в подавлении репликации ВИЧ и препятствующих дальнейшему прогрессированию заболевания. Известно, что основными недостатками большинства применяемых препаратов является высокая токсичность и низкая биодоступность [1-2]. Все это негативно сказывается при продолжительном приеме препаратов, приводя к серьезным побочным эффектам и возникновению резистентных вирусных штаммов. Таким образом, снижение эффективности анти-ВИЧ-терапии, делает необходимой и важной задачей модификацию ингибиторов обратной транскриптазы, что позволит устранить большинство ограничений данных препаратов.

Поэтому чрезвычайно актуальным является применение многоцелевого пролекарственного подхода, позволяющего разработать препараты с улучшенными характеристиками, что сведет к минимуму вышеперечисленные недостатки. Пролекарственный подход, включающий в себя использование веществ липидной природы, в частности 1,3-диацилглицеринов, способствует тому, что нуклеозидный препарат будет включаться в метаболизм липидов и тем самым направленно достигать лимфатической системы (резервуара ВИЧ), всасываясь вместе с жирами в тонком кишечнике, таким образом, обходя первичную деградацию в печени [3].

Поэтому целью данной работы является получение и исследование свойств конъюгатов 3'-азидо-3'-дезокситимидина (AZT) и 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина (ЗТС) и производных 1,3-дипальмитоилглицерина, модифицированных по фосфорному центру эфирами L-аланина.

По известным методикам [4] были получены глицеролипидные производные 3'-азидо-3'-дезокситимидина и 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина, в которых связывание молекулярных фрагментов осуществлялось с помощью функциональных фосфорных связей. Известно, что амидофосфатные производные нуклеозидных препаратов представляют больший интерес, так как многие из них проявляют высокую противовирусную активность и повышенную устойчивость к химическому и ферментативному гидролизу. С целью повышения стабильности полученных конъюгатов AZT и ЗТС к действию гидролиза в различных биологических средах, а также модулирования ингибирующей активности таких соединений осуществляли разработку их амидофосфатных производных с эфирами аминокислот [5].

Были проведены исследования кинетики гидролиза полученных соединений в различных буферных растворах, моделирующих рН физиологических сред. Было обнаружено, что время половинного гидролиза данных веществ более 20 ч. При изучении ферментативного гидролиза данных пролекарств *in vitro* под

действием панкреатической липазы свиньи время половинного гидролиза составило 0.5 мин. Это может позволить имитировать природные аналоги таких глицеролипидных соединений.

Исследование цитотоксичности соединений на клеточной линии МТ-4 показало, что большинство конъюгатов являются малотоксичными (CC50 >100 мкМ). Результаты определения антивирусной активности соединений в инфицированных ВИЧ-1 клетках МТ-4 свидетельствуют о том, что среди конъюгатов AZT наиболее активным оказалось производное, содержащее остаток этилового эфира L-аланина (EC50 0.012 мкМ). В ряду производных ЗТС наибольшую ингибирующую активность проявило соединение, содержащее трет-бутиловый эфир L-аланина (EC50 25.46 мкМ).

Изучение биологической активности полученных глицеролипидных производных AZT и ЗТС показало, что часть соединений имеет преимущества (низкая токсичность, высокий уровень анти-ВИЧ-активности) по сравнению с исходными нуклеозидами, что делает возможным использование данных пролекарств с целью расширения арсенала препаратов, входящих в схемы антиретровирусной терапии.

Литература

1. Lakshmi N.R., Appakkudal Anand R. Targeting strategies for delivery of anti-HIV drug//J. Controlled Release.2014. V.192. p.271–283
2. Gu S., Zhu Y., Wang C., Wang H., Liu G., Cao S., Huang L. Recent discoveries in HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Curr. Opin. Pharmacol. 2020. V. 54. P. 166-172
3. Lambert D.M. Rationale and applications of lipids as prodrug carriers. // Eur. J. Pharm. Sci. –2000. –V. 11 (Suppl. 2), –P. S15–S27.
4. Shastina N.S., Maltseva T. Yu., D'yakova L.N., et al. Synthesis, properties, and anti-HIV activity of new lipophilic 3'-azido-3'-deoxythymidine conjugates containing functional phosphoric linkages. // Russ. J. Bioorg. Chem. – 2013. –V. 39, № 2. –P. 161-169 (in Russ.).
5. Darnotuk E.S., Siniavin A.E., Shulga N.V., et al. Phosphoramidate conjugates of 3'-azido-3'-deoxythymidine glycerolipid derivatives and amino acid esters: synthesis and anti-HIV activity. // Med.Chem.Res. –2021. –V. 30, –P. 664-671.

Исследование биодоступности новых наноэмульсий модифицированных куркумином и наночастицами диоксида церия

Широких А.Д.¹, Замятина Е.А.², Аникина В.А.², Мищенко Е.В.¹, Королева М.Ю.¹, Попова Н.Р.^{2*}

¹Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева;

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;

nellipopovaran@gmail.com

Повышение биодоступности ряда активных соединений органической и неорганической природы является актуальной задачей современной биомедицины. Известно, что некоторые перспективные для биомедицинского применения соединения имеют плохую растворимость в воде, что потенциально ограничивает их использование. Одним из таких соединений является куркумин, который обладает противовоспалительной, антиоксидантной, противомикробной, ранозаживляющей, противораковой активностями. Кроме того, показано, что в определенных условиях куркумин может проявлять цитотоксичность по отношению к нормальным клеткам, индуцируя окислительный стресс. Однако, было установлено, что при получении комплекса куркумин с нанокристаллическим диоксидом церия, последний нивелировал токсичность куркумина по отношению к нормальным клеткам, благодаря инактивации активных форм кислорода, но сохранял свое терапевтическое действие относительно раковых клеток. Нанокристаллический диоксид церия обладает уникальными физико-химическими свойствами и является неорганическим антиоксидантом, который способен выполнять функцию некоторых оксидоредуктаз: каталазы, супероксиддисмутазы, оксидазы и фосфатазы. Известно, что наночерий способен усиливать антибактериальные, антиоксидантные и ранозаживляющие свойства наноэмульгеля с куркумином при заживлении ран. Таким образом, одной из важных задач является разработка эффективных форм куркумина и его комплексов с целью повышения их биодоступности и терапевтического эффекта для медицинского применения. Для достижения этой задачи могут быть использованы наноэмульсии (НЭ), применяемые в качестве систем-носителей для инкапсуляции активных компонентов, увеличения их биодоступности без потери их активности. В данной работе были получены новые наноэмульсии на основе углеводородного масла, модифицированные куркумином и наночастицами диоксида церия, исследовали ее свойства и токсические эффекты в системах *in vitro* и *in vivo*.

При синтезе НЭ, для их стабилизации использовали смесь неионогенных ПАВ - Tween 60 и Span 60. Анализ размеров капель дисперсной фазы наноэмульсий и частиц CeO₂ производили методом динамического светорассеяния (Zeta SizerNano, Malvern). Средний диаметр капель наноэмульсии составлял 60±10 нм. При инкорпорировании 4 мас.% куркумина размер первичных капель оставался неизменным, однако, наблюдалось

присутствие агрегатов 210 ± 30 нм. Частицы CeO_2 (20 ± 5 нм), включаемые в состав наноэмульсий как без, так и с куркумином, приводили к образованию более крупных агрегатов - 1500 ± 200 нм, при этом средний диаметр первичных капель так же оставался неизменным. Однако в наноэмульсиях с куркумином наблюдалось более широкое распределение по размерам. Далее было проведено комплексное исследование токсичности 4 видов полученных наноэмульсий (1 - NE; 2 - NE+CNP; 3 - NE+curcumin; 4 - NE+curcumin+CNP) *in vitro* на мышинных эмбриональных фибробластах (MEF) по определению дегидрогеназной активности методом МТТ и соотношению количества живых и мертвых клеток (окрашивание флуоресцентными красителями Hoechst 33342 и пропидиум йодид). Установлено, что метаболическая активность мышинных эмбриональных фибробластов (MEF) при инкубации со всеми исследуемыми НЭ в концентрации 1% от 24 до 72 ч достоверно снижается на 40-90% относительно контрольной группы. Метаболическая активность MEF при инкубации с НЭ в концентрации 0,0001% от 24 до 72 ч достоверно не отличается от контроля. В группе NE+CNP к 72ч метаболическая активность MEF возрастает на 30% относительно контроля, тогда как в группе NE+curcumin к 72ч отмечается снижение метаболической активности на 15% относительно контроля. Данный эффект может быть связан с тем, что куркумин мог частично сегрегировать на поверхности масляных капель в НЭ. Было проведено исследование острой токсичности всех полученных наноэмульсий *in vivo*. Эксперименты были проведены с использованием 8-9 нед белых беспородных самцов мышей SHK (30-35 г). Содержание животных осуществлялось в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского союза по защите животных. Установлено, что после однократного внутривентриального введения НЭ в дозе 860 мг/кг во всех группах экспериментальных животных гибель животных в течение 14 дней эксперимента не наблюдалась. Дисперсионной средой выступал физиологический раствор (раствор NaCl с концентрацией 0,9 мас.%. Кроме того, токсическое действие НЭ оценивали по общему состоянию животных и их выживаемости. Подсчет выживших и погибших животных проводили в течение 14 дней после введения НЭ с последующим наблюдением за выжившими животными в течение двух недель после внутривентриального введения. Первые 6 ч животные находились под непрерывным наблюдением. В течение всего периода наблюдения животные чувствовали себя нормально. В течение 14 дней наблюдения за животными заметных отклонений в двигательной активности не выявлено; наличие судорог; координация движений, состояние кожи, волос и цвет видимых слизистых оболочек; потребление воды и пищи; вес тела. Таким образом, полученные в рамках данного исследования наноэмульсии не проявляют токсичность в отношении эмбриональных фибробластов мыши *in vitro* и после однократного внутривентриального введения мышам *in vivo*. Полученные данные демонстрируют возможность использования наноэмульсий, содержащих наночастицы куркумина и диоксида церия, в передовых биомедицинских применениях.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект №22-63-00082).

Исследование влияния клобетазола на проведение возбуждения, изменение содержания белков и фактора роста нервов в поврежденных нервных проводниках

Кузьменко Т.П.^{1*}, Ревин В.В.¹, Парчайкина М.В.¹, Ревина Э.С.¹, Качанова К.В.¹, Крыгина М.А.¹

¹Факультет биотехнологии и биологии МГУ им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия;
zyuzina-tatjana@mail.ru

В настоящее время одной из важнейших проблем в области современной регенеративной медицины является проблема восстановления функционирования поврежденных соматических нервов. Патологии периферической нервной системы составляют значительную долю в структуре заболеваемости взрослого населения, поскольку степень восстановления функций нервов остается низкой, а сроки лечения – длительными. В последние годы наиболее актуальными способами эффективного протекания регенерационных процессов являются наложение кондуитов [1], экзогенное введение физиологически активных веществ [2], электрическая стимуляция [3], а также их сочетание [4]. Тем не менее, несмотря на многочисленные исследования, до сих пор ведется поиск наиболее оптимальных способов стимуляции регенерационных процессов, а также изучение факторов, сводящих к минимуму дегенерационные процессы в нервном проводнике после его повреждения. В связи с этим, особый интерес представляют глюкокортикоиды, в частности, клобетазол, одним из побочных действий которого является способность стимулировать регенерационные процессы в поврежденной нервной ткани [5]. В последнее время все большее внимание уделяется факторам роста нервной ткани (ФРН), регулирующим выживаемость симпатических и чувствительных нейронов периферической нервной системы [6]. Однако остается недостаточно изученной роль клобетазола в запуске сигнальных путей с участием ФРН, отвечающих за выживание и восстановление физиологических функций нервного волокна.

Объектом исследования служили седалищные нервы крыс линии Wistar. У животных 1-й опытной группы проводили перерезку седалищного нерва, 2-й группе – после перерезки седалищного нерва внутримышечно

ежедневно вводили клобетазол в концентрации 0,5 мг/кг, 3-я группа – служила контролем. Биоэлектрическую активность регистрировали для изолированного нерва при его внеклеточном отведении со следующими параметрами стимуляции: амплитуда 1,5 В, длительность 0,3 мс, частота раздражения 100 имп/с. Количественную оценку содержания общего белка проводили по методу Лоури [7]. Количественную оценку молекул NGF проводили методом ELISA с использованием специальных коммерческих наборов (Cloud-Clone Corp., КНР).

После травмы нервного проводника наблюдается дегенерация нервных волокон на небольшом протяжении проксимального и на всем протяжении его дистального отрезка. Подобные процессы связаны с нарушением центральной иннервации, благодаря которой осуществляется четкая регуляция и контроль над функциональным состоянием соматических нервов. Исходя из этого, для оценки восстановления функциональной активности поврежденных нервных волокон, нами был измерен потенциал действия в проксимальном участке исследуемых нервов.

Механическая травма седалищного нерва крысы, вызванная его перерезкой, приводит к уменьшению амплитуды потенциала действия к 7 суткам эксперимента и частичному восстановлению проводимости к 14-м суткам после повреждения. Введение клобетазола в концентрации 0,5 мг/кг сопровождается существенным увеличением амплитуды потенциала действия к 14-м суткам наблюдения по сравнению с повреждением.

Полученные данные согласуются с изменением белкового состава нерва после травмы. Так, в первые семь суток после повреждения в процессе дегенерации происходит усиленный распад белковой фракции нервного проводника, в частности, в проксимальном отделе содержание белков снижается в среднем в 0,3 раза, а в дистальном в 2,0 раза по сравнению с контролем. Однако, с увеличением эксперимента до 30 суток в результате активации регенерационных процессов в проксимальном отделе нерва усиливается синтез необходимых для восстановления его структуры белков, уровень которых практически достигает контрольных значений.

Введение клобетазола в концентрации 0,5 мг/кг приводит к снижению скорости распада белков в проксимальном отделе нерва в процессе его дегенерации. Вероятнее всего, за счет механизма действия клобетазола через глюкокортикоидные рецепторы [5] происходит усиление синтеза структурных белков нерва, а именно, нейрофиламентов- Н, М, L и тубулина.

Кроме этого, недавние исследования показали, что клобетазол активирует экспрессию NT-3 и BDNF в олигодендроцитах, тем самым способствуя их дифференцировке и пролиферации [8]. Исходя из этого, на следующем этапе было изучено изменение содержания фактора роста нервов при повреждении соматических нервов и на фоне введения препарата. Было показано, что использование клобетазола при травме периферических нервов сопровождается усилением экспрессии NGF. Так, на 30 сутки наблюдения его уровень возрастает в среднем в 1,7 раза в проксимальном отделе нерва и в 3,8 раза в его дистальном отрезке по сравнению с контролем.

Таким образом, клобетазол в концентрации 0,5 мг/кг способствует восстановлению проведения потенциала действия в поврежденном нервном проводнике и менее выраженному распаду белковой фракции нервных волокон. Усиленный синтез фактора роста нервов на фоне введения клобетазола указывает на его участие в запуске регенерационных сигнальных путей, отвечающих за восстановление структурной целостности и функциональной активности нервных волокон после травмы.

1. B. E. Fornasari, G. Carta, G. Gambarotta and S. Raimondo, *Front Bioeng Biotechnol.* 8, 554257 (2020).
2. V. V. Revin, S. I. Pinyaev, M. V. Parchaykina, et al., *Front. Physiol.* 10, 384 (2019).
3. X.-L. Chu, X.-Z. Song, Q. Li, et al., *Neural Regen Res.* 17 (10), 2185 (2022).
4. Sh. Song, K. W. McConnell, D. Amores, et al., *Biomaterials* 275, 120982 (2021).
5. А. Н. Хлебникова, *Vestn Dermatol Venerol* 5, 124 (2010).
6. L. M. Rafieva and E. V. Gasanov, *Curr Protein Pept Sci.* 17, 298 (2016).
7. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and et al. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
8. W. Shi, Sh. Bi, Ya. Dai, et al., *Exp Ther Med.* 18 (2), 1258 (2019).

Исследование влияния плазменной обработки на морфологию биомедицинских полилактидных матриц и адгезию нейрональных клеток

Михуткин А.А.^{1*}, Азиева А.М.¹, Ястремский Е.В.², Пацаев Т.Д.¹, Кириллова Д.А.¹, Шариков Р.В.¹, Шарикова Н.А.¹, Антипова К.Г.¹, Григорьев Т.Е.¹, Васильев А.Л.^{1,2}

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»;

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН;
Alex.Mikhutkin@gmail.com

Адгезивные свойства внеклеточных матрицков, преимущественно зависящие от химических и структурных особенностей их поверхности, играют важную роль в тканевой инженерии, а морфология и структура поверхности матрицков являются определяющей для роста и развития клеток. Разработка искусственных внеклеточных матрицков из биополимерных материалов с оптимальными характеристиками для процессов клеточной адгезии имеет большое значение для регенеративной медицины.

Первичные нейрональные культуры используются не только для фундаментальных исследований, но также для разработки методов лечения неврологических патологий и травм, а регенерация нервной ткани по-прежнему остается серьезной проблемой для медицины. Имплантация, адгезия и рост культуры нейронов требует подходящих матрицков. На сегодняшний день одним из наиболее перспективных для имплантатов синтетическим полимером является полилактид (ПЛА), обладающий хорошей биосовместимостью даже несмотря на гидрофобную природу соединения. В качестве искусственных матрицков могут применяться различные типы биополимерных материалов – пленки, губки и нетканые волокнистые материалы. Для оптимизации микроструктуры поверхности матрицков в целях улучшения гидрофильности поверхности и взаимодействия с клетками предлагается обработка образцов низкоэнергетичной плазмой в воздушной смеси.

В настоящей работе исследовалось влияние плазменной обработки полилактидных матрицков различных типов – пленок, губок и нетканых волокнистых материалов – на их морфологию, гидрофильность поверхности и адгезию культивированных на них нейрональных клеток новорожденных мышей. Образцы полимерных материалов обрабатывались плазмой (продолжительность обработки 30 и 60 минут) и сравнивались с контрольными (необработанными) образцами. Определение морфологических особенностей матрицков проводилось методами растровой электронной микроскопии (РЭМ). Полученные в ходе исследования РЭМ-изображения позволили увидеть эволюцию морфологии полимерных матрицков вследствие плазменной обработки (образование поверхностного рельефа), однако для численной оценки данных изменений потребовалось применить специальный метод трехмерной реконструкции поверхности по двум изображениям с РЭМ (стереопаре) на базе стереофотограмметрического подхода [1]. В результате были получены полноценные трехмерные модели поверхностей образцов, что позволило подсчитать ряд количественных характеристик, характеризующих изменение рельефа (шероховатости) и реальной площади поверхности при ее модификации плазмой, и сравнить их для модифицированных и контрольных образцов [2]. Для подтверждения результатов проводились также измерения удельной площади поверхности методом БЭТ (метод Брунауэра, Эммета и Теллера [3]). Кроме этого, методом РЭМ в условиях естественной среды исследована смачиваемость поверхности после модификации плазмой. Общая трехмерная морфология матрицков исследовалась методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии [4,5].

В работе представлены результаты исследования адгезии культуры клеток первичных нейронов мыши на различных матрицках из ПЛА, а именно, ориентированных и неориентированных нетканых и губчатых матрицках до и после обработки плазмой. С помощью флуоресцентной и растровой электронной микроскопии в режиме естественной среды была исследована адгезия клеток диссоциированной нейрональной культуры на изотропных и анизотропных нетканых и губчатых матрицках из ПЛА.

В результате выявлено, что обработка плазмой ведет к образованию рельефа на поверхностях всех рассматриваемых типов матрицков, заметно увеличивая шероховатость, причем параметрами модификации поверхности возможно управлять, изменяя время воздействия плазмы на образцы, а также улучшает их гидрофильность. Нейроны, полученные из головного мозга новорожденных мышей, демонстрировали улучшенную адгезию на матрицках всех типов после обработки плазмой, при этом наиболее выраженный эффект наблюдался на неориентированных матрицках. Таким образом, показано, что изменение морфологии поверхности и гидрофильности полимерных матрицков позволяет повысить клеточную адгезию культур нейронов.

Работа была проведена при финансовой поддержке РФФ (грант № 21-13-00321 “Деформационное поведение биоразлагаемых матрицков различного типа при механических нагрузках”).

1. Михуткин А.А. и др. Трехмерная реконструкция поверхности по изображениям, полученным в растровом электронном микроскопе // Кристаллография. 2014. Т. 59. С. 999.

2. Ястремский Е.В. и др. Модификация поверхности биомедицинских матрицков плазменной обработкой // Кристаллография. 2022. Т. 67. С. 451.

3. Брунауэр С. Адсорбция газов и паров. Издательский дом «Кристалл», Москва. 1948.

4. Mikhutkin A.A. et al. Towards Tissue Engineering: 3D Study of Polyamide-6 Scaffolds // BioNanoScience. 2018. Vol. 8. P. 511.

5. Tenchurin T.K. et al. The Performance of Nonwoven PLLA Scaffolds of Different Thickness for Stem Cells Seeding and Implantation // Polymers. 2022. Vol. 14. P. 4352.

Исследование влияния покрытия ЦТАБ на физико-химические свойства наночастиц магнетита

Шилова Е.В.^{1*}, Колтаков И.А.¹, Корчагина Е.Е.¹, Артюхов В.Г.¹

¹Воронежский государственный университет;

zinkovac@list.ru

На сегодняшний день использование магнитных наночастиц (МНЧ) в различных областях медицины представляет большой интерес. В качестве магнитоуправляемых компонентов наносистем предпочтение отдается частицам магнетита, что связано с его выраженными магнитными свойствами, а также более низкой токсичностью в сравнении с железом, кобальтом и никелем. Однако для нахождения наночастиц в таких сложных организменных средах, как кровь, тканевая жидкость, лимфа, очень важным свойством является их агрегативная стабильность. Для предотвращения агрегации и флокуляции магнетита производится модификация его поверхности различными стабилизирующими агентами [4]: покрытие позволяет увеличить время циркуляции в кровотоке. Примером такого рода поверхностно-активного вещества-стабилизатора является катионный сурфактант цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) [2].

В данной работе была поставлена задача исследовать влияние покрытия ЦТАБ на физико-химические свойства наночастиц магнетита.

Методика эксперимента. Магнетит получали методом соосаждения. Для приготовления наночастиц магнетита использовали смесь солей 2-х и 3-х валентного железа с общей концентрацией 30 ммоль, в стехиометрическом соотношении 1:2. В качестве осаждающего агента использовали 1%-ный раствор аммиака. Полученные частицы магнетита 2 раза промывали дистиллированной водой путём помещения в магнитное поле. К полученному ранее магнетиту добавляли 0.03% раствор ЦТАБ, перемешивали в течение 5 минут на мини-центрифуге-вортексе Microspin. Затем убирали надосадочную жидкость и промывали полученный осадок дистиллированной водой. Полученный магнетит высушивали в лиофильной сушилке FreeZone Triad (Labconco).

Контроль состава полученного магнетита осуществляли при помощи рентгеновского дифрактометра ARL X'TRA (Thermo Scientific). Для оценки качественного состава синтезируемого магнетита были зарегистрированы рентгенограммы наночастиц.

Измерение ζ -потенциала наночастиц до и после добавления ЦТАБ осуществляли с помощью метода электрофоретического рассеяния света. Использовали анализатор Zetasizer NanoZSP (Malvern Instruments).

Для получения раствора гемоглобина применяли метод D.Drabkin [1]. В работе использовали раствор гемоглобина в концентрации 10-5 моль/л. Гемоглобин инкубировали с наночастицами (1 мг нч на 1 мл раствора гемоглобина) в течение 30 минут и 1 часа. Затем осаждали МНЧ центрифугированием (8000 об/мин, 10 мин) на центрифуге MiniSpin.

Измерение размера молекул гемоглобина осуществляли с помощью метода динамического рассеяния света на анализаторе Zetasizer NanoZSP (Malvern Instruments).

Результаты и обсуждение. Для оценки качественного состава синтезируемых наночастиц магнетита были зарегистрированы рентгенограммы наночастиц. [3] Обнаруженные на рентгенограммах пики $2\theta = 18; 30,20; 35,53; 43,1; 57,1$; соответствуют показателям стандартного образца магнетита Fe₃O₄.

Для подтверждения сорбции молекул ЦТАБ были проведены исследования ζ -потенциала МНЧ до и после добавления ЦТАБ. Синтезированные наночастицы магнетита имели ζ -потенциал, равный: $-15,10 \pm 4,51$ мВ. После покрытия молекулами ЦТАБ значение ζ -потенциала составило: $13,6 \pm 3,99$ мВ. Значения полученного ζ -потенциала позволяют предположить, что вначале на основе кулоновских взаимодействий происходит сорбция единичных молекул ЦТАБ на поверхности магнетита с формированием предельно насыщенного монослоя из молекул ЦТАБ, гидрофобные “хвосты” которых обращены наружу. С увеличением концентрации ЦТАБ за счет гидрофобных взаимодействий происходит наращивание второго слоя (образование адмицелл), где наружу обращены положительно заряженные группы ЦТАБ.

Для оценки возможности практического применения синтезированных наночастиц были проведены исследования их взаимодействия с главным транспортным белком крови – гемоглобином. Было установлено, что после 30-минутной инкубации гидродинамический диаметр контрольного образца гемоглобина составил $5,01 \pm 0,42$ нм, а модифицированного МНЧ и МНЧ-ЦТАБ- $5,44 \pm 0,40$ и $7,23 \pm 0,33$ нм соответственно. По истечении 1 часа гидродинамический диаметр составил $8,03 \pm 1,08$ нм (после воздействия МНЧ) и $73, 99 \pm 4,41$ нм (после воздействия МНЧ-ЦТАБ).

Полученные данные о структуре, свойствах и взаимодействии с белками наночастиц магнетита открывают перспективы для дальнейшего изучения возможности их практического применения. Из полученных данных вытекает необходимость разработки методов защиты белков крови от действия наночастиц магнетита.

Результаты исследований были частично получены на оборудовании ЦКП НО ВГУ

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. Артюхов В.Г. Практикум по биофизике / В.Г. Артюхов [и др.] — Воронеж: Изд-во ВГУ, 2016. — 314 с.

2. Спиридонов А. М. Адсорбция цетилтриметиламмоний бромида на поверхности цеолита / А. М. Спиридонов, Е. В. Апросимова, В. И. Заболоцкий, В. И. Федосеева, М. Д. Соколова, А. А. Охлопкова // Журнал физической химии. – 2019. – Т. 93. – №. 5. – С. 722-729.

3. Шилова Е.В. Включение наночастиц магнетита, стабилизированных цетилтриметиламмония бромидом, в состав липосом на основе соевого лецитина / Е.В. Шилова, И.А. Колтаков, С.В. Канькин, В.Г. Артюхов // Биофизика. – №1. – 2022. – С. 549-554

4. Caruso F. Nanoengineering of particle surfaces //Advanced materials. – 2001. – V. 13. – №. 1. – P. 11-22.

Исследование действия веществ фенольной природы при влиянии окислительного стресса на нервное волокно

Сюсин И.В.^{1*}, Конусова Д.А.¹, Карпова М.В.¹, Пияев С.И.¹, Ревин В.В.¹

¹ФГБОУ ВО "МГУ им. Н.П. Огарёва";

ilya.sysin@gmail.com

Нарушение проводимости нервного импульса может служить причиной нарушения функционирования организма и его гибели. Нарушение правильной работы нервных проводников может наблюдаться при развитии в организме нейродегенеративных заболеваний, при которых гибель нервных клеток прогрессирует и постепенно наступает атрофия соответствующих тканей, при этом наступают сильные когнитивные нарушения.

К основным факторам, приводящим к нейродегенерации, относятся окислительный стресс, нарушение трофической функции в нервной ткани, недостаточное её кровоснабжение, избыточное высвобождение глутамата и провоспалительных факторов.

В настоящее время основными методами, направленными на регенерацию нерва, относятся хирургическое вмешательство и применение стволовых клеток. Но их эффективность остается низкой. Ведутся поиски новых терапевтических средств для восстановления функций нервного волокна. Такие средства должны решать такие задачи, как повышение экспрессии факторов роста, активации сигнальных путей, способствующих пролиферации, снижение окислительного стресса и уровня провоспалительных цитокинов, а также улучшение нейроваскулярных процессов. И с такими задачами успешно справляются соединения, выделяемые из растительных источников: алкалоиды и флавоноиды. Поэтому растения становятся объектом фармакологических исследований для поиска новых терапевтических средств.

В связи с выше сказанным, целью работы являлось изучение действия кверцетина на процессы окислительного стресса в периферических нервах.

В качестве объекта исследования были использованы седалищные нервы, выделенные из крыс линии Wistar (200±20 г). Окислительный стресс инициировали с помощью пероксида водорода в концентрации 20 мМоль. Кверцетин использовали в концентрации 10 мг/мл. Инкубацию периферических нервов вели в растворе Рингера с добавлением действующих веществ при температуре 38 0С.

После инкубации из контрольного и опытных образцов проводили экстракцию липидов по методу Блай-Дайера. Для оценки интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) было исследовано накопление диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА). Определение количества ДК вели с помощью спектрофотометрического метода при длине волны 233 нм. Количество МДА определяли с помощью реакции между малоновым диальдегидом и тиобарбитуровой кислотой (ТБК).

В результате проведенных исследований были установлены изменения количественного содержания ДК и МДА в нервном волокне при развитии процессов ПОЛ и после действия кверцетина.

Содержание ДК и МДА в интактном нерве составило 0,75 мкМоль/мг липида и 0,4 мкМоль/мг белка, соответственно.

Содержание ДК в опытной пробе было больше на 48% относительно контрольного значения уже по прошествии 30 минут инкубации. Максимальное изменение было зафиксировано по истечению 90 минут инкубации и превышало контрольное значение в 3 раза, что свидетельствует об интенсивном течении процесса окисления.

При инкубации образца в растворе, содержащем пероксид водорода и кверцетина, наблюдалось снижение ДК на 65% по сравнению с опытной пробой, это свидетельствует о снижении интенсивности ПОЛ.

Количество МДА через 30 минут инкубации в присутствии пероксида водорода в среде инкубирования увеличивалось на 63 %. Наибольшее изменение было зафиксировано по прошествии 90 минут и превышало контрольное значение в 2 раза. Количественно содержание МДА при использовании кверцетина в течение 30

минут снизился на 24,6 %, по сравнению с опытной пробой 1. При увеличении времени выдержки показатель снизился на 69,5%.

Было выявлено, что при действии кверцетина в концентрации 10 мг/мл уровень ДК и МДА значительно снижался по сравнению с опытной группой.

Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что кверцетин может оказывать защитное действие, для борьбы с окислительным стрессом благодаря его антиоксидантному и нейропротекторному действию.

Очевиден тот факт, что кверцетин, имея антиоксидантные и нейропротекторные свойства, будет подавлять образование продуктов перекисного окисления липидов, такие как малоновый диальдегид и диеновые конъюгаты.

Таким образом, изучение молекулярного механизма, обеспечивающего сильную антиоксидантную способность кверцетина, имеет огромное значения для биомедицинских задач. Поэтому исследования в этой области, связанные с действием и изучением свойств этого вещества, приблизит к созданию на его основе нового класса регенеративных препаратов для лечения травм, ожогов и различных повреждений периферической нервной системы.

Исследование действия высокоэнергетического протонного облучения в режиме большой мощности на мышцах *in vivo*

Шемяков А.Е.^{1,2*}, Дюкина А.Р.², Заичкина С.И.², Агапов А.В.³, Мицын Г.В.³, Шипулин К.Н.³

¹*Физико-технический центр Физического Института Академии Наук;*

²*Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики;*

³*Объединенный институт ядерных исследований;*

alshemyakov@yandex.ru

Протонная лучевая терапия с каждым годом становится доступнее для использования во многих странах мира. С развитием данной технологии, ученые и инженеры работают в поисках наиболее оптимальных условий для повышения эффективности данного вида лучевой терапии. Одним из направлений стало исследование доставки доз в режиме высокой мощности (более 50 Гр/сек). Воздействие на биологический объект высокоинтенсивных пучков протонов за сверхкороткий промежуток времени (длительностью до 100 мс) и последующие за этим биохимические процессы, вызывают так называемый флэш-эффект. Ряд исследований показали, что увеличение мощности доставки дозы может снизить токсичность на здоровые ткани, т.к. опухолевые клетки оказываются более чувствительны к данному виду облучения. Исследование влияния скорости доставки дозы ранее проводилось как на пучках фотонов, так и на электронах, однако за счет большей массы и повреждающей способности протоны вновь становятся объектом изучения медиков и биологов. Природа данного эффекта детально до сих пор не изучена и ее исследование имеет огромное значение для развития клинической радиотерапии в будущем. В настоящее время облучение в режиме флэш начали испытывать при лечении остеосарком на первых пациентах. Однако еще нет понимания точного механизма избирательного увеличения клеточной гибели именно опухолевых клеток. Напротив, рядом исследователей было показано отсутствие эффекта увеличения клеточной гибели в сравнении со стандартной мощностью излучения.

В данной работе мы исследовали воздействие протонного пучка фазотрона Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ (Объединенный Институт Ядерных Исследований) на мышцах *in vivo*. Облучение животных проводилось на специальном стенде для радиационных исследований пучками протонов с энергией 600 МэВ. Мощность дозы при облучении в режиме флэш составляла 80 Гр/с, для контрольной группы мощность снижали до стандартной, используемой в лучевой терапии - 2 Гр/мин. Объектом изучения были двухмесячные самцы мышей SHK. Облучение проводили по одному животному тотально на все тело в дозе от 1 до 8,5 Гр. Нами был исследован выход микроядер в эритроцитах костного мозга, индекс массы тимуса и селезенки, а так же средняя продолжительность жизни в зависимости от мощности подведенной дозы излучения.

Исследование дозовой кривой выживаемости клеток меланомы мыши линии В16/F1 после их облучения пучками протонов в пике Брэгга

Романов М.В.^{1*}, Шемяков А.Е.^{1,2}, Попов А.Л.¹

¹ИТЭБ РАН;

²ФТЦ ФИАН;

rmvya@yandex.ru

Меланома является одним из наиболее сложных в лечении видов рака[1]. Одним из методов повышения эффективности терапии является использование облучения протонами[2]. В отличие от фотонов, которые ослабляются экспоненциально и облучают все на своем пути, частицы (протоны и ионы углерода) имеют конечную длину пробега и испускают большую часть своей энергии в конце своего пути. Такое распределение энергии на пути пробега описывается пиком Брэгга [3]. Благодаря этому можно увеличивать подводимые дозы облучения и добиваться их лучшей локализации.

В рамках данной работы была проведена оценка влияния пучка протонов с энергией 165 МеВ в диапазоне доз от 0 до 8 Гр с шагом в 1 Гр на клеточную линию меланомы мыши В16/F1 для построения кривой выживаемости. По данным клоногенного анализа был выявлен дозо-зависимый эффект образования колоний. При облучении клеток меланомы в дозе 1 Гр число колоний относительно контроля составило 75%. Облучения в дозе 3 Гр клеток меланомы приводило к образованию 13,8% колоний, а при дальнейшем повышении дозы число образовавшихся колоний было менее 5,5%. По данным теста Live/Dead было установлено, что облучение протонами не вызывает значительной гибели на всем диапазоне исследуемых доз облучения (соотношение мертвых клеток к их общему числу не превысило 13%). Помимо этого было установлено, что с повышением дозы облучения происходило снижение мембранного митохондриального потенциала, однако статистически значимая разница по сравнению с контролем наблюдалась только у клеток, подверженных облучению от 5 Гр и выше. В дальнейшем планируется изучить радиосенсибилизирующие свойства нанокompозита Ce0.9Gd0.1O2-x на клеточной линии В16/F1, а приведенные выше результаты будут использоваться для оценки его эффективности при их облучении пучком протонов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-73-10231.

Источники и литература

1. Lauren E Davis , Sara C Shalin , Alan J Tackett. Current state of melanoma diagnosis and treatment. Cancer Biol Ther. 2019;20(11):1366-1379.

2. Michael J LaRiviere, Patricia Mae G Santos, Christine E Hill-Kayser , James M Metz. Proton Therapy. Hematol Oncol Clin North Am. 2019 Dec;33(6):989-1009.

3. В.А. Климанов (2011). Радиобиологическое и дозиметрическое планирование лучевой и радионуклидной терапии, Изд. No 1/1/115, Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва.

Исследование и количественная оценка транспорта маркеров в гидрогелевом фантоме, имитирующем паренхиму мозга

Ванина А.С.^{1*}, Сычев А.В.¹, Постников Е.Б.¹, Лаврова А.И.², Грехнева Е.В.¹, Кудрявцева Т.Н.¹,

Гаврилов П.В.², Андропова П.Л.³

¹Курский государственный университет;

²Санкт-Петербургский Научно-исследовательский институт Фтизиопульмонологии;

³Институт мозга человека имени Н. П. Бехтеревой РАН;

vanina.nast.05@gmail.com

Среди современных проблем физиологии головного мозга особое внимание уделяется транспортным процессам во внеклеточном пространстве, имеющим решающее значение для понимания нейроглиального метаболизма, для решения вопроса доставки лекарств, а также предотвращения нейродегенеративных заболеваний [1].

Одним из нерешенных вопросов остается механизм переноса растворенных веществ через паренхиму. Споры ведутся относительно существования либо направленных потоков, либо диффузионного переноса. Сложность прямой регистрации таких процессов in vivo формирует потребность в разработке фантомов со свойствами, имитирующими паренхиму мозга, как физических моделей для тестирования реализуемости различных подходов к описанию транспорта веществ.

Данная работа посвящена определению и количественной характеристике процессов переноса в новой фантомной ткани [2] на основе коллагенового гидрогеля, имитирующего структуру и консистенцию паренхимы мозга. На основе электронной сканирующей микроскопии и компьютерной томографии выявлено существование сетевидных и микропористых структур, соответствующих характеристикам внеклеточного пространства головного мозга. Учитывая эти данные, можно ожидать, что перенос молекулярных маркеров или наночастиц в синтезированном гидрогеле будет происходить по той же схеме диффузии, что и в неоднородной среде с ловушками и барьерами.

Использованы два подхода: 1) пространственно-временная фиксация двумерной проекции распространения низкомолекулярных флуоресцентных маркеров, 2) трехмерную картину распространения контрастного агента, используемого при клинической компьютерной томографии. Результатом первого стало определение эффективный макроскопический коэффициент диффузии, имеющий биологически-релевантную величину. В ходе второго метода выявлен сложный процесс, комбинирующий быстрое распространение воды в данной структуре после инъекции, за которой следует медленный процесс диффузионного типа, находящийся под влиянием микроструктуры среды. Обсуждается соответствие полученных закономерностей биофизическим моделям данных процессов.

[1] Tønnesen, J.; Hrabětová, S.; Soria, F.N. Local diffusion in the extracellular space of the brain. *Neurobiology of Disease*. 2023, 177, 105981.

[2] Vanina, A.S.; Sychev, A.V.; Lavrova, A.I.; Gavrilov, P.V.; Andropova, P.L.; Grekhnyova, E.V.; Kudryavtseva, T.N.; Postnikov, E.B. A hydrogel-based phantom of the brain tissue aimed at modelling complex metabolic transport processes. *Eur. Phys. J. Spec. Top.*, 2022. <https://doi.org/10.1140/epjs/s11734-022-00733-0>

Исследование массовой концентрации ионов в моче на различных этапах формирования мочекаменной болезни в эксперименте *in vivo* на мышах

Гулина Л.С.^{1*}, Эмануэль В.Л.³, Бурдаков В.С.²

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»;*

²*ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)»;*

³*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова;*
c.lupus@mail.ru

Уролитиаз является одним из самых часто встречаемых урологических заболеваний, затрагивающих всю мочевыделительную систему в целом. Характеризуется уролитиаз формированием в органах мочевыделительной системы конкрементов, мешающих выделению мочи и оказывающих травмирующее действие на органы. Таким образом, можно сказать, что удобное для применения в практике и качественное моделирование уролитиаза *in vivo* поможет для дальнейших исследований терапии и профилактики данной болезни.

Одним из наиболее часто встречающихся факторов кристаллогенеза является гломулярное и тубулоинтерстициальное повреждение почек. В качестве литогенных агентов при моделировании используют этиленгликоль, оксалат натрия и 1-гидроксипролин. В нашем исследовании для моделирования оксалатного уролитиаза мы используем интраперитонеальное введение оксалата натрия ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) однократно в дозировке 7 мг на 100 гр. массы тела животного. Преимуществом выбранного метода является быстротечность формирования оксалатного уролитиаза через 2-4 часа после введения препарата. В данный момент не описано изменение массовой концентрации ионов в моче, что не позволяет в полной мере представить процессы, протекающие в моче на различных этапах формирования мочекаменной болезни. Для определения ионного состава мочи и сыворотки крови использовали метод капиллярного электрофореза.

В качестве тест-системы чаще всего используют грызунов, хотя они и не склонны к образованию камней в органах мочевыделительной системы. Однако, использование наиболее подходящих для этого собак и свиней считается нецелесообразным. В нашем исследовании модель оксалатного уролитиаза проводилась на самцах аутбрендных лабораторных мышей ICR (CD-1).

Для исследования были сформированы две группы животных по 12 самцов аутбрендных половозрелых мышей. Мыши на момент начала эксперимента были клинически здоровы и содержались в одинаковых условиях в клетках по 12 голов с 12-часовым режимом день-ночь при температуре 20-22°C, влажности 60-70% и получали стандартный рацион питания, не отличный от обычного. Исследование проводилось в соответствии с правилами работы с лабораторными животными и с соблюдением правил биоэтики.

В день начала эксперимента животных взвешивали, маркировали и разбивали на две группы, предварительно отобрав мочу для сбора данных в точке «0 часов». Затем первой группе, контрольной (n=12), вводили интраперитонеально 100 мкл хлорида натрия 0,9% однократно, в то время как экспериментальной группе вводили 100 мкл оксалата натрия ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) однократно в дозировке 7мг на 100 гр. массы тела животного, ресуспендированного в 0,9% растворе NaCl. Сбор мочи для проведения общеклинического и биохимического анализа, исследования микроскопии осадка, проводимости и ионного состава проводили в момент формирования экспериментальных групп, через 4 часа после начала эксперимента и через 24 часа после начала эксперимента. Взятие образцов сыворотки крови и материалов для гистологического исследования почки проводили в контрольных точках 4 и 24 часа. Эвтаназия мышей осуществлялась посредством декапитации.

В день 0 в осадке мочи животных контрольной и экспериментальной группы кристаллы не наблюдались, однако уже через 4 часа после введения препаратов в моче животных экспериментальной группы обнаруживались единичные кристаллы моногидрата и дигидрата оксалата кальция. Через 24 часа после введения препарата в моче экспериментальных животных наблюдается уменьшение количества оксалатов на всём поле при микроскопии осадка. Кристаллы в моче животных контрольной группы не обнаруживались в течение эксперимента.

Повреждение почечных клубочков подтверждалось результатами морфологических изменений почек при гистологическом исследовании (дилатация канальцев, наличие кристаллов оксалата в канальцах), биохимического исследования сыворотки крови и мочи (повышение концентрации креатинина), исследования ионного состава сыворотки крови и мочи, исследования проводимости мочи, а также наличием кристаллов в осадке мочи.

В заключении полученные результаты предоставляют актуальную информацию о моделировании уролитиаза, индуцированного внутривенным введением $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ в эксперименте *in vivo* и демонстрирующем изменения в ионном составе мочи и сыворотки крови.

Исследование морфометрических показателей тромбоцитов с помощью электронной микроскопии

Обыденный С.И.^{1,2*}, Кузнецова А.А.³, Киреев И.И.³, Пантелеев М.А.^{1,2,3}

¹Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва;

²Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва;

³Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва;
obydennyj@physics.msu.ru

Введение. Тромбоциты – безъядерные клетки крови размером 2-4 микрометра. Их основная функция – сборка гемостатического тромба в месте повреждения сосуда. Существует ряд наследуемых заболеваний, при которых наблюдаются морфологические изменения строения тромбоцитов: синдром Вискотта-Олдрича, МҮН9-ассоциированные синдромы, синдром Серых Тромбоцитов, синдром Германского-Пудлака, синдром Пари-Труссо, синдром Чедиака-Хигаши. Морфологические нарушения могут быть разделены на патологии цитоскелета тромбоцитов, альфа и плотных гранул, а также нарушения мембраны. Заболевания, затрагивающие строение или количество гранул, как правило, требуют подтверждения методами электронной просвечивающей микроскопии.

Целью данной работы является разработка метода анализа морфометрических показателей тромбоцитов с помощью электронной микроскопии.

Результаты. Были отлажены методы пробоподготовки тромбоцитов для электронной просвечивающей микроскопии и подобраны параметры для морфометрической оценки тромбоцитов. Были отобраны следующие показатели: соотношение размеров тромбоцитов, количество альфа-гранул на тромбоцит и их размер, площадь тромбоцита и отношение количества гранул к этой площади. Был произведен набор норм для сравнения с результатами анализов пациентов по выбранным показателям.

Заключение. Электронная микроскопия в клинической диагностике тромбоцитов играет важную роль при нарушениях, связанных с плотными и альфа-гранулами, так как это единственный метод, позволяющий визуализировать и достоверно определить их состояние и количество. В меньшей степени электронная микроскопия применяется для подтверждения нарушениями цитоскелета или мембран. Уникальность этого метода в том, что он позволяет рассмотреть строение настолько малых структур.

Работа поддержана грантом РФФ 21-75-00109.

Исследование особенностей реструктуризации функциональной архитектуры нейронных сетей головного мозга в условиях гипоксического повреждения и блокады астроцитарных коннексинов 43 (Cx43)

Ведунова М.В.^{1*}, Мищенко Т.А.¹, Калякулина А.И.¹, Ярков Р.С.¹, Иванченко М.В.¹
¹*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия;*
mvedunova@yandex.ru

Исследования патогенетических аспектов гипоксии головного мозга и особенностей развития системных ответов организма и его адаптации к кислородной недостаточности сохраняют свою крайнюю актуальность. Особый интерес представляет изучение механизмов гипоксического повреждения на уровне организации нейронных сетей как главных функциональных единиц ЦНС, отвечающих за реализацию обработки, хранение и передачу информации, а также за выполнение высших когнитивных функций, в том числе память, сознание, эмоциональные реакции. Данный подход с применением современных электрофизиологических методов и математических алгоритмов анализа данных позволяет проанализировать тонкие механизмы реструктуризации функциональной архитектуры нейронных сетей при гипоксическом повреждении, а также вклад каждого элемента сети в развитие функционального сетевого ответа на действие стресс-фактора. Однако накопленные данные свидетельствуют о том, что физиологические и патологические нейросетевые процессы критически зависят от активности глиальных клеток, в частности астроцитов. Формируя свои собственные сети, астроциты выполняют не только гомеостатическую и трофическую функции для нейронов, но также, что более важно, находясь в тесном динамическом двунаправленном взаимодействии с нейронными сетями, способны регулировать их функциональную активность, и, следовательно, принимать активное участие в передаче сигнала тем самым являясь активными участниками сигнальной передачи, оказывающая влияние на работу мозга, включая когнитивные функции и обработку информации.

Целью исследования являлось изучение влияния астроцитарных Cx43 на спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей гиппокампа при гипоксическом повреждении *in vitro*. Объектом исследования служили первичные культуры клеток гиппокампа, полученные от эмбрионов мышей линии C57BL/6 18-го дня гестации. Клетки культивировали на мультиэлектродных матрицах MEA60 (Multichannel Systems, Германия), с исходной плотностью 9000 кл./мм². На 14 день культивирования *in vitro* культуры подвергали воздействию острой нормобарической гипоксии путем замены нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода в течение 10 мин. С целью разобщения межастроцитарных взаимодействий за 20 минут до моделирования гипоксического повреждения в среду культивирования осуществлялось добавление селективного ингибитора Cx43 – Gap19 (10 мкМ, Sigma-Aldrich, Германия). Регистрация электрофизиологических сигналов с первичных культур гиппокампа, культивируемых на мультиэлектродных матрицах MEA60, осуществлялась при помощи установки MEA2100-2x60-System-E (Multichannel systems, Германия). Полученные электрофизиологические данные анализировались с помощью оригинального пакета математических алгоритмов. Помимо основных параметров спонтанной биоэлектрической активности (количество сетевых пачек и спайков в пачке), были исследованы особенности реорганизации внутренней функциональной структуры нейросетевого ответа посредством построения корреляционных графов и паттернов активации, определяемых по времени возникновения последовательности спайков внутри сетевой пачки импульсов.

В результате проведенных исследований было показано, что в условиях нормоксии блокада астроцитарных Cx43 приводит к модуляции спонтанной нейросетевой активности. Через 2 часа после добавления блокатора Gap19 наблюдается снижение количества сетевых пачечных событий и спайков, формирующих сетевую пачку импульсов. В раннем (24 часа) и отдаленном (7 суток) периоде после воздействия все анализируемые параметры спонтанной биоэлектрической активности в группе «Gap19» превышали значения исходного уровня активности (14 DIV), тем не менее количество сетевых пачечных событий было снижено относительно значений интактной группы. При анализе паттернов активации и корреляционных взаимодействий установлено, что, как и в случае интактной группы, в процессе развития первичных культур на фоне блокады Cx43 наблюдается реструктуризация внутренней функциональной архитектуры нейронной сети, направленная на сохранение уже имеющихся и появление новых активных групп нейронов. Блокада Cx43 при гипоксическом повреждении способствовала частичному сохранению спонтанной биоэлектрической активности первичных культур гиппокампа. В отдаленном постгипоксическом периоде (7 суток) показатели группы «Гипоксия+Gap19» были сравнимы с исходным уровнем активности (14 DIV) и достоверно превышали значения группы «Гипоксия». Тем не менее, в группе «Гипоксия+Gap19» количество сетевых пачек и спайков их формирующих

было снижено относительно значений интактной группы в среднем в 1,6 и 2,2 раз соответственно. Поддержание основных параметров спонтанной биоэлектрической активности первичных культур способствовало частичному сохранению функциональной архитектуры нейронных сетей с последующей положительной реструктуризацией в отдаленном постгипоксическом периоде. На фоне потери части активных групп клеток вследствие гипоксического повреждения отмечается появление новых функциональных элементов сети, задействованных в формировании сетевого пачечного ответа.

Полученные результаты исследования демонстрируют важную роль межклеточных взаимодействий в нейропротекторных механизмах, участвующих в функциональной адаптации нейронных сетей головного мозга к гипоксическому повреждению, более подробное изучение которых может заложить основу для разработки эффективной антигипоксической стратегии.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 18-75-10071-П с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Молекулярной биологии и нейрофизиологии» ННГУ им. Н.И.Лобачевского.

Исследование особенностей функциональной активности нейрон-астроцитарных сетей головного мозга в условиях гипоксического повреждения и блокады коннексина 43

Мищенко Т.А.^{1*}, Ярков Р.С.¹, Савюк М.О.¹, Перенков А.Д.¹, Кривонос М.И.¹, Ведунова М.В.¹

¹*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И.*

Лобачевского, Нижний Новгород, Россия;

saharnova87@mail.ru

Гипоксия головного мозга возглавляет список актуальных проблем мирового здравоохранения, требующих скорейшего разрешения. Запуск гипоксия-индуцированных патологических механизмов является не только причиной гибели клеток и значимых изменений функций мозга, но и одним из ключевых факторов, предопределяющих развитие тяжелых патологий ЦНС, включая ишемический инсульт, нейродегенеративные и онкологические процессы. Гипоксия оказывает свое губительное действие как на нейроны, так и на глиальные клетки, однако роль последних в адаптации мозга к дефициту кислорода исследована недостаточно. Глиальные клетки, в частности астроциты, и нейроны находятся в тесном динамическом взаимодействии и организованы в пластичные и жестко регулируемые сети. Астроцитарные сети, образуемые с помощью *gap*-контактов коннексина, обладают сигнальной активностью и принимают активное участие в регуляции обмена между цитоплазмой и внеклеточным пространством. *Gap*-контакты астроцитов состоят из шести белковых субъединиц – коннексинов (*Cx*), среди которых коннексин 43 (*Cx43*) в основном обеспечивают связь между астроцитами в мозге. В недавних исследованиях было показано, что астроцитарные *gap*-контакты обеспечивают не только быстрый межклеточный обмен ионов и метаболитов, что имеет решающее значение для буферизации ионов K^+ и глутамата, распространения кальциевых волн и синаптической пластичности, но и являются участниками развития повреждения при гипоксия-ишемических состояниях.

Целью настоящего исследования явилось подробное изучение влияния астроцитарных *Cx43* в функциональной реорганизации нейрон-глиальных сетей при гипоксическом повреждении *in vitro*. Материалом для исследований служили первичные культуры клеток больших полушарий головного мозга мышей линии C57BL/6 18-го дня гестации. На 14 день развития культур *in vitro* проводилось моделирование острой нормобарической гипоксии посредством замены кондиционированной культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода в течение 10 мин. Добавление селективного ингибитора *Cx43* – *Gap19* (10 мкМ, Sigma-Aldrich, Германия) в среду культивирования осуществлялось за 20 минут до моделирования гипоксии. Методом ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени (RT-qPCR) проведена оценка уровня экспрессии метаболитных глутаматных рецепторов *mGluR2* и *mGluR5* в клетках первичных кортикальных культур на 1 и 3 сутки после моделирования гипоксии. В отдаленном постгипоксическом периоде проведена регистрация спонтанной кальциевой активности методом кальциевого имиджинга и оценены сетевые характеристики первичных кортикальных культур с помощью оригинальных математических алгоритмов.

Было показано, что в условиях нормоксии блокада астроцитарных *Cx43* приводит к повышению экспрессии метаболитных глутаматных рецепторов *mGluR2* и *mGluR5*, а также длительной модуляции спонтанной кальциевой активности первичных культур клеток больших полушарий головного мозга, в первую очередь выражающаяся в реструктуризации функциональной архитектуры нейрон-глиальных сетей посредством снижения уровня корреляции между клетками сети и долей существующих корреляционных связей между клетками. Блокада *Cx43* при гипоксическом повреждении оказывает выраженный нейропротекторный эффект. В отдаленном постгипоксическом периоде на фоне сохраняющейся повышенной экспрессии *mGluR5* рецепторов установлено снижение экспрессии *mGluR2* до физиологического уровня, что предполагает запуск альтернативных молекулярных механизмов адаптации клеток к гипоксическому повреждению. Кроме того,

блокада Sx43 способствовала поддержанию как основных параметров спонтанной кальциевой активности первичных культур (процент функционально активных клеток, длительность и частота Ca²⁺ осцилляций), так и функциональной архитектоники нейрон-глиальной сети с сохранением профиля кальциевых осцилляций и высокого уровня корреляции кальциевых сигналов между клетками сети. Результаты исследования демонстрируют важное значение астроцитарных сетей в функциональной адаптации мозга к гипоксическому повреждению, что может стать перспективной мишенью для разработки стратегии рациональной антигипоксической терапии.

Исследование выполнено в рамках научной программы Национального центра физики и математики (проект «Искусственный интеллект и большие данные в технических, промышленных, природных и социальных системах»).

Исследование периферического звена возникновения боли при мигрени в условиях хронического повышения уровня гомоцистеина у крыс

Ермакова Е.В.^{1*}, Королёва К.С.¹, Кабирова А.А.¹, Ситдикова Г.Ф.¹
¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;
ElivErmakova@kpfu.ru

Мигрень - распространенное неврологическое заболевание, приводящее к хроническим головным болям. Этим расстройством страдают до 10–15% населения, однако нейрохимические механизмы возникновения мигрени изучены недостаточно [1]. Рядом клинических исследований показано, что высокие концентрации серосодержащей аминокислоты гомоцистеина (Гц) в плазме (гипергомоцистеинемия, ГГц) могут провоцировать начало приступов мигрени. Однако, остается неисследованным механизм и мишени патогенного действия Гц в тригеминальной системе, а также отсутствуют данные об изменении возбудимости ее периферического звена при действии этой аминокислоты. Предполагается, что Гц может оказывать свое действие на нейроны тройничного ганглия (TG) в том числе и через изменение числа или активности глутаматных рецепторов в их цитоплазматической мембране. Глутамат – основной возбуждающий нейромедиатор в нервной системе, обеспечивающий синаптическую передачу от первичных афферентов к ноцицептивным нейронам второго порядка в стволе мозга. Однако роль глутамата в периферических механизмах мигрени, в частности, во время генерации ноцицептивных болевых сигналов в мозговых оболочках, остается также малоизученной. Глутамат возбуждает нейроны в основном через ионотропные АМПА, НМДА или каинатные рецепторы, при этом рецепторы НМДА (НМДАР) обладают самым высоким сродством к глутамату и относительно низкой десенсибилизацией, что делает их наиболее вероятными кандидатами для участия в эффектах глутамата в мозговых оболочках. В связи с этим, целью нашего исследования был анализ возбудимости периферического отдела тройничного нерва крысы и изолированных TG-нейронов в условиях моделирования пренатальной ГГц, а также выяснение роли НМДА-рецепторов в активации периферических окончаний тройничного нерва крысы.

В исследовании участвовали две группы животных: контрольная и группа пренатальной ГГц, которая моделировалась как описано ранее [2]. Потенциалы действия (ПД), генерирующиеся в периферических отростках тройничного нерва, регистрировали внеклеточным стеклянным электродом. Для этого использовали препарат полуживотной крысы P30-40. Половина черепной коробки очищалась от периферических тканей с сохранением твердой оболочки мозга вместе с сосудами и нервными волокнами. Аппликация веществ производилась область расхождения медиальной менингеальной артерии. Регистрация вызванных Ca²⁺-ответов была проведена на первичной культуре нейронов, изолированных из тройничного ганглия крыс P10-14, визуализацию клеток проводили с помощью маркера Fluo4 AM с последующим количественным анализом [3]. Методика patch-clamp применялась для регистрации потенциала на мембране TG-нейронов, что позволило оценить изменения активных и пассивных электрических свойств мембраны в условиях пренатальной ГГц. Аппликация агониста НМДАР (100 мкМ) на TG-нейроны производилась с использованием системы быстрой перфузии в течение 20с. Для всех экспериментов с агонистом НМДАР в качестве базового использовался безмагнийный раствор, дополненный глицином (30 мкМ).

Было показано, что минимальная концентрация KCl, вызывающая повышение частоты импульсации в тройничном нерве, отличается в контрольной и ГГц группах. В контроле пороговая концентрация составила 25 мМ, в группе ГГц – 5 мМ. Анализ пассивных и активных электрических свойств мембраны TG-нейронов показал, что входное сопротивление, мембранный потенциал покоя, амплитуда ПД, а также порог генерации ПД достоверно не отличались в группах контроля и пренатальной ГГц, однако, средняя величина реобазы для нейронов животных с пренатальной ГГц была достоверно ниже контрольных значений. Показано также, что 30,3% нейронов в контроле и 23% нейронов в группе ГГц генерировали серии ПД при увеличении силы иницируемого тока до двух реобаз. Среднее количество ПД за 1с возрастало при такой стимуляции для нейронов крыс группы ГГц более, чем в два раза, по сравнению с контролем. При внеклеточной регистрации ПД

в тройничном нерве крысы в контроле наблюдалась базовая частота генерации ПД, которая при аппликации агониста НМДАР увеличивалась практически вдвое. У контрольных животных НМДА вызывал кратковременное повышение уровня кальция в 14,3% TG-нейронов (n=101/706), что также указывало на функциональную экспрессию рецепторов НМДА[4]. У животных группы ГГц НМДА-вызванные Ca²⁺-транзиенты наблюдались лишь в 6,19% TG-нейронов (n=31/501), что может быть связано с хроническими условиями окислительного стресса. При этом средние амплитуда, площадь и полуширина ответов на НМДА в группе ГГц достоверно не менялись по отношению к контрольным параметрам.

Таким образом, в условиях пренатальной ГГЦ наблюдается повышенная возбудимость афферентов тригеминального нерва и изолированных нейронов тройничного ганглия. Можно предположить, повышение частоты приступов мигрени при высоком уровне Гц может быть связано именно с сенситизацией тригеминальной системы, иннервирующей менингеальную оболочку, активация которой является триггером ноцицептивной импульсации.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030)» и гранта РФФИ номер № 20-15-00100.

Литература:

1. Vos T. et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 //The lancet. – 2012. – Т. 380. – №. 9859. – С. 2163-2196.
2. Gerasimova E. et al. Effects of maternal hyperhomocysteinemia on the early physical development and neurobehavioral maturation of rat offspring //BioNanoScience. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 155-158.
3. Koroleva K. et al. Protective Effects of Hydrogen Sulfide Against the ATP-Induced Meningeal Nociception //Frontiers in cellular neuroscience. – 2020. – Т. 14. – С. 266.
4. Guerrero-Toro C. et al. Testing the Role of Glutamate NMDA Receptors in Peripheral Trigeminal Nociception Implicated in Migraine Pain //International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – №. 3. – С. 1529.

Исследование роли хронической пренатальной гипоксии в функционировании нейрон-глиальных сетей головного мозга и их адаптации при воздействии острого стресса *in vitro*

Гусева Е.А.^{1*}, Ведунова М.В.¹, Мищенко Т.А.¹

¹*Нижегородский Государственный Университет им. Н. И. Лобачевского, институт Биологии и Биомедицины;
eguseva655@gmail.com*

Пренатальная гипоксия входит в список главных причин детской смертности и тяжелой инвалидизации новорожденных. Актуальные для современности неблагоприятные экологические факторы, материнский стресс, курение и алкоголизм приводят к недостаточному снабжению плода кислородом. Помимо этого, в результате акушерских осложнений, новорожденный также может подвергнуться гипоксическому воздействию. Кислородное голодание на раннем этапе онтогенеза является одним из основных факторов риска развития психопатологий, нарушений в сенсомоторном развитии и способности к обучению во взрослом возрасте. Окислительный стресс, индуцированный гипоксией, является одной из основных причин развития эпилепсии.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния хронической пренатальной гипоксии на функционирование нейрон-глиальных сетей первичных культур клеток гиппокампа и оценка нейросетевого адаптационного потенциала к воздействию последующего острого гипоксического стресса. Объектом исследования служили первичные культуры клеток гиппокампа, полученные от 18-ти дневных эмбрионов мышей гибридной линии C57BL/6+C3H. Беременные самки мышей с 14 по 18 день гестации на 2 часа помещались в герметичную барокамеру для создания условий, соответствующих подъему на высоту 6500-7000 м над уровнем моря. Контрольная группа животных моделированию гипоксии не подвергалась. От эмбрионов 19-го дня гестации были получены первичные культуры клеток гиппокампа, которые культивировались в течение 21 дня. На 14-й день культивирования (DIV) часть культур подвергалась моделированию острой нормобарической гипоксии путем замены кондиционной культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода в течение 10 минут. Спонтанная Ca²⁺ активность первичных культур гиппокампа оценивалась на 1, 3 и 7 сутки постгипоксического периода методом кальциевого имиджинга с последующей обработкой полученных данных оригинальными математическими алгоритмами. Были проанализированы как основные параметры спонтанной кальциевой активности (число функционирующих клеток, частота и длительность кальциевого сигнала), так и сетевые характеристики нейрон-глиальных сетей.

В результате проведенных исследований было показано, что воздействие хронической пренатальной гипоксии приводит к нарушению формирования функциональной архитектуры нейрон-глиальных сетей первичных культур клеток гиппокампа, характеризующееся достоверным снижением скорости распространения сигнала по сети и количества функциональных взаимосвязей между клетками сети. Воздействие хронической пренатальной гипоксии модулирует ответ нейрон-глиальной сети на действие острой гипоксии, которое проявляется в сохранении основных параметров спонтанной кальциевой активности, таких как длительность и частота Ca^{2+} осцилляций, при ухудшении связности культур и скорости распространения кальциевого сигнала, что, вероятно, связано с перестроением функциональной архитектуры нейрон-глиальной сети. Дальнейшее изучение молекулярно-клеточных механизмов, индуцированных гипоксией, на нейросетевом уровне позволит не только уточнить и дополнить имеющиеся знания об особенностях перинатальных повреждений головного мозга, но и усовершенствовать методы диагностики и лечения гипоксических повреждений ЦНС.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ №18-75-10071-П с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Молекулярной биологии и нейрофизиологии» ННГУ им. Н.И.Лобачевского.

Исследование синаптического притока в интернейронах парietальных ганглиев оборонительного поведения виноградной улитки

Арсланов А.А.^{1*}, Андрианов В.В.¹, Дерябина И.Б.¹, Шихаб А.¹, Силантьева Д.И.¹, Гайнутдинов Х.Л.¹
¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет;*
arslanov-1999@mail.ru

В основе природы обучения и памяти лежат клеточные механизмы синаптической и несинаптической пластичности [1]. Известно, что в процессе обучения идет как увеличение отдельных синаптических связей [2], так и изменения эндогенных свойств нейрона и его мембраны [3]. Механизмы пластичности, связанные с изменением состояния (возбудимости) нейронов, участвующих в конвергенции сенсорной информации и передающих свои сигналы далее по сети, также являются одной из актуальных проблем современной нейробиологии [4,5,6]. Целью данной работы было исследование изменений подпороговой фоновой электрической активности интернейронов виноградной улитки после ассоциативного обучения. Регистрация подпороговой фоновой активности молчащего нейрона позволяет составить картину суммарной электрической активности входящих синапсов. Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи: разработать методику, позволяющую качественно и количественно оценивать фоновую электрическую активность при внутриклеточном отведении от нервной клетки и провести анализ ее изменения при формировании условного рефлекса аверзии к определенному виду пищи у виноградной улитки.

Электрофизиологические измерения проводились по усовершенствованной методике регистрации трансмембранного потенциала, позволившей обнаружить возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП) с амплитудой от 0,2 мВ. ВПСП определялись визуально по характерной форме изменения мембранного потенциала. Методика регистрации была связана с достижением минимальных шумов при регистрации потенциалов и сглаживанием сигналов. Для описания наблюдаемых изменений фоновой активности интернейронов анализировалась средняя амплитуда и количество ВПСП.

Было найдено, что выработка условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии у виноградной улитки приводит к достоверному увеличению количества низкоамплитудных одиночных ВПСП в гигантских интернейронах оборонительного поведения. Данное увеличение количества низкоамплитудных одиночных ВПСП в данном случае может говорить либо об увеличении количества потенциалов действия в соответствующих пресинаптических нейронах, либо об увеличении амплитуды ранее не подававшихся измерению ВПСП (амплитудой ниже выбранного нами порога в 0.5 мВ). К сожалению, несмотря на то, что гигантские интернейроны оборонительного поведения имеют достаточно широкий сенсорный вход, в литературе имеется очень мало сведений о конкретных пресинаптических сенсорных нейронах [7]. Предпринятый анализ подпороговой фоновой активности молчащих интернейронов оборонительного поведения виноградной улитки позволил найти изменения в синаптическом входе, связанные с выработкой условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии.

Работа поддержана Программой стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (Приоритет – 2030).

1. А. Losonczy, Nature 27, (452), 436 (2008)

2. Т. В. Bliss, Journal Physiology 2, (232), 331 (1973)

3. J. Lisman et al., Nat Neurosci. 21 (3) 309–314 (2018)

4. П. М. Балабан, Т. А. Коршунова, Успехи физиол. Наук 42,(4), 3(2011)

5. Х. Л. Гайнутдинов, В. В. Андрианов, Т. Х. Гайнутдинова, Успехи физиол. Наук 42, (1), 33 (2011)

6.V.V. Andrianov, T. Kh, Bogodvid, I.B. Deryabina et al., Front. Behav. Neurosci. 9,(279), 1 (2015)
7.Т.А. Палихова, И.В. Маракуева, Г.Г. Араkelов, Журн. высш. нервн. деят. 42, (6), 1170 (1992)

Исследование содержания NO в скелетных мышцах крыс при дефиците движений методом ЭПР-спектроскопии

Зарипова Р.И.^{1*}, Яфарова Г.Г.¹, Андрианов В.В.^{1,2}, Гайнутдинов Х.Л.^{1,2}, Сунгатуллина М.И.¹,
Зиятдинова Н.И.¹, Зефилов Т.Л.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

²Казанский физико-технический институт – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ
РАН;

ratno1992@mail.ru

В условиях производственной и городской среды жизнь современного человека предлагает организму форму жизнедеятельности его органов и систем далекую по уровню двигательной активности и безопасности от необходимых требований, заложенных эволюцией. О разрушительном действии, которое оказывает дефицит движений на органы и системы организма, свидетельствует обширный, убедительный экспериментальный и клинический материал. Происходит уменьшение нагрузки на мышечный аппарат, что приводит к изменениям функциональных и морфологических изменений до патологических состояний в зависимости от продолжительности и степени гипокинезии. Известно, что при дефиците движений задние конечности крыс недостаточно нагружены, и обнаруживаются значительные структурные изменения в мышцах в виде дистрофии. NO является важным модулятором клеточной активности во многих тканях у позвоночных и беспозвоночных животных. NO способен взаимодействовать с разнообразными веществами – тиолами, белками, сахарами, ионами металлов, гемами протеинов и т.д., локализованными в самых различных тканях и органеллах, что предполагает наличие NO и его комплексов в различных тканях. Система оксида азота, играющая роль в активации антиоксидантных ферментов, ограничивает стресс-реакцию.

Методом электронного парамагнитного резонанса было проведено исследование интенсивности продукции оксида азота путем анализа количества NO - содержащих парамагнитных комплексов в тканях икроножной мышцы крыс, растущих в условиях дефицита движений. Ограничение двигательной активности в клетках-пеналах составило 30 суток. Крысы контрольной группы содержали в условиях естественной двигательной активности по 4-5 животных в клетке.

Ввиду короткого времени жизни NO, что проявляется в его низкой концентрации в тканях, наиболее целесообразным методом обнаружения и количественного определения NO является метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Метод основан на реакции радикала (в данном случае NO) со спиновой ловушкой – мы применили комплекс Fe²⁺ с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК), который позволяет захватить NO и формировать устойчивый тройной комплекс (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO в тканях животных. Продукция оксида азота оценивалось по интенсивности сигнала ЭПР, принадлежащего комплексу (ДЭТК)₂-Fe²⁺-NO. Сигналы сравнивали по величине интегральной интенсивности, так как интегральная интенсивность сигнала ЭПР прямо пропорциональна концентрации парамагнитных комплексов. Для исследования забирали ткани икроножной мышцы животных. Регистрация спектров ЭПР приготовленных образцов проводилась на спектрометре ЭПР X-диапазона ER-200E-SRC фирмы "Bruker" EMX/plus с температурной приставкой ER 4112HV при 77 К. Во всех экспериментах сохранялись постоянными следующие параметры: СВЧ мощность-30 мВт, модуляция-5 Гс, усиление- 4·10⁴, постоянная времени-100 мсек., время записи спектра-50 секунд и число накоплений – 8.

Было обнаружено, что количество NO в скелетных мышцах крыс, растущих в условиях гипокинезии, не отличается от показателей контрольной группы.

Исследование спектрально-корреляционных характеристик ЭЭГ у перенесших COVID-19

Кулбаева М.С.^{1*}, Мұстафин М.¹, Мұстафина Г.¹, Швецова Е.В.¹

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби;

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби ;

Elenna4444@mail.ru

2. Коронавирусная инфекция (COVID-19) – это инфекционное заболевание, вызванное вирусом SARS-CoV-2.

У большинства заболевших COVID-19 наблюдаются легкие или умеренные симптомы, выздоровление происходит без специфического лечения. Однако у некоторых людей заболевание протекает в тяжелой форме, и им требуется медицинская помощь.

Неврологические осложнения стали важной причиной заболеваемости и смертности в условиях продолжающейся пандемии COVID-19. Помимо дыхательной недостаточности, у многих госпитализированных пациентов наблюдаются неврологические проявления, варьирующие от головной боли и потери обоняния до спутанности сознания и инвалидизирующих инсультов. Ожидается, что COVID-19 в долгосрочной перспективе скажется на нервной системе

Известно, что потеря обоняния является одним из самых ранних симптомов инфекции ковидом. Это было установлено на основании данных об усилении сигнала магнитно-резонансной томографии в обонятельной коре головного мозга, что указывает на инфекцию нервной системы. Вирус попадает в центральную нервную систему через кровоток, заражая эндотелиальные клетки. Во-вторых, вирус может проникать в периферическую нервную систему через ретроградные нейрональные пути. Вирус может интернализироваться в нервных окончаниях путем эндоцитоза, ретроградно транспортироваться и трансинаптически распространяться в другие области мозга.

Гипотезы исследования:

1. Мощност альфа-ритма, основного ритма ЭЭГ в состоянии спокойного бодрствования с закрытыми глазами, у людей, перенесших COVID-19, снижена по сравнению с людьми, не имевших в анамнезе COVID-19.

2. Величина отношения мощности тета-ритма ЭЭГ к мощности альфа-ритма ЭЭГ в фоновой ЭЭГ повышена у людей, перенесших COVID-19, по сравнению с людьми, не имевших в анамнезе COVID-19.

3. В состоянии спокойного бодрствования с закрытыми глазами показатели корреляция ЭЭГ между разными зонами коры головного мозга ниже, у людей, перенесших COVID-19, по сравнению с людьми, не имевших в анамнезе COVID-19.

Методы: запись электроэнцефалограммы головного мозга на приборе «Нейронспектр-4», сравнительный спектрально-корреляционный анализ ЭЭГ при статистической обработке данных в программе SPSS.

Результаты: Выявлены признаки снижения функционального состояния мозга у перенесших COVID-19, что проявилось в повышенном содержании медленноволнового тета-ритма в ЭЭГ, сниженной реактивности альфа-ритма, и сниженном уровне функциональной взаимосвязи между разными зонами мозга у перенесших COVID-19 по сравнению с не болевшими индивидами.

Выводы:

1. По результатам спектрального анализа не наблюдалось изменений в альфа-ритме при закрытии глаз. Тета-волны в закрытом глазу были выше у людей с covid по сравнению с нормальным фоновым состоянием. Причина этого заключается в том, что у людей, заболевших ковидом, чаще наблюдается снижение настроения, стрессовые ситуации.

2. На основе спектрального анализа определены характеристики соотношения альфа-и тета-ритмов. У больных ковидом альфа-волны слабо выражены при открытии глаза из-за низкой реакции на свет. По отношению альфы к тете обе группы имели относительно одинаковый показатель.

3. Согласно результатам на основе Корреляционного анализа, у лиц, перенесших covid-19, функциональное соотношение зон коры головного мозга в фоновом режиме было ниже, чем у не болевших. Это означает, что у людей, страдающих covid, реакция контакта зон коры головного мозга друг с другом является ослабленной. По показателю статистической точности эти данные были относительно сопоставимы.

4. Корреляционный и спектральный анализы показали, что у людей, перенесших covid-19, функциональная связь центральной нервной системы относительно ниже, чем у здоровых людей. Это означает, что инфекция COVID-19 может поражать нервную систему через спинномозговую жидкость или через снижение поступающего в ЦНС кислорода.

Исследование спектральных свойств эритроцитов доноров, модифицированных воздействием лекарственного препарата «Мексиприм»

Корвякова П.В.^{1*}, Соколова Л.О.¹, Путинцева О.В.¹
¹Воронежский государственный университет;
lyudmila.sokolova.94@mail.ru

Мексиприм – оригинальный отечественный лекарственный препарат производства АО «НИЖФАРМ» (Нижний Новгород, Россия). Основным действующим веществом является этилметилгидроксипиридинасукцинат (ЭМГПС), относящийся к классу 3-оксипиридинов (3-ОП), а вспомогательным элементом выступает – натрий бисульфит[1]. Препарат обладает широким спектром биологического действия. Он используется для ликвидации антигипоксического, противосудорожного и стресс-протективного воздействия. ЭМГПС ускоряет обменные процессы и кровоснабжение головного мозга, уменьшает агрегацию клеток свертывания крови, стабилизирует мембраны эритроцитов. Однако, ранее нами была установлено, что воздействие препарата «Мексиприм» на суспензии эритроцитов человека способствовало изменению их цитоархитектоники и снижению числа двояковогнутых дискоцитов[2]. Одним из высокочувствительных методов изучения структурного состояния эритроцитов, позволяющим понять биофизические основы взаимодействия клеток крови с модификаторами, является спектрофотометрия в УФ- и видимой области. В связи с вышеизложенным, целью данной работы явилось исследование влияния лекарственного препарата «Мексиприм» на спектральные свойства суспензии эритроцитов крови доноров в течение разного временного периода.

Эритроциты получали из крови доноров в день взятия пробы по методике [3]. Лекарственный препарат «Мексиприм» (АО «НИЖФАРМ» Нижний Новгород, Россия) с концентрацией $3,18 \cdot 10^{-2}$ моль/л добавляли к 9 мл суспензии эритроцитов с концентрацией $5 \cdot 10^6$ кл/мл и инкубировали в суховоздушном термостате ТС-1/80 СПУ (Россия) при $+37$ °С в течение 1 и 24 ч. Электронные спектры поглощения (ЭСП) эритроцитов до и после воздействия лекарственного препарата «Мексиприм» регистрировали на спектрофотометре UV-2401 PC (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 230 до 700 нм через 1 нм при ширине спектральной щели 1 нм.

ЭСП нативных эритроцитов доноров характеризовались наличием двух пиков в УФ-области (273-275 и 341-347 нм) и трех полос поглощения в видимой части спектра (418, 543 и 578 нм). После инкубации интактных эритроцитов при 37°С в течение 1 ч не было обнаружено сдвигов максимумов поглощения и статистически достоверных отличий величин оптической плотности образцов по сравнению с контролем. Модификация эритроцитов лекарственным препаратом «Мексиприм» в течение 24 ч вызывала заметные изменения как УФ-, так и в видимой области ЭСП. Так, значения оптической плотности эритроцитов во всех максимумах ЭСП заметно понижаются, что свидетельствует об уменьшении светорассеивания анализируемых образцов в присутствии модификатора. Кроме того, максимум при 341-347 нм из-за изменений в области контактов гемового и глобинового компонентов белка сместился до 329-334 нм. Одновременно произошло снижение значения оптической плотности в полосе Сорс с $0,816 \pm 0,046$ до $0,675 \pm 0,034$ и её сдвиг до 409 нм, обусловленные накоплением в образцах окисленных форм гембелка – метгемоглобина.

Библиографические ссылки

1. Справочник Видаль: Лекарственные препараты в России / Москва.: Изд-во АстраФармСервис, 2011. — 1728 с.
2. Ковалева С.А., Небольсина А.А., Путинцева О.В., Артюхов В.Г. Исследование цитоархитектоники эритроцитов человека, модифицированных воздействием лекарственного препарата «Мексиприм» и УФ-света / Материалы Всероссийской молодежной конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика, 17». – Пушкино: ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной физики РАН, 2017. – С. 31-32.
3. Артюхов В.Г. Практикум по биофизике / В.Г. Артюхов [и др.] — Воронеж: Изд-во ВГУ, 2016. — 294 с.

Исследование упругих свойств ткани эндометрия при гиперпластических и неопластических процессах с помощью оптической когерентной эластографии

Логинова М.М.^{1,2*}, Плеханов А.А.¹, Губарькова Е.В.¹, Гречканев Г.О.³, Аветисян Е.А.³, Советский А.А.⁴, Зайцев В.Ю.⁴, Гамаюнов С.В.³, Гладкова Н.Д.¹, Сироткина М.А.¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет;

²Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского;

³Нижегородский областной клинический онкологический диспансер;

⁴Институт прикладной физики РАН;

pandaagron@ya.ru

Рак эндометрия представляет собой злокачественное новообразование внутренней эпителиальной выстилки матки и является распространенным гинекологическим злокачественным заболеванием во всем мире. Предшественником рака эндометрия является гиперплазия эндометрия, которая также требует лечения и регулярного наблюдения. Наиболее точным методом диагностики гиперпластических процессов является гистологический анализ ткани, предусматривающий выскабливание полости матки. Данная процедура является травматичной для женщин и может негативно сказаться на репродуктивной функции. Известно, что доброкачественные образования матки за счет гиперплазии желез и содержания небольшого количества фиброзных компонентов, характеризуются мягкой структурой, а начало злокачественной трансформации, наоборот, будет связано с повышением жесткости ткани. Следовательно, оптическая когерентная эластография (ОКЭ), являясь неинвазивным методом, позволяющим по эластическим свойствам определять компоненты и изменения тканей, может стать перспективным инструментом мониторинга гиперпластических процессов в матке. Целью исследования явилось выявление упругих свойств ткани эндометрия в норме, при гиперпластических и неопластических процессах.

Исследование проводилось на *ex vivo* образцах ткани эндометрия в норме, при гиперпластических и неопластических процессах. Методом компрессионной ОКЭ были изучены упругие свойства (жесткость) ткани эндометрия на основе визуализации деформаций, создаваемых в ткани прижатием ОКЭ-зонда и оценки межкадровой вариации градиента фазы сигнала между соседними В-сканами. Использование калибровочного силиконового слоя с известной жесткостью (100 кПа в данной работе) на поверхности ткани позволило количественно оценивать ее упругие свойства (модуль Юнга, кПа) со степенью детализации ~30-50 мкм. Для количественной оценки и сравнительного анализа ОКЭ-изображений ткани эндометрия использовали стандартизированный диапазон давления на ткань (4±1 кПа). Полученные данные сравнивали с результатами гистологического исследования, которое проводили с окраской гематоксилином и эозином и пикрофуксином по Ван Гизону.

Была продемонстрирована способность ОКЭ четко визуализировать различия в ткани эндометрия в норме, при гиперпластических и неопластических процессах. На эластографических изображениях установлено, что в норме постменопаузальный эндометрий имеет однородное распределение низких значений жесткости (~200-250 кПа), что соответствует тонкому атрофичному слою с мелкими и редкими железами. При гиперплазии эндометрия на эластографических изображениях происходило снижение значения жесткости (менее 100 кПа) по сравнению с нормальным эндометрием, что указывает на разрастание ткани и преобладание желез над единичными волокнами соединительной ткани. При раке эндометрия наблюдается неоднородное распределение высоких значений жесткости (более 500 кПа) от крупных железистых структур, сливающихся с волокнами соединительной ткани.

Полученные данные ОКЭ хорошо коррелируют с гистологическими изображениями, что доказывает эффективное применение данного метода в различии доброкачественных и злокачественных поражений эндометрия. В будущем полученный результат может быть использован для неинвазивной оценки состояния эндометрия в реальном времени при гиперпластических и неопластических процессах.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-25-00405.

Исследование физико-химических свойств грудного молока у пациентки на гемодиализной терапии

Филатьева А.Е.^{1*}, Кондакова Е.В.¹, Лобанова Н.А.¹, Нагаев Е.И.², Саримов Р.М.², Гудков С.В.², Ведунова М.В.¹

¹*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского;*

²*Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук;
filatjevaanastasia@yandex.ru*

В настоящее время, благодаря достижениям современной медицины и правильному ведению пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности (тХПН), находящихся на заместительной почечной терапии (ЗПТ), вероятность успешной беременности и рождения здорового ребенка повышается. В связи с этим актуальным является вопрос относительно рекомендаций по грудному вскармливанию у данной группы пациенток.

Материалом для исследования послужили образцы молока пациентки с тХПН, получающей ЗПТ методом программного гемодиализа, осознанным решением которой явилось грудное вскармливание. Образцы были собраны до процедуры гемодиализа, а также сразу после и спустя 4,7,13 часов после её окончания. Контролем явилось молоко здоровых женщин с аналогичным сроком кормления. Содержание креатинина, мочевины, общего белка, альбумина и глюкозы оценивали с помощью автоматического биохимического анализатора DIRUI CS-T240. Для определения размеров частиц молока, отражающих диффузионные свойства составляющих его молекул, использовали метод многоугольного динамического светорассеяния (MADLS). Для определения концентрации белков и количества агрегатов использовали метод флуоресцентной спектроскопии.

В результате было показано значительное увеличение содержания креатинина и мочевины как до, так и после ЗПТ по сравнению с контрольными образцами молока здоровых женщин. При этом самое низкое содержание уремических токсинов наблюдалось через 4 часа после завершения процедуры. Основываясь на данных о MADLS и флуоресцентной спектроскопии можно сделать вывод о присутствии низкомолекулярных соединений в образцах молока пациентки с тХПН, что может быть связано с присутствием токсических веществ, а также о низком содержании белков по сравнению с контрольными образцами. Полученные результаты ставят под вопрос применимость грудного вскармливания у данной группы пациенток.

Работа выполнена при поддержке федеральной программы академического лидерства «Приоритеты 2030» (Н-470-99).

Исследование формирования спиральной волны на сердечной ткани при различных анизотропных свойствах подложки

Щербина С.А.^{1*}, Слотвицкий М.М.¹, Калинин А.И.¹, Бережной А.К.¹, Цвеляя В.А.¹, Агладзе К.И.¹
¹*МФТИ;*

scherbina.sa@phystech.edu

На текущий момент по различным международным исследованиям установлено, что наиболее распространённые заболевания, приводящие к смертности населения, это сердечно-сосудистые заболевания. Для правильной диагностики типа аритмии необходимо глубокое понимание базовых механизмов сердечной деятельности и в норме, и при ее различных нарушениях. Отклонения от нормы в проведении волн возбуждения и распространении импульса по сердечной ткани приводят к аритмии сердца. Наиболее частые нарушения связаны с возникновением спиральных волн реентри. При циркуляции возбуждения и фрагментации спиральной волны в хаотичные цепи возникает фибрилляция сердечной ткани. В возбудимой среде такие спиральные волны могут образовывать множественные вращающиеся центры. Продолжительность реентри в возбудимой ткани поддерживается при сокращении рефрактерного периода среды и длительного времени их проведения. Такие спиральные волны могут образовываться на неоднородных участках ткани, например на постинфарктных рубцах.

В работе были смоделированы кардиослои, имеющие непроводящие участки в виде острого угла, провоцирующие возникновение спиральных волн реентри. Целью данной работы являлось расширение диапазона частот стимуляции, вызывающих образование реентри в зависимости от степени анизотропии.

В данной работе был применен комплексный подход к изучению формирования сердечной ткани в зависимости от внешних условий. Для развития клеточных структур в зависимости от различного окружения использовался метод электроспиннинга (Nanon-01), микроволокна изготавливались из раствора поликапролактона. Для повышения адгезивных свойств подложки, волокна, нанесённые на носитель (культивируемое стекло), покрывали белком фибронектином. Для создания непроводимых участков на образцах использовался обработанный полимер полидиметилсилоксан (ПДМС) в форме прямых углов. В работе использовалась клеточная линия неонатальных кардиомиоцитов, выделенная из лабораторных крыс. Электрофизиологическая активность полученных кардиомиоцитов, в том числе визуализация проведения волн возбуждения их по ткани, проверялась методом оптического картирования с помощью кальций-зависимых красителей. С помощью иммуноцитохимического анализа для получения структурных характеристик клеточные образцы были покрашены на белок клеточного цитоскелета f-актин и на белок сократительного аппарата кардиомиоцитов α -актинин, а также были покрашены ядра клеток на ДНК (DAPI).

В первую очередь была смоделирована система, которая давала широкий коридор критических частот, на которых потенциально может возникнуть волна реентри. Такая система была создана на основе структурных неоднородностей. Обычное тонкое препятствие дает крайне узкий диапазон таких частот в контроле.

Для увеличения коридора критических случаев, при которых реентри возникает, в данной работе изменили структуру самого образца с угловым препятствием, сделав образец анизотропным за счет направленных волокон. Для таких образцов на препятствии формируется подскок волны возбуждения и образуется реентри уже для частоты 3,3 Гц. Реентри по статистике на таких образцах является крайне устойчивой, так как может зацепиться и включить в свое ядро и случайные неоднородности, которые часто встречаются на анизотропных образцах из-за разницы в скоростях проведения.

Было введено 2 типа образца с угловым препятствием: с параллельными волокнами и направленными паттернами волокон. Для первого случая угол ставился таким образом, чтобы одна из стенок угла была перпендикулярна направлению волокон. Для второго случая паттерны составлялись таким образом, чтобы паттерны были перпендикулярно друг другу, а внутри каждого паттерна волокна были параллельны и сонаправлены, по аналогии с буквой «Г». Угол для случая с разным направлением параллельных волокон ставился на границе паттернов. Для случая с анизотропией, созданной одними параллельными волокнами, коридор частот возникновения реентри увеличился: самая большая вероятность возникновения была при стимуляции 5 Гц. С вероятностью 5,6% реентри возникало и при частоте 3,3 Гц.

В случае образцов с разным направлением параллельных волокон, коридор частот возникновения реентри в сравнении с просто параллельными волокнами становился больше, но получение реентри стало стабильнее: с вероятностью 7 % для частоты 3,3 Гц. Также стоит подчеркнуть, что для части образцов (с вероятностью 11%) усвоение ритма стимуляции становилось невозможно уже для 2,5 Гц. Потенциально такие данные могут демонстрировать увеличение коридора критических случаев, особенно для пациентов с мутациями. Для каждой частоты и для образцов с различной анизотропией было проверено более 3 случаев.

Также были проведены эксперименты по возникновению реентри на углу на анизотропных образцах при подаче внешнего электрического стимула с разных сторон угла: вдоль волокон и перпендикулярно им. При стимуляции образца в направлении вдоль волокон отношение скоростей фронтов волны возбуждения составляло $V_{вд}/V_{поп}=1,8$, а при подаче стимула в направлении поперёк волокон наблюдался подскок и разворот волны на большем диапазоне частот, отношение же скоростей составляло $V_{вд}/V_{поп}=0,65$. В первом случае, то есть при подаче импульса вдоль направления волокон, реентри закручивалось на частотах 160-180 мс, в противном случае, то есть при подаче стимула перпендикулярно волокнам, коридор частот реентри составляет от 180 до 250 мс.

Таким образом, в данной работе была подобрана максимально приближенная по физиологическим характеристикам среда для развития и образования возбудимой ткани из кардиомиоцитов для возникновения патологий и критических случаев проведения волн возбуждения. К данным различиям можно отнести увеличение коридора частот проявления критических случаев в случае появления анизотропии, а также анизотропных паттернов, аналогично волокнистой структуре мышцы сердца.

Исследование фракционного состава коллоида мочи экспериментальных животных на различных этапах моделирования нефролитиаза in vivo

Верлов Н.В.^{1*}, Гулина Л.С.¹, Бурдаков В.С.¹, Ланда С.Б.¹, Богданов А.А.², Эмануэль В.Л.³

¹НИЦ "Курчатовский институт" - ПИЯФ;

²ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)»;

³Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова;
verlov_na@pnpi.nrcki.ru

Многие виды животных, также как и человек, в большей или меньшей степени, имеют склонность к формированию камней в почках и мочевыводящих путях. Несмотря на то, что лабораторные грызуны в норме не предрасположены к мочекаменной болезни, в настоящее время разработано и успешно применяется в исследовательской практике несколько моделей, основанных на применении литогенных агентов. В настоящее время считается, что наиболее подходящими животными для исследования процесса камнеобразования в почках являются крысы, мышей, собаки и свиньи. В качестве литогенных агентов наиболее широко применяется этиленгликоль, однако в последнее время часто можно встретить работы, в которых оксалатный уролитиаз моделировали посредством внутрибрюшинного введения раствора оксалата натрия (NaOx). В нашем исследовании мы изучали фракционный состав коллоида мочи в контексте его биофизических свойств, таких как ионный состав и pH, и биохимического состава. В эксперименте участвовали 2 группы самцов аутбредных лабораторных мыши ICR (CD-1) по 12 голов в каждой группе. Животным из контрольной группы однократно делали внутрибрюшинное введение физиологического раствора в объеме 100 мкл, животным в экспериментальной группе внутрибрюшинно вводили 100 мкл раствора NaOx однократно в дозировке 7мг на 100 грамм массы животного. В контрольных точках 4 часа и 24 часа проводили взятие образцов мочи. Анализ фракционного состава в точке 4 часа показал увеличение концентрации частиц в коллоиде мочи животных экспериментальной группы ($7,56 \pm 0,57E8$ частиц в мл, $3,51 \pm 0,24E8$ частиц в мл – в контрольной группе). Через 24 часа после начала эксперимента в моче животных экспериментальной группы концентрация частиц уменьшилась до уровня $2,47 \pm 0,27E8$ частиц в мл, концентрация у животных контрольной группы осталась на прежнем уровне $3,62 \pm 0,25E8$ частиц в мл. Во всех случаях мода распределения приходилась на область 100-110 нм, что соответствует пику олигомерной формы белка уромодулина размером 7 МДа. Уромодулин является уникальным почечным гликопротеином, синтезируемом в толстом восходящем сегменте петли Генле, и составляющем до 60% массы белка в моче. Уромодулин имеет склонность к образованию олигомеров, наиболее часто встречающиеся олигомеры в моче имеют массу 7 МДа и 28 МДа. Анализ микроскопии осадка выявил в точке 4 часа кристаллы оксалатов в моче мышей экспериментальной группы. Также методом микроскопии отсадка было выявлено, что кристаллы окружены белковыми филаментами, хорошо окрашиваемыми бромфеноловым синим. Общеклинический анализ мочи выявил снижение у животных в экспериментальной группе плотности мочи ($1,000$ гр/см³ в точке 4 часа, $1,020$ гр/см³ в точке 24 часа, контроль - $1,030$ гр/см³), увеличение содержания белка (>500 мг/дл в точке 4 часа, 100 мг/дл в точке 24 часа, 30 мг/дл в контрольной группе) и увеличение pH (pH = 8 в точке 4 часа, в точке 24 часа и в контрольной группе pH = 5). Гистологический анализ через 24 часа после индукции патологии выявил следующие изменения в почке экспериментальных животных: множественные кристаллы в нефронах, локализованные преимущественно в толстом восходящем сегменте петли Генле, множественные кровоизлияния. На основании полученных данных можно заключить, что на фоне развития нефролитиаза на первом этапе до 4х часов на фоне процессов кристаллогенеза в процессе формирования вторичной мочи большую роль в стабилизации играет белок уромодулин, который ингибирует рост кристаллов, препятствуя достижения ими размеров 10 мкм и более, когда они перекрывают просвет канальца нефрона. В процессе стабилизации коллоида мочи, в постоянном токе жидкости концентрация белка постепенно снижается, что приводит к увеличению скорости кристаллогенеза и в итоге к закупорке просвета канальца нефрона.

Исследование цитотоксического и радиосенсибилизирующего влияния наноформуляций оксида висмута, покрытых плуроником, на клеточные культуры фибробластов мыши линии 1929 *in vitro*

Колманович Д.Д.^{1*}, Попов А.Л.¹, Шемяков А.Е.¹, Завестовская И.Н.²

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;

²Физический институт им. П. Н. Лебедева РАН;

kdd100996@mail.ru

Все более актуальным становится возрастающий интерес к повышению терапевтической эффективности протонной лучевой терапии. Протонная терапия является хорошо зарекомендовавшим себя методом лучевой терапии для лечения различных видов рака и других заболеваний. Многочисленные исследования показали увеличение частоты гибели клеток вдоль протонной кривой Брегга, что объясняется величиной относительной биологической эффективности (ОБЭ), по сравнению со стандартной фотонной лучевой терапией. Вариабельность ОБЭ протонов зависит от изменения линейной передачи энергии (ЛПЭ). [1] Многообещающая способность наночастиц различных материалов в качестве эффективных радиосенсибилизаторов для локального увеличения дозы опухоли активно изучается различными исследовательскими группами. Наночастицы с элементами с высоким атомным номером рассматриваются как стратегия улучшения нацеливания на опухоли и повышения эффективности лучевой терапии пучками протонов и ионов [2] за счет локализованного увеличения дозы облучения в ткани, заполненной такими наночастицами, по сравнению с нормальной тканью без них. Заряженные частицы могут активировать наночастицы, и образовывать радикалы при взаимодействии электронов, испускаемых наночастицами. Кластеры испускаемых электронов и активных форм кислорода могут приводить к комплексным повреждениям и усиливать гибель клеток. В качестве таких нанодисперсных радиосенсибилизаторов могут выступать соединения висмута.

Относительно низкая токсичность соединений висмута позволяет использовать их в медицинских целях. Так, в лучевой терапии до настоящего времени субцитрат висмута использовался для лечения желудочно-кишечных заболеваний в клинических условиях [3]. Кроме того, висмут с высоким атомным номером используется для рентгеновской компьютерной томографии (КТ) из-за его большого коэффициента ослабления рентгеновского излучения (висмут: 5,74 кэВ) [4]. Мы синтезировали наноформуляции оксида висмута, с последующим покрытием их плуроником. После, было произведено исследование цитотоксических и радиосенсибилизирующих свойств, синтезированных наночастиц с помощью методов МТТ-теста и клоногенного анализа. Исследования проводились на клеточных культурах фибробластов мыши линии L929, которым добавлялись навески наноформуляций оксида висмута, покрытые плуроником. Итоговые концентрации наноформуляций составляли 1, 10, 25 и 50 мкг/мл, после было произведено разделение на не облученные группы и группы клеток, облученные пучком протонов в пике Брегга в дозах 1.5, 3 и 5 Гр.

По результатам исследования с помощью метода МТТ-тест была показано, что наночастицы оксида висмута, покрытые плуроником, не проявляли токсического эффекта без облучения даже при максимальной концентрации (50 мкг/мл). В облученных группах уже при концентрации 1 мкг/мл ($P < 0,0001^{****}$) было выявлено резкое концентрационно-зависимое снижение метаболической активности клеток. Максимум эффекта радиосенсибилизации наночастиц оксида висмута, покрытые плуроником проявлялся при концентрации 50 мкг/мл после облучения пучком протонов в дозе 5 Гр. Стоит отметить, что значения оптической плотности формазана не достигли значения летальной дозы 50 % (ЛД50) и максимум эффекта радиосенсибилизации лежал в пределах ~ 35 %.

Результаты параллельного исследования с помощью анализа клоногенной активности клеток выявил, что наночастицы оксида висмута, покрытые плуроником при концентрации 50 мкг/мл вызывали снижение клоногенной активности клеток в 1,74 раза по сравнению с контрольной группой. В то же время после облучения клеток L929 в дозе 5 Гр, предварительно инкубируемых с наночастицами при концентрации 50 мкг/мл, было выявлено полное прекращение пролиферативной активности клеток.

Таким образом, синтезированные наночастицы оксида висмута, покрытых плуроником можно рассматривать в качестве перспективного нанодисперсного радиосенсибилизатора для радиотерапевтических целей.

Работа выполнена в рамках соглашения с Минобрнауки о предоставлении из федерального бюджета гранта в форме субсидии от 05.10.2021 г. № 075-15-2021-1347 (внутренний номер 15.СИН.21.0017).

Список литературы:

1. Held K., Kawamura H., Kaminuma T., et al. Effects of charged particles on human tumor cells // *Frontiers in Oncology*– 2016. – Vol.6, No.23.
2. Lacombe S., Porcel E., Scifoni E. Particle therapy and nanomedicine: state of art and research perspectives // *Cancer Nanotechnology*- 2017.- Vol. 8. - P.-9

3. Nosrati H. et al. Tumor targeted albumin coated bismuth sulfide nanoparticles (Bi₂S₃) as radiosensitizers and carriers of curcumin for enhanced chemoradiation therapy //ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2019. – Т. 5. – №. 9. – С. 4416-4424

4. Wei, B.; Zhang, X.; Zhang, C.; Jiang, Y.; Fu, Y.-Y.; Yu, C.; Sun, S.-K.; Yan, X.-P. Facile synthesis of uniform-sized bismuth nanoparticles for CT visualization of gastrointestinal tract in vivo. ACS Appl. Mater. Interfaces 2016, 8 (20), 12720–12726.

Калиевый канал типа 1 и эпилепсия

Кодиров С.А.^{1,2,3*}

¹*Institute for Physiology and Pathophysiology, Johannes Kepler University, Linz, Austria;*

²*Институт физиологии им. И.П. Павлова, РАН;*

³*University of Texas at Brownsville, Department of Biological Sciences, Texas 78520, USA;*

skodirov@gmail.com

Зависимые от напряжения каналы K⁺ (Kv) разнообразны, включая классические семейства Shab-Kv2, Shaker-Kv1, Shal-Kv4 и Shaw-Kv3. Только семейство Shaker состоит из Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6 и Kv1.7. Кроме того, семейство Shab включает две функциональные (Kv2.1 и Kv2.2) и несколько «молчащих» альфа-субъединиц (Kv2.3, Kv5, Kv6, Kv8 и Kv9), которые не генерируют K-ток. Однако, например, Kv8.1 посредством гетеромеризации ингибирует внешние токи того же семейства или даже Shaw. Это свойство Kv8.1 аналогично свойствам определенных бета-субъединиц или неселективных вспомогательных элементов, включая ADAM или AMIGO. Каналы Kv и, в свою очередь, ADAM могут модулировать LTP. Преимущественно Kv1.1 и Kv1.5 связывают с соответствующими патологиями головного мозга и сердца. Вышеупомянутые белки каналов, по-видимому, вовлечены в несколько патологий головного мозга, включая шизофрению и судороги.

Клеточные нарушения в фибробластах с мутациями, ассоциированными с развитием болезни Паркинсона

Крицкая К.А.¹, Федотова Е.И.^{1,2*}, Бережнов А.В.^{1,2}

¹*ИБК РАН - ФИЦ ПНЦБИ РАН;*

²*ОГУ имени И.С. Тургенева;*

delf-fenka@rambler.ru

Болезнь Паркинсона (БП) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, при котором происходит гибель дофаминергических нейронов в черной субстанции. В литературе описаны наследственные формы БП, для которых характерны мутации в ряде генов, кодирующих белок альфа-синуклеин (мутации A30P, E46K, A53T и мультипликации генного локуса SNCA) и белки, связанные с митохондриальными функциями (мутации в генах PINK1, LRRK2, двойная мутация PINK1/Parkin). Много исследований посвящено выяснению молекулярных механизмов развития БП, среди которых выявлены накопление агрегатов альфа-синуклеина, митохондриальные нарушения, апоптотическая и неапоптотическая программируемая гибель клеток, нарушения аутофагии, стресс эндоплазматического ретикулума и нарушения кальциевого гомеостаза.

Считается, что ключевую роль в патогенезе БП играет дисфункция митохондрий. При этом нарушается работа комплекса I электрон-транспортной сети, усиливается продукция активных форм кислорода (АФК), накапливаются нарушения митохондриальных ДНК и изменяется активность митохондриальной сети. В настоящее время предполагается, что умеренная активация процессов, связанных с ремоделированием митохондриальной сети, таких как слияние и деление митохондрий и митофагия, может помочь нейронам избежать гибели во время болезни Паркинсона и вернуться к нормальной жизнедеятельности.

В работе были исследованы особенности наследственных клеточных моделей БП – культур фибробластов человека с мутациями в генах PINK1 и LRRK2, приводящих к развитию данной патологии, а также выявлены отличия исследуемых культур клеток от контрольных.

Методами флуоресцентной и конфокальной микроскопии было показано, что в клетках с мутацией PINK1 уровень внутриклеточного pH ниже, чем в контрольной культуре фибробластов, что может быть связано с измененным уровнем митофагии/аутофагии.

Нами был исследован уровень мито/аутофагии. Показано, что степень колокализации митохондрий и лизосом в фибробластах с мутациями значимо не отличалась от контрольных клеток. При анализе изменения уровня экспрессии мРНК генов-маркеров ауто/митофагии в модельных клетках выявлено увеличение экспрессии в генах, кодирующих белки Nix и Fundc1, участвующих в альтернативном (неканоническом) пути митофагии, опосредованном рецепторами, что указывает на компенсацию функций, затронутых мутациями.

Были оценены морфология и динамика митохондриального ретикулума (сети) в клеточных моделях БП и выявлено уменьшение средней длины митохондрий как в составе митохондриальных сетей, так и для индивидуальных митохондрий в клетках с мутацией PINK по сравнению с контролем. Данные подтверждены анализом экспрессии связанных с митохондриальной динамикой генов, в результате которого увеличивается уровень мРНК Fis1, отвечающего за митохондриальное деление.

Были выявлены различия биоэнергетического состояния клеток, а именно в уровнях митохондриального потенциала, NADH и восстановленного глутатиона, между контролем и клеточными моделями БП. В клетках с мутациями наблюдалось снижение митохондриального потенциала и уровня восстановленного глутатиона по сравнению с контрольными фибробластами.

Было определено, что скорость продукции АФК в митохондриях повышена в клетках с мутацией PINK1 относительно контрольных клеток. При этом мутантные клетки отличались сниженной кальциевой буферной емкостью митохондрий.

Была оценена жизнеспособность клеток в культурах фибробластов: количество мертвых клеток значимо не отличалось в контрольной культуре и в мутантных клетках. Исследование генов-маркеров апоптоза выявило увеличение экспрессии лишь нескольких генов. Однако мутантные клетки оказались более чувствительны к стрессу, индуцированному добавлением экзогенной перекиси водорода.

Таким образом, в работе было показано, что в клетках с мутацией PINK1 уровень pH ниже, чем в контрольной культуре фибробластов. Несмотря на то, что базальная митофагия не увеличена в мутантных клетках, оценка морфологии митохондриальной сети в клетках PINK1 показала, что нарушена длина митохондрий в митохондриальных сетях и индивидуальных митохондриях. Также в этих клетках была повышена скорость продукции митохондриальных АФК, выявлены нарушения биоэнергетики и понижена кальциевая буферная емкость митохондрий. При этом жизнеспособность клеток в мутантных культурах в покое не отличается от таковой контрольных фибробластов.

Работа выполнена в рамках проекта РФФ № 22-24-01043.

Кодирование биологически значимых временных интервалов звуковых последовательностей нейронами высших слуховых центров наркотизированных и бодрствующих мышей

Егорова М.А.^{1*}

¹ИЭФБ РАН;

ema6913@yandex.ru

Установление механизмов временного анализа коммуникационных сигналов слуховой системой человека и животных является одной из основных и трудно решаемых нейрофизиологических проблем, привлекающих внимание ведущих мировых исследователей слуха. Несмотря на усилия, предпринятые в этой области, вопросы о том, на основе каких принципов временной анализ коммуникационных сигналов осуществляется в слуховых центрах мозга, и в чём проявляется специализация нейронов, участвующих в этом анализе, остаются без ответа.

Подавляющее большинство биоакустических сигналов, включая речь человека, состоит из последовательно генерируемых звуковых событий (Bregman, 1990; Gaub, Ehret, 2005). Очевидно, что при распознавании этих звуков принципиальную важность приобретает их временная структура, в том числе интервалы между звуковыми событиями. В качестве механизма, обеспечивающего способность слуховой системы группировать звуковые последовательности в единое слуховое событие, разделять их во времени и распознавать как биологически значимые, рассматривается постстимульная слуховая адаптация – одна из наиболее ярких форм пластичности мозга, непосредственно связанная с обработкой сенсорной информации (Бибиков, 2010; Ulanovsky, 2004).

В представленной работе показано участие нейрональной адаптации во временной обработке биологически значимых акустических сигналов на примере последовательностей коммуникационного сигнала мышей – крика дискомфорта мышат.

В экспериментах производили внеклеточную регистрацию импульсной активности одиночных нейронов слухового центра среднего мозга (центрального ядра заднего холма), а также первичных полей слуховой коры (первичного и переднего) домовых мышей *Mus musculus*, самок гибридов F1 линий CBA и C57BL/6 в возрасте 8

- 15 недель. Эксперименты выполняли как в условиях общей анестезии, поддерживаемой инъекциями смеси кетамина (кетавет, 35 мг/кг) и ксилазина (ромпун, 0.1 мг/кг), так и на бодрствующих животных. Стимулами служили серии звуков, образованные четырьмя 100-мс тональными сигналами, включая время нарастания и спада по 5 мс. Частота сигналов соответствовала характеристической частоте нейрона, а уровень составлял 40 дБ над порогом ответа, что соответствовало области оптимального ответа большинства нейронов. Интервал между тональными составляющими одной серии был одинаков, а в различных сериях варьировал от 0 до 1000 мс. Ответы одиночных нейронов на тональные последовательности регистрировали при межстимульных интервалах, равных 0, 2, 4, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 700 и 1000 мс. Каждую серию предъявляли 20 раз с интервалом в 2 секунды. Подбор параметров серий стимулов и межстимульных интервалов был произведен с учетом результатов психофизического исследования взаимосвязи звукопродукции и восприятия последовательностей криков дискомфорта мышат (Ehret, Riecke, 2002; Gaub, Ehret, 2005). В естественных условиях мышата излучают крик дискомфорта в виде серий из 2-5 сигналов, при этом мыши-матери воспринимают естественный крик и его модели как значимые, если они следуют сериями из четырех сигналов с интервалами 100 – 400 мс.

Исследовали временную динамику постстимульной адаптации одиночных нейронов, т.е. зависимость степени проявления адаптации (числа спайков в ответе нейрона на каждый сигнал в серии) от межстимульного интервала в последовательности моделей крика дискомфорта (кривые восстановления ответа от адаптации).

Две трети нейронов слухового центра среднего мозга и все нейроны первичных областей слуховой коры домовой мыши демонстрировали эффект адаптации в ответах на серии моделей крика дискомфорта мышат. Эффект проявлялся как у бодрствующих, так и у наркотизированных мышей. Он выражался в отсутствии или уменьшении ответов нейронов на сигналы, следовавшие за первым сигналом в серии звуков, при относительно коротких интервалах между ними (0- 50 мс в заднем холме, 0 – 100 мс в слуховой коре). Функции восстановления ответа на 2-ой, 3-ий и 4-ый сигналы в серии возрастали с увеличением межстимульного интервала вплоть до полного восстановления ответа. Восстановление от адаптации носило более или менее выраженный монотонный характер. У разных нейронов восстановление ответов начиналось при различных межстимульных интервалах (4 – 50 мс в заднем холме, 10 – 200 мс в слуховой коре). Полное восстановление ответов, когда их величина не отличалась от ответа на первый компонент серии, наблюдалось при межстимульных интервалах от 200 мс до 1000 мс. Статистический анализ временной динамики адаптации по всей популяции исследованных нейронов показал, что при межстимульных интервалах 0 – 200 мс ответ на первый сигнал серии достоверно превышал ответы на 2-ой, 3-ий и 4-ый сигналы как в центральном ядре заднего холма, так и в слуховой коре (ANOVA on ranks, Dunn's test, $p < 0.01$). Между собой ответы на 2-ой, 3-ий и 4-ый сигналы в серии не различались. Начиная с межстимульного интервала 500 мс, ответы нейронов на все сигналы серии достоверно не различались. Таким образом, во временном интервале 0 – 500 мс наблюдалось явление адаптации активности исследуемых нейронов к повторяющимся сигналам. Временной диапазон проявления адаптации к серии моделей (0 – 500 мс) соответствовал временному диапазону интервалов в серии криков дискомфорта мышат, важному для запуска оптимального материнского поведения. Варьирование индивидуальных временных шкал адаптации отдельных нейронов может быть значимым для формирования оптимальных временных окон при анализе группирования и разделения звуковых событий, важных для восприятия биоакустических сигналов животных и речи человека.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00074, <https://rscf.ru/project/23-25-00074/>.

Литература

Бибиков Н.Г. Успехи физиол. наук. 2010. Т. 41. № 4. С. 77.

Bregman A.S. Auditory scene analysis. The Perceptual Organization of Sound. Cambridge, MA: MIT Press. 1990.

Ehret G., Riecke S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. N 1. P. 479.

Gaub S. Ehret G. J. Comp. Physiol. 2005. V. 191. P. 1131.

Колориметрический метод определения роста микобактерий и МИК с использованием нового портативного микробиологического анализатора

Сычев А.В.^{1*}, Лаврова А.И.^{2,3}, Догондзе М.З.³, Постников Е.Б.⁴

¹Курский государственный университет, НИЦ физики конденсированного состояния;

²Санкт-Петербургский государственный университет, медицинский факультет;

³Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии;

⁴Курский государственный университет, отдел теоретической физики;

sychev1113@gmail.com

Использование изменения окраски индикатора для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) было предложено достаточно давно как дешевая альтернатива радиометрическим и флюориметрическим методам [1]. Ключевым индикатором для этого анализа является резазурин (также известный как аламаровый синий), который имеет синий цвет, изменяющийся на розовый, когда резазурин восстанавливается до резорурфина из-за митохондриальной дыхательной активности жизнеспособных микроорганизмов. Однако, будучи применяемым таким образом, он оставался качественным методом. Напротив, в нашей работе мы обращаемся к этому подходу количественно, раскрывая возможность определения параметров как кривой роста микобактерий, так и функционального отклика *M. tuberculosis* (MbT) на концентрацию препарата.

Работа выполнена на новом разработанном портативном микробиологическом анализаторе [2] (патент RU2779840C1, дата приоритета 2021-04-26) с использованием стандартного микобактериального штамма H37Rv в условиях роста в отсутствие лекарственного воздействия и под действием важного противотуберкулезного препарата первого ряда – изониазида. Установка позволяет автоматически регистрировать светопропускание ячеек микробиологического планшета в настроенном спектральном диапазоне с временным шагом 15 мин. Такая дискретизация дает возможность высокоточной регрессии данных сигмоидальными кривыми, описывающими двумерные карты динамики роста.

Отдельное обсуждение будет посвящено биохимическим и биофизическим механизмам, лежащим в основе количественной оценки процесса. Оно включает: (1) установление соответствия между концентрациями сосуществующих химических веществ, определяемыми спектральными методами, и компонентами фотометрического цветового пространства; (2) эффекты синхронизации роста и деления клеток в колониях микобактерий, что отражается в ступенчатости фотометрических кривых, обсуждаемых в сравнении со спектрофлуориметрическими [3].

[1] Yajko, D.M.; Madej, J.J.; Lancaster, M.V. et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, 33, 2324-2327.

[2] Sychev, A.V.; Belenkov, R.N.; Ukolov, D.N.; Budaev, A.V.; Lavrova, A.I.; Postnikov, E.B. Revealing kinetics of chemical transitions in colorimetric indicators of microorganisms growth based on photometric data from a portable microbiological analyser. *Proc. SPIE*. 2022, 12194, 121940Z.

[3] Lavrova, A.I.; Dogonadze, M.Z.; Sychev, A.V.; Manicheva, O.A., Postnikov, E.B. Ensemble density-dependent synchronization of mycobacterial growth: BACTEC MGIT 960 fluorescence-based analysis and mathematical modelling of coupled biophysical and chemical processes. *AIMS Microbiol.*, 2022, 8208

Комплекс низкомолекулярных пептидов коллагена и гликозаминогликанов для профилактики и лечения болезней опорно-двигательного аппарата

Николаева Т.И.^{1*}, Лауринавичюс К.С.², Молчанов М.В.¹, Кузнецова С.М.¹, Емельяненко В.И.¹, Шеховцов П.В.¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН;

tomivnik@yandex.ru

Болезни опорно-двигательного аппарата человека представляют как медицинскую, так и биологическую проблему. При таких болезнях разрушается структура соединительных тканей, их основных компонентов: коллагеновых фибрилл и протеогликанов. Для решения этой проблемы в РФ и за рубежом применяют гликозаминогликаны (хондропротекторы). Однако хондропротекторы не восстанавливают полностью структуру ткани. Другой попыткой является применение гидролизатов коллагена в ряде стран [1].

Одним из перспективных решений этой проблемы является получение нутрицевтиков на основе гидролизата коллагена, содержащего низкомолекулярные пептиды в комплексе с гликозаминогликанами. Низкомолекулярные пептиды могут выполнять не только строительную, но и регуляторную функцию. Известно, что ди- и трипептиды коллагена регулируют функции нейроэндокринной и иммунной систем [2].

Недостающие концентрации коллагена и протеогликанов можно восполнить веществами, полученными из соединительных тканей сельскохозяйственных животных. Мы разработали природоподобную технологию получения комплекса пептидов коллагена и гликозаминогликанов, которая включает этапы гомогенизации сырья и ферментативного гидролиза. Доступность ферментов для молекул коллагена, упакованных в фибриллы, облегчается для частиц минимального размера. Такие частицы получали в гомогенизаторе высокого давления «Донор-3», в условиях повышенных значений температуры и давления. Мы исследовали ферментативный гидролиз биополимеров хрящевой ткани в зависимости от pH, температуры, концентрации ферментов и продолжительности процесса. Было проверено действие ферментных препаратов на основе папаина российских производителей карипазима, которые выпускают в ЗАО «Вифитех» и ООО «МедФлорина» в п. Оболенск Московской обл.

Сравнительный анализ физико-химических свойств гомогенатов, полученных в зависимости от условий гомогенизации показал, что при температурах 70°C и 80°C получены образцы с разными свойствами. Более гомогенный образец гиалиновых хрящей получен при температуре 80°C. Более полная денатурация коллагена также происходит при температуре 80°C. Размеры частиц в гомогенате при 80°C в полтора раза меньше, чем при 70°C. Молекулы коллагена в гомогенате при 80°C более доступны для действия ферментов. Таким образом, мы определили оптимальную температуру гомогенизации хрящей, равную 80°C.

Степень гидролиза была выше у гидролизатов, полученных под действием карипазима ООО «МедФлорина». После действия карипазима на гомогенат при температуре 50°C, концентрации фермента 5% пептидный профиль был расположен в интервале от 240 до 780 Da. При повышении температуры до 55°C, а концентрации карипазима до 10% образуются более низкомолекулярные пептиды в интервале от 240 до 620 Da. С помощью метода ЯМР получены спектры, на которых идентифицированы пептиды и гиалуроновая кислота. Распределение молекулярных масс олигосахаридов гликозаминогликанов расположено в диапазоне от 240 до 720 Da. Таким образом, мы получили комплекс низкомолекулярных пептидов коллагена и гликозаминогликанов. Если сравнивать молекулярные массы гидролизатов коллагена, полученные нами, с импортными аналогами, следует отметить, что мы создали образцы, не уступающие «Flexinovo» (Польша), и имеющие преимущества по сравнению с «BioCell Collagen II» (США).

1. Lopez H. L. Amer. Acad. Physic. Med. Rehab. 2012. V. 4. P. S155 - S168.

2. Бакаева З.В. и др. Бюлл. Экспер. Биол. и Мед. 2018. Т.165. С.438-442.

Лактат в слюне - индикатор физической работоспособности спортсмена

Гук П.В.¹, Степанова Л.В.^{1*}, Вышедко А.М.¹, Сутормин О.С.¹, Коленчукова О.А.^{1,2}, Жукова Г.В.¹,
Кратасюк В.А.^{1,3}

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия;

²Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия;

³Институт Биофизики СО РАН, Красноярск, Россия;

slyudmila@mail.ru

Одним из важных показателем работоспособности организма спортсмена является содержание молочной кислоты (лактата) в крови.

Слюна, содержащая большое количество белков, ферментов, генетических молекул, отлично подходит в качестве диагностического материала для экспресс-анализов. Многие соединения, содержащиеся в крови, также присутствуют и в слюне, следовательно, она функционально эквивалентна сыворотке крови, и может определять физиологическое состояние организма. Слюна в отличие от крови очень динамичная биологическая жидкость и изменения ее компонентного состава при физическом напряжении организма происходит гораздо раньше, чем в крови [1, 2].

Тестирование слюны является простым, безопасным и неинвазивным способом выявления работоспособности спортсмена и обладает высоким потенциалом для развития диагностических методов в спортивной медицине в качестве инвазивной технологии для использования и принятия решений об утомлении организма. В настоящее время отсутствует сравнительный анализ содержания лактата в слюне и в крови спортсменов, занимающиеся разными видами физической нагрузки. Полагаем, что содержание лактата в слюне более стабильно и приемлемо для анализа.

Цель исследования: выявление содержания лактата в слюне как показателя физической работоспособности спортсмена.

В исследовании принимали участие спортсмены (n=31), занимающиеся санным спортом (n=5), лыжными гонками (n=9), конькобежным спортом (n=7) и бобслеем (n=10), имеющие квалификацию 1 разряд, кандидат в мастера спорта (КМС), мастер спорта (МС).

Испытуемые выполняли на велоэргометре нагрузку с возрастающей мощностью (продолжительность нагрузки 5 мин). В начале и конце нагрузки (последние 30 сек работы на определенном уровне мощности) регистрировали частоту сердечных сокращений (ЧСС) по электрокардиограмме, отбирали кровь и слюну на содержание лактата.

Молочную кислоту (лактат) в слюне определяли спектрофотометрическим методом (спектрофотометр UV-1800, «Shimadzu», Япония) при колориметрировании слюны с хлоридом железа III на длине волны 440 нм.

Содержание лактата в крови до и после нагрузки на велоэргометре были предоставлены сотрудниками Центра лечебной физкультуры и спортивной медицины МАУ "НПЦСМ".

Математическую обработку данных проводили в программе Statistica 10 (StatSoft Inc., США) с подсчетом медианы (Me) и интерквартильных разбросов (C25-C75 процентиля). Корреляционную связь рассчитывали по критерию Спирмена, достоверность различий между показателями оценивали по непараметрическому критерию Вилкоксона. Уровень статистической значимости считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты тестирования функционального состояния организма спортсменов показали, что ЧСС после нагрузки достоверно выше, чем в состоянии покоя ($p = 0,00001$) независимо от квалификации и вида нагрузки (аэробной или анаэробной), с которую тренируются спортсмены.

Достоверного различия в содержании лактата в слюне и крови до нагрузки не выявлено. Содержание лактата до физической нагрузки было наименьшим для спортсменов высшей квалификации, как в слюне, так и в крови, и наибольшим для спортсменов с квалификациями 1 разряд и КМС, как в слюне, так и в крови.

Содержание лактата также зависело от вида физической нагрузки, которыми занимаются спортсмены. Спортсмены, занимающиеся аэробными физическими нагрузками (лыжные гонки), имели наименьшее содержание лактата в слюне и наибольшее его содержание в крови. Спортсмены, занимающиеся анаэробными физическими нагрузками (санный спорт, конькобежный спорт, бобслей), наоборот, имели наибольшее содержание лактата в слюне и наименьшее его содержание в крови.

После физической нагрузки независимо от вида физической нагрузки содержание лактата в слюне спортсменов незначительно повышалось, в крови оно было гораздо больше и достоверно выше ($p = 0,00001$).

Для начинающих спортсменов после физической нагрузки содержание лактата повышалось как в слюне так и в крови ($p = 0,01$). Содержание лактата в слюне спортсменов с квалификациями КМС и МС после нагрузки не изменялось, но в крови достоверно возрастало ($p = 0,0006$).

Таким образом, содержание лактата в слюне в состоянии покоя сравнимо с его показателем в крови лишь для спортсменов высшей квалификации, занимающиеся аэробным видом спорта. Содержание лактата в слюне в состоянии покоя для спортсменов с квалификацией КМС и начинающих спортсменов (1 разряд) выше по сравнению с его содержанием в крови преимущественно для спортсменов, занимающиеся анаэробным видом спорта. Физические нагрузки повышали содержание лактата в слюне начинающих спортсменов, и изменение лактата было незначительным для спортсменов с квалификацией КМС и МС независимо от вида спорта, которым они занимаются. Содержание лактата в крови, наоборот, резко повышалось для спортсменов высшей квалификации и значительно для спортсменов с квалификацией КМС и 1 разряд независимо от вида спорта.

Видимо, в режиме работы спортсмена с высоким ЧСС буферная система крови накопила максимальную концентрацию лактата. В то же время содержание лактата в слюне изменяется лишь для начинающих спортсменов. Известно, что спортсмены высшей квалификации имеют низкую концентрацию лактата, что характеризует их высокую спортивную работоспособность организма по отношению к начинающему спортсмену, у которого организм неподстроен под физические нагрузки. Следовательно, по содержанию лактата в слюне можно определить работоспособность организма.

1. Бельская Л. В., Голованова О. А., Турманидзе В. Г., Шукайло Е. С. Перспективы использования результатов анализа слюны при планировании тренировочного режима спортсменов//Омский научный вестник. 2011. №6 (102). - С. 175-178.

2. Koshechkin K. A., Kozlovich A.V., Kotikov V.N., Mironov A.N. The review of the list and the features of the software for statistical data processing when performing expert work//Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin. 2014. №3: 46–51.

Магнитные и золотые наночастицы в живых системахХомутов Г.Б.^{1*}¹МГУ, физический факультет;gbk@mail.ru

Более шестидесяти лет назад Л.А. Блюменфельдом с сотрудниками впервые в мире были получены экспериментальные данные, указывающие на присутствие ферромагнитных или суперпарамагнитных наночастиц оксидов железа в культурах одноклеточных организмов и в препаратах ДНК (так называемые широкие линии сигнала ЭПР) [1]. К настоящему времени биогенные магнитные структуры на основе оксида железа (в основном квази-линейные цепочечные ансамбли магнитных однодоменных наночастиц оксида железа) уже найдены в самых разных живых организмах от бактерий и растений до насекомых, рыб, птиц и животных включая человека. Такие структуры могут играть важную физиологическую роль (обеспечивают ориентацию соответствующих организмов в магнитном поле Земли) и образуются в результате процессов биоминерализации, или могут являться продуктом и, соответственно, биомаркером определенных патологий (например, у человека присутствие магнитных оксидов железа коррелируют с нейродегенеративными заболеваниями). Нано-фазное металлическое золото также может генерироваться живыми системами (например, бактериями) и образуется в ходе окислительно-восстановительных процессов как результат биогенного восстановления ионов Au(III) водной фазы.

В настоящее время магнитные и золотые наночастицы, а также функциональные наносистемы на их основе являются основными и наиболее важными объектами исследований в ряде фундаментальных и прикладных областей науки включая нано-инженерию и практическую биофизику [2]. Ввиду определенной «биогенности» и соответствующей малотоксичности именно наночастицы магнитных оксидов железа и наночастицы металлического золота представляют наибольший интерес для современных и перспективных биомедицинских применений, включающих высокоэффективные средства диагностики и новые технологии лекарственной терапии на основе управляемого пространственно-временного сопряжения процессов доставки и активации лекарственных препаратов в локальных целевых областях организма [3].

В данном сообщении представлен подход к решению проблемы управляемой адресной доставки лекарственных препаратов в живых системах, основанный на принципах биомиметики и предполагающий использование максимально биосовместимых и нетоксичных функциональных материалов, встречающихся в живых системах (липидов и биогенных амфифильных молекул, полимеров, наночастиц магнитных оксидов железа и металлического золота) для создания новых биосовместимых коллоидных систем, чувствительных к внешним управляющим физическим и/или химическим воздействиям, для капсулирования средств диагностики, лекарственных препаратов и других биологически-активных веществ с целью их направленной адресной доставки в определенную целевую область организма, а также для их управляемого высвобождения в целевой области в нужное время и в нужном количестве. Разрабатываемые коллоидные носители лекарств представляют собой биомиметические биосовместимые липосомальные и полимерные конструкции. Преимущества использования липосом в качестве основы для создания средств капсулирования связаны с их биомиметической структурой и биосовместимостью, а также с универсальностью, обусловленной возможностью капсулировать в липосомах вещества самой разной природы – низкомолекулярные и высокомолекулярные, гидрофильные, гидрофобные и амфифильные соединения. [4, 5]. Использование биосовместимых и биodeградируемых полимеров открывает дополнительные возможности создания и модификации носителей лекарственных препаратов.

Важной и актуальной в настоящее время остается задача разработки эффективных и безопасных методов управления структурно-функциональными характеристиками коллоидных средств капсулирования посредством внешних физических и/или химических воздействий для обеспечения управляемого высвобождения капсулированных веществ в целевой области организма в нужное время и в нужном количестве. В нашем подходе в качестве максимально безопасных внешних управляющих физических воздействий, обеспечивающих избирательное дистанционное управление проницаемостью нанокомпозитных липидных везикул, используются нетермические воздействия ультракоротких электрических импульсов, обеспечивающих эффект избирательной электропорации липидных мембран, содержащих поляризующиеся во внешнем электрическом поле электропроводящие наночастицы, а также внешние магнитные поля, обуславливающие эффекты управления пространственной локализацией магнитных коллоидных носителей лекарств и магнитной деформации таких нанокомпозитных материалов [5]. Особый интерес представляют комбинированные внешние воздействия, при которых возможны эффекты синергизма и увеличение суммарной эффективности управления локализацией и состоянием коллоидных носителей лекарств.

1. Цапин А.И., Самойлова О.П., Блюменфельд Л.А. Закономерности изменения магнитных характеристик клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на различных стадиях роста культуры, Биофизика, 1989, Т.34. №4. с.630-634.

2. Giersig M., Khomutov G.B., (Editors.), *Nanomaterials for application in medicine and biology*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2008, 188p.

3. Кокшаров Ю.А., Губин С.П., Таранов И.В., Хомутов Г.Б., Гуляев Ю.В., *Магнитные наночастицы в медицине: успехи, проблемы, достижения*, Радиотехника и электроника, 2022, Т.67, №2, с.99-116.

4. Khomutov G.B., Kim V.P., Koksharov Yu.A., Potapenkov K.V., Parshintsev A.A., Soldatov E.S., Usmanov N.N., Saletsky A.M., Sybachin A.V., Yaroslavov A.A., Taranov I.V., Cherepenin V.A., Gulyaev Y.V., *Nanocomposite biomimetic vesicles based on interfacial complexes of polyelectrolytes and colloid magnetic nanoparticles*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2017, V.532, p.26–35.

5. Гуляев Ю.В., Черепенин В.А., Таранов И.В., Вдовин В.А., Хомутов Г.Б., *Активация нанокompозитных липосомальных капсул в проводящей водной среде ультракоротким электрическим воздействием*, 2021, Т.66, №1, с.82-90.

Магнитотактические бактерии: магнитные параметры магнитосом внутри *Magnetospirillum* spp

Рыжов В.А.^{1*}, Дериглазов В.В.¹, Груздев Д.С.², Козяева В.В.^{3,4}, Киселев И.А.¹, Ларионов И.И.¹, Гареев К.Г.^{4,5}, Ситков Н.О.^{4,5}, Зимина Т.М.^{4,5}, Марченко Я.Ю.¹, Федоров В.С.^{4,7}, Шевцов М.А.^{4,6,7}

¹*Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Russia;*

²*SciBear OU, Tallinn, Estonia;*

³*Research Center of Biotechnology of the RAS, Institute of Bioengineering, Moscow, Russia;*

⁴*Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia;*

⁵*Department of Micro and Nanoelectronics, Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”, Saint Petersburg, Russia ;*

⁶*Center of Translational Cancer Research (TranslaTUM), Klinikum Rechts der Isar, Technical University Munich, Munich, Germany;*

⁷*Personalized Medicine Centre, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia;*
ryzhov_va@pnpi.nrcki.ru

Магнитотактические бактерии представляют собой группу организмов, хорошо изученных в последние годы из-за их интересного магнитного поведения и потенциальных применений в тераностике, гипертермии и биосенсорных устройствах благодаря внутриклеточным цепочкам субмикронных магнитных частиц, заключенных в мембрану, называемых магнитосомами [1]. Магнитные параметры магнитосом внутри бактерий рода *Magnetospirillum*, фиксированных 5% формалином в питательной среде, оценивали по измерениям: 1) нелинейного продольного отклика на слабое переменное магнитное поле (НПО-М2) с регистрацией второй гармоники намагниченности [2] от штаммов MSR-1, LBB-42, AMB-1, SP-1, BB-1 и SO-1; и (ii) спектров электронного магнитного резонанса (ЭМР), полученных на специальном спектрометре X-диапазона для регистрации широких линий [3] для штаммов BB-1, MSR-1 и AMB-1. Для отслеживания эволюции магнитного состояния магнитосом при длительном хранении исследовали свежеприготовленные образцы (S1) и образцы после года хранения при 4°C (S2). Измерения нелинейного отклика при частоте сканирования постоянного магнитного поля 0,02 Гц свидетельствовали о стабильном однодоменном состоянии магнитных центров в магнитосомах, в близком к суперпарамагнитному (СПМ) режиме. Это позволило провести полуколичественный анализ данных М2 с помощью формализма, основанного на численном решении кинетического уравнения Фоккера-Планка для СПМ частиц. Обработка данных НПО-М2 показала наличие двух типов магнитосом: (i) с большим магнитным моментом («тяжелая», монодисперсная мода) и (ii) со сравнительно малым магнитным моментом («легкая», дисперсная мода), как в S1, так и в S2 образцах. Спектры ЭМР регистрируются преимущественно от «тяжелой» фракции для обоих образцов из-за образования агрегатов магнитосом в «легкой» фракции, сопровождающегося подавлением их магнитного момента вследствие дипольных корреляций в соответствии с М2 данными. Наличие двух пиков в спектрах свидетельствует о наличии у магнитосом одноосной магнитной анизотропии. Появление одного-двух дополнительных пиков в спектрах у S2 образцов некоторых штаммов вместо широкой диффузной линии, с одной стороны, свидетельствует об их нестабильности при длительном хранении даже при фиксации формалином и запечатывании в атмосфере азота, с другой стороны, о том, что разрушение цепочек магнитосом при длительном хранении происходило не случайным образом. Атомно-силовая микроскопия состояния ансамбля бактерий в среде после длительного хранения одного типичного штамма (BB-1) подтвердила этот вывод и показала частичную деградацию нативной магнитосомной цепи на более короткие цепочки, образующие агрегаты.

Эта работа была частично поддержана грантами РФФ № 22-15-00240 и № 23-25-00273.

[1] Gareev K. G. et al. Magnetotactic Bacteria and Magnetosomes: Basic Properties and Applications.// *Magnetochem.* 7, 86, 2021.

[2] Рыжов В.А., Ларионов И.И., Фомичев В.Н. Исследование продольной нелинейной восприимчивости магнитов на второй гармонике частоты возбуждения и паразитный сигнал.// *ЖТФ.* т. 66(6), 183, 1996.

[3] Рыжов В.А., Завацкий Е.И., Соловьев В.А., Киселев И.А., Фомичев В.Н., Бикинцев В.А. Спектрометр для исследования широких дипольных магнитных переходов в магнетиках и холловской проводимости на микроволновой частоте в проводящих материалах.// *ЖТФ.* т. 65, 133, 1995.

Мембранная активность трех-петельных цитотоксинов кобр зависит от критических аминокислотных остатков в N-концевой и центральной петлях

Дубовский П.В.^{1*}, Уткин Ю.Н.¹

¹*ИБХ РАН;*

pvdubov@ya.ru

Цитотоксины (ЦТ) кобр — основной компонент их яда, отвечающий за некроз поражённых ядом тканей. Полагают, что в основе этого — мембранная активность ЦТ. Неудивительно поэтому, что ЦТ обладают цитотоксической и антибактериальной активностями, как и многие мембраноактивные пептиды [1].

В базе данных белковых структур (<https://www.uniprot.org>) имеется более 80-ти представителей семейства ЦТ. Эти полипептиды длиной 59-61 аминокислотных остатка принадлежат семейству трёх-петельных белков. Их характерная структурная особенность — наличие трёх бета-структурных шпилек, скреплённых 4-мя дисульфидными связями. С липидными мембранами ЦТ взаимодействуют окончаниями бета-шпилек, или петлей. Именно эти области наиболее вариабельны. Какие же замены наиболее благоприятны для мембранной активности ЦТ?

Впервые на этот вопрос попыталась ответить группа исследователей из Тайваня в 1994 году [2]. Они установили, что присутствие остатка пролина (Pro30) или серина (Ser28) в оконечности второй петли ЦТ значительно влияет на их мембранную активность. Поэтому все ЦТ были разделены на 2 группы: Р-типа (с Pro30) и S-типа (с Ser28). И Р-токсины обнаруживали более заметную мембранную активность, по сравнению с S-токсинами.

Однако сравнительно недавно мы установили, что антибактериальная активность и цитотоксичность ряда ЦТ, а также их способность вызывать утечку кальцеина из фосфолипидных липосом зависит от присутствия одиночного остатка пролина (Pro8) или пары пролинов (Pro8-Pro9) в оконечности первой петли [3]. При этом ЦТ с двумя пролинами значительно уступают в активности таковым с одним пролином. Общее число ЦТ с двумя пролинами составляет не менее 20. Следует учесть, что зависимость активности от Р- и S-замен во второй петле также остаётся.

С учётом этого, все ЦТ, согласно их мембранной активности, можно разделить на 4 группы, в зависимости от присутствия критических аминокислотных остатков в оконечности N-концевой и центральной петель молекулы. Группу-1 составляют ЦТ с Pro8-Pro9 и Ser28. Группу-2 — это ЦТ с Pro8-Pro9 и Pro30. Группу-3 — это ЦТ с Pro8 и Ser28. Группу-4 — с Pro8 и Pro30. При этом мембранная активность ЦТ увеличивается в ряду: группа-1 < группа-2 < группа-3 < группа-4. Если учесть, что во многих случаях именно мембранная активность ЦТ определяет их антибактериальную активность и цитотоксичность [2], то предлагаемая классификация ЦТ позволит предсказывать и сравнивать их антибактериальные и цитотоксические свойства.

В настоящее время нами производится валидация предложенной классификации ЦТ за счёт расширения числа ЦТ, для которых измерены их антибактериальные/цитотоксические активности.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №21-14-00316.

Литература:

1. Dubovskii PV, Efremov RG. The role of hydrophobic /hydrophilic balance in the activity of structurally flexible vs. rigid cytolytic polypeptides and analogs developed on their basis. *Expert Rev Proteomics.* 2018, 15(11):873-886.

2. Chien KY, Chiang CM, Hseu YC, Vyas AA, Rule GS, Wu W. Two distinct types of cardiotoxin as revealed by the structure and activity relationship of their interaction with zwitterionic phospholipid dispersions. *J Biol Chem.* 1994, 269(20):14473-83.

3. Dubovskii PV, Ignatova AA, Alekseeva AS, Starkov VG, Boldyrev IA, Feofanov AV, Utkin YN. Membrane-Disrupting Activity of Cobra Cytotoxins Is Determined by Configuration of the N-Terminal Loop. *Toxins (Basel).* 2022, 15(1):6.

Мембранные корреляты обучения у моллюсков: роль серотонина, глутамата и оксида азота в формировании условных оборонительных рефлексов у виноградной улитки

Гайнутдинов Х.Л.^{1*}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

kh_gainutdinov@mail.ru

Процессы обучения и памяти лежат в основе изменения поведения, а память является одной из основных когнитивных функций. Именно память является механизмом сохранения и/или воспоминания поступившей информации. Вопросы консолидации памяти, в том числе и при формировании условных рефлексов остаются актуальными. Вопрос о механизмах обучения и памяти возник давно, но до сих пор до конца не изучен. Нейромодуляция может оказывать существенное влияние на процесс формирования долговременной памяти [1]. Такими нейромодуляторами в простой нервной системе моллюсков являются серотонин, оксид азота, глутамат. Данные литературы демонстрируют, что серотонин (5-НТ) является основным медиатором, который опосредует оборонительное поведение у моллюсков. 5-НТ, апплицированный в окружающий раствор, вызывает целый ряд клеточных изменений, которые ведут к повышению оборонительного рефлекса. Кроме хорошо известной роли 5-НТ как медиатора в синаптической передаче было показано, что он может выполнять интегративные функции при выделении его во внеклеточную среду [1]. Эти результаты послужили основой для применения аппликации 5-НТ в омывающий раствор в качестве подкрепляющего стимула для создания клеточных аналогов обучения. Посредством аппликаций 5-НТ в омывающий центральную нервную систему раствор также удается воспроизвести электрофизиологические корреляты пластичности.

Оксид азота (NO) известен как одна из важнейших сигнальных молекул, регулирующих физиологические функции организма и метаболизм клеток. Большое внимание привлекает исследование роли NO в механизмах обучения и памяти. NO-синтезирующие нейроны были обнаружены в нервной системе беспозвоночных, в том числе моллюсков. У моллюсков, как и у млекопитающих, NO играет роль межклеточного мессенджера и сигнальной молекулы в различных отделах нервной системы. Нами было показано, что как донор NO нитропруссид натрия, так и блокатор NO-синтазы L-NAME оказывают прямой эффект на электрические характеристики премоторных интернейронов виноградной улитки. Известно, что существенную роль в регуляции мозговой деятельности, в частности, в процессах памяти, играет L-глутамат - основной возбуждающий нейромедиатор как у позвоночных, так и у многих беспозвоночных животных. С одной стороны, мы изучали влияние изменения содержания серотонина, оксида азота и глутамата на формирование условных оборонительных рефлексов аверсии на пищу и на изменение обстановку, а также на реконсолидацию памяти на эти рефлексy. А с другой стороны нами были проведены исследования мембранных механизмов формирования условных оборонительных рефлексов на моллюске с простой нервной системой – виноградной улитке. Для этого мы анализировали изменения возбудимости премоторных интернейронов оборонительного рефлекса LPa3 и RPa3: величины мембранного потенциала (V_m) и порога генерации потенциала действия (V_t).

Было найдено, что аппликации 5-НТ и предшественника его синтеза 5-гидрокситриптофана (5-НТП) в раствор, омывающий препарат, вызывали уменьшение мембранного потенциала (V_m) нейронов LPa3 и RPa3 как интактных, так и обученных. В то же время у обученных и сенситизированных улиток, в отличие от интактных, эта аппликация вызывала возрастание порогового потенциала (V_t). Результаты показывают, что ответы (чувствительность) премоторных интернейронов на экстраклеточно апплицированный 5-НТ или 5-НТП изменяются после ассоциативного обучения и долговременной сенситизации. Было продемонстрировано, что реконсолидация этой контекстуально зависимой памяти на обстановочный условный рефлекс (УР) при напоминании и одновременного ингибирования синтеза белка не происходит, если в нервной системе нарушена серотониновая передача. Показано, что выработка УР на обстановку сопровождается деполяризационным сдвигом и снижением V_t нейронов LPa3 и RPa3. Не было обнаружено дальнейших изменений V_m после напоминания (инициации реконсолидации) как с последующей инъекцией блокатора белкового синтеза, так и физиологического раствора. V_t у этих нейронов снижается после обучения и сохраняется далее неизменным после инициации реконсолидации.

Было найдено, что блокирование рецептора NMDA блокатором МК-801 у виноградных улиток ускоряет процесс аверсивного обучения. Было показано, что аппликация донора NO нитропруссид натрия в раствор, омывающий препарат интактных улиток, вызывает нарастающую гиперполяризацию мембраны премоторных интернейронов на 5.5 мВ к 10-й минуте. Аппликация блокатора NO-синтазы L-NAME в раствор, омывающий изолированный препарат улиток, вызывала постепенное снижение в течение 30 мин мембранного потенциала на 5.0 мВ. Таким образом, нами продемонстрировано, что у определенных нейронов блокада синтеза NO (т.е. уменьшение его количества) может вызывать деполяризацию мембраны, а дополнительный NO - гиперполяризацию. Это позволяет высказать предположение о корреляции уровня NO в нейроне с его мембранным потенциалом. Полученные результаты также свидетельствуют о необходимости 5-НТ для процесса реконсолидации памяти на примере виноградной улитки.

Работа поддержана Программой стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

1. Сахаров Д.А. Биологический субстрат генерации поведенческих актов. Журн. общей биол. 2012, том 73, № 5, с. 324–348.

Мембранные характеристики премооторных интернейронов оборонительного поведения виноградной улитки после формирования тревожно-подобного состояния

Чумарина А.И.^{1,2*}, Арсланов А.И.^{1,2}, Силантьева Д.И.^{1,2}

¹ИФМиБ;

²Казанский Федеральный Университет;

chumarinaadilya@yandex.ru

Тревожность представляет собой состояние организма, которое в зависимости от ситуации может быть естественной защитной реакцией организма или серьезной патологией. Тревожность часто рассматривается как преувеличенная реакция организма на внешнюю угрозу, протекающая в отсутствие угрожающего жизни стимула. Состояние тревожности высших позвоночных имеет глубокие корни в их эволюционном прошлом и может проявляться у беспозвоночных животных. Так у моллюсков тревожно-подобное состояние сопровождается непредсказуемым изменением оборонительной и двигательной активности. Было определено, что при формировании долговременной сенситизации, являющейся формой поведения наиболее близкой к такому состоянию как страх, наблюдается повышение возбудимости основных элементов нейронной сети - сенсорных либо командных нейронов, а также увеличение амплитуды ВПСП. (Hochner et al., 1986). В то же время представляется интересным как изменяются характеристики нейронов, включенных в выполнение оборонительной и двигательной реакции у моллюсков находящихся в тревожно-подобном состоянии. В связи с этим, целью данной работы являлось изучение влияния тревожно-подобного состояния на мембранные характеристики премооторных интернейронов оборонительного поведения виноградных улиток.

Эксперименты проводились на земноводном моллюске *Helix Pomatia*. Для выработки тревожно-подобного состояния моллюску предъявлялись 4 ежедневных электрических стимула в область головы с интервалом 1,5 часа в течении 3 дней. Затем животным давали двухдневный перерыв и далее повторяли сходную серию электрических стимуляций. Тревожно-подобное состояние определяли с помощью поведенческих тестов, измеряли скорость локомоции, время ретракции омматофоров и время закрытого состояния пневмостома. После формирования тревожно-подобного состояния на изолированном препарате нервной системы улиток регистрировалась электрофизиологическая активность нейронов (мембранный потенциал, порог генерации потенциала действия). Животные группы контроля содержались в идентичных условиях, как и животные группы в которой формировали тревожно-подобное состояние. Исследовались следующие параметры мембранных характеристик премооторных интернейронов: мембранный потенциал (V_m), амплитуда и длительность возбуждающих постсинаптических потенциалов. Контролем служила регистрация электрофизиологических характеристик у улиток, не подвергшихся тревожно-подобному состоянию.

Исследование мембранных характеристик премооторных интернейронов выявило достоверное ($P < 0,05$) смещение мембранного потенциала в сторону деполяризации при формировании тревожно-подобного состояния: V_m интернейронов животных подвергшихся формированию тревожно-подобного состояния составил $-52,95 \pm 1,7$ мВ ($n=9$), в то время как V_m интернейронов животных контрольной группы составлял $59,2 \pm 2$ мВ ($n=6$).

Анализ фоновой активности премооторных интернейронов улиток находящихся в тревожно-подобном состоянии показал, что суммарная амплитуда ВПСП регистрируемых на данных нейронах $1,01 \pm 0,1$ мВ недостоверно снижена по сравнению с суммарной амплитудой ВПСП премооторных нейронов животных группы контроля $1,3 \pm 0,3$ мВ. Частота появления ВПСП в премооторных интернейронах группе животных находящихся в тревожно-подобном состоянии не отличалась от таковой в интернейронах контрольных животных.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в результате формирования тревожно-подобного состояния мембранный потенциал премооторных интернейронов оборонительного поведения смещается в сторону деполяризации, в то время как параметры ВПСП приходящие на данные интернейроны со стороны сенсорных клеток достоверно не изменяются. Тенденция к снижению амплитуды ВПСП после формирования тревожно-подобного состояния может быть объяснена деполяризацией мембранного потенциала на фоне которой теряется часть ВПСП сигнала. Исследования механизмов деполяризационного смещения мембранного потенциала при формировании тревожно-подобного состояния требует дальнейшего изучения и является целью наших следующих работ.

Работа поддержана Программой стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

1.Hochner B., Klein M., Schacher S., Kandel E.R. Additional in the cellular mechanism of presynaptic facilitation contributes to behavioral dishabituation in *Aplysia* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986 V. 83 P. 8794-8798.

Метаболический имиджинг ткани печени в процессе регенерации при сопутствующей патологии

Родимова С.А.^{1,2*}, Бобров Н.В.^{1,3}, Щечкин И.Д.^{1,2}, Крылов Д.П.^{1,2}, Козлов Д.С.^{1,2}, Елагин В.В.¹, Карабут М.М.¹, Можеров А.М.¹, Загайнов В.Е.^{1,4}, Загайнова Е.В.^{1,2}, Кузнецова Д.С.^{1,2}

¹ПИМУ Минздрава России;

²ННГУ им. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия;

³Приволжский окружной медицинский центр, Нижний Новгород, Россия;

⁴ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер»;

srodimoval23@gmail.com

Ежегодно регистрируется около 1 млн новых случаев первичного и вторичного рака печени. До сих пор единственным видом терапии остается хирургическое лечение печени. Однако 5-летняя выживаемость после резекции печени достигает 14–61%. Не смотря на современные достижения в хирургической технике и совершенствование методов предоперационной оценки функции печени, сохраняется высокий риск развития послеоперационной печеночной недостаточности, связанный в первую очередь с наличием фоновой печеночной патологии, а также с различием в регенераторном потенциале печени каждого пациента. Стандартные клинические методы оценки состояния ткани печени недостаточно информативны и не позволяют проводить предиктивную оценку регенераторного потенциала оставшейся печени. Таким образом, актуальной задачей остается поиск новых методов и критериев для интраоперационной экспресс оценки структуры и функции печени, которые бы позволили выявить наличие патологических изменений уже на ранних стадиях, а также оценить регенераторный потенциал ремнанта печени. Современные label-free методы мультифотонной микроскопии с режимами время-разрешенной микроскопии (FLIM) и генерации второй оптической гармоники (ГВГ) расширяют возможности изучения структурно-функционального состояния ткани печени на клеточном уровне.

Серии экспериментов проводились на крысах линии Wistar. Индукция нормальной регенерации проводилась путем 30% и 70% гепатэктомии (ГЭ). Индукция фиброза проводилась путем введения СС14 в течение 8 недель. Индукция стеатоза проводилась путем 60% высокожировой диеты в течение 12 недель. На разных этапах патологии проводилась индукция регенерации путем 70% ГЭ. Мониторинг изменений в регенерирующей печени проводили на 3 и 7 день после ГЭ. Анализ структуры ткани печени проводили методом мультифотонной микроскопии. Оценка содержания коллагена в ткани проводилась методом ГВГ. С применением FLIM определяли вклады времен жизни флуоресценции связанных форм НАДН (а2,%) и НАДФН (а3,%). В качестве контроля проводили морфологический и морфометрический анализ и стандартный биохимический анализ крови.

Показано, что печень в норме и при нормальной регенерации характеризуется равномерным распределением сигнала автофлуоресценции НАД(Ф)Н и отсутствием накопления коллагена в ткани. Методом FLIM было выявлен основной оптический критерий успешной регенерации - резкое увеличение вкладов а2 и а3 на 3 день регенерации, что связано с усилением интенсивности окислительного фосфорилирования и биосинтетических процессов в гепатоцитах.

При индукции стеатоза и фиброза выявляются зоны со сниженным сигналом автофлуоресценции НАД(Ф)Н, ассоциированные с очагами фиброзирования и липидной инфильтрации. Методом FLIM показано снижение вкладов а2 и а3 на ранних стадиях патологии, с последующим увеличением данных параметров на поздних этапах. При индукции регенерации на поздних стадиях патологии было показано отсутствие скачка а2 и а3 на 3 день регенерации, что связано с развитием липотоксичности и митохондриальной дисфункции в гепатоцитах.

Таким образом, были выявлены оптические критерии успешной регенерации печени – это равномерное распределение сигнала автофлуоресценции НАД(Ф)Н, а также резкое увеличение вкладов связанной формы НАДН и НАДФН. Критериями снижения регенераторного потенциала печени при наличии патологии является появление зон со сниженным сигналом автофлуоресценции НАД(Ф)Н, а также отсутствие резкого скачка вкладов связанной формы НАДН и НАДФН на поздних этапах развития патологии. Полученные результаты послужат основой для разработки критериев для проведения предиктивной экспресс-оценки состояния ткани печени в клинике.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-15-00263 (метаболический имиджинг, анализ FLIM данных) и гранта РФФИ № 22-25-00098 (морфологический анализ образцов печени).

Методы машинного обучения для прогнозирования исхода заболевания COVID-19 у детей

Кузнецова А.В.^{1,2*}, Воронин Е.М.¹, Самитова Э.Р.³

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва;

²ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва;

³ГБУЗ Детская городская клиническая больница имени З.А. Бахляевой;

azforus@yandex.ru

В работе проведен анализ базы данных клинико-лабораторных показателей у детей - пациентов с заболеванием Covid-19. Многопараметрический анализ проводили с помощью методов машинного обучения, основанных на оригинальных методах оптимально достоверных разбиениях и статистически взвешенных синдромах.

Заболелаемость Covid-19, по общему мнению, больше касалась взрослого населения. Но и дети тоже заболели. В Тушинской больнице была собрана база клинико-лабораторных показателей у детей, больных Covid-19. Взятие анализов проводили при поступлении в больницу, на 7 день и на 11 день. Количество показателей – 55. Количество пациентов с летальным исходом было невелико - первый класс 10 человек. Количество пациентов, выписанных из больницы после выздоровления - второй класс – 45. Общее количество пациентов – 55.

Применяли методы машинного обучения из комплекса Data Master Azforus. На наборе лучших методов использовали ансамбль для улучшения результата распознавания.

Сравнение методов машинного обучения для использования клинико-лабораторных показателей у пациентов при поступлении в больницу дали следующими результатами (в скобках результаты Roc Auc): Статистически взвешенные синдромы - 0,647, Деревья решений - 0,644, Линейный дискриминантный анализ - 0,578, Градиентный бустинг - 0,533, Метод ближайших соседей - 0,522. Это достаточно низкие значения распознавания. Ансамбль на этих 5-ти методах МО показал значение AUC=0,678. Это соответствует 42 из 55 правильно распознанных исходов заболевания (76,4 %).

Через три дня пребывания в стационаре распознавание методами машинного обучения выросло незначительно. Линейный дискриминантный анализ - 0,656, Деревья решений - 0,644, Статистически взвешенные синдромы - 0,630. Ансамбль на этих трех методах распознавал на скользящем контроле (Leave-One-Out) - 41 правильных исходов (74,5 %). Немного повысился ROC AUC=0,693.

На 7-й день пребывания в стационаре распознавание было уже лучше: Деревья решений - 0,744, Статистически взвешенные синдромы - 0,739, Линейный дискриминантный анализ - 0,689. Ансамбль на этих трех лучших методах показал уже ROC AUC=0,822. В группе умерших правильно распознано 7 (70,0 %) из 10 человек. В группе выздоровевших верно распознано 39 (86,7 %) из 45 человек. Общее число верных распознаваний - 46 (83,6%).

На 11-й день после госпитализации результат распознавания на скользящем контроле такой: Статистически взвешенные синдромы - 0,897, Адаптивный бустинг-0,850, Деревья решений - 0,850, Градиентный бустинг - 0,799, Линейный дискриминантный анализ - 0,644. Результаты ансамбля на этих трех лучших методах - ROC AUC=0,9433. В классе умерших число верного распознавания не изменилось - 7 (70,0 %). В классе пациентов, выписанных из больницы, распознавание было на 100,0% - 45 человек правильно отнесены в свой класс. Общий результат распознавания - 52 человека (94,5 %).

Далее перечислены значимые показатели с точки зрения распознавания класса умерших от класса выздоровевших пациентов (показатель с обозначением точки исследования, граница разбиения, значимость): 1) СРБ В - 30,24 - $p < 0,0005$; 2) Мочевина В - 13,15 - $p < 0,0005$; 3) СРБ 7 - 49,325 - $p < 0,001$; 4) глюкоза В - 6,325 - $p < 0,001$; 5) общий белок В - 56,35 - $p < 0,007$; 6) Глюкоза 7 - 5,75 - $p < 0,008$; 7) альбумин В - 35,9 - $p < 0,008$; 8) ЛДГ В - 952,95 - $p < 0,014$; 9) Креатинин 3 - 78 - $p < 0,019$; 10) АСТ 0 - 177,7 - $p < 0,022$; 11) Креатинин В - 66 - $p < 0,023$; 12) Мочевина 7 - 11,6 - $p < 0,023$; 13) ЛДГ 7 - 805,6 - $p < 0,047$; 14) Тромбоциты В - 190,5 - $p < 0,048$.

Таким образом, наиболее значимым показателем оказался С-реактивный белок (значимость на перестановочном тесте $p < 0,0005$). По публикациям это было уже отмечено в статьях. При значении этого показателя выше 49,325 на 7 день стационара и выше 30,24 на 11 день в больнице высока угроза летального исхода.

Далее перечислим показатели с их границами разбиения с указанием класса.

Выше границы преобладает неблагоприятный класс у следующих показателей: Мочевина В, Мочевина 7, Глюкоза В, Глюкоза 7, ЛДГ В, ЛДГ 7, Креатинин В, Креатинин 7, АСТ 0.

Ниже границы неблагоприятный класс преобладает у показателей: Общий белок В, Альбумин В, Тромбоциты В.

Методы машинного обучения позволяют сделать прогноз угрозы летального исхода при заболевании Covid-19 у детей и выявляют наиболее значимые показатели с их границами разбиения, что дает возможность докторам в ранние сроки заболевания предпринять интенсивные меры лечения у пациентов с плохим прогнозом.

Механизмы регуляции сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей при метаболических нарушениях

Бирулина Ю.Г.^{1*}, Иванов В.В.¹, Буйко Е.Е.¹, Вольхина М.О.¹, Носарев А.В.¹, Гусакова С.В.¹
¹*Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия;*
birulina20@yandex.ru

Одним из факторов, способствующих развитию бронхолегочной патологии, является метаболический синдром (МС). Существуют сведения, что висцеральное ожирение, гиперинсулинемия, гипергликемия и дислиппротеинемия способствуют развитию гиперреактивности бронхов. Механизмы, лежащие в основе таких нарушений, неотъемлемо связаны с расстройством регуляторных механизмов сократительной активности гладкомышечных клеток стенки воздухоносных путей.

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 30 мМ раствор калия хлорида, сократительные ответы на который принимали за контрольные (100%). Тестировали действие карбахолина ((0,1–100 мкМ), салбутамола (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 ($p < 0,05$). Вероятно, деэпителизация приводит к уменьшению действия дилатационных факторов, выделяемых при активации холинорецепторов. Также ранее было показано, что при ожирении, вызванном высокожировой диетой, карбахолин способен усиливать сокращение гладких мышц воздухоносных путей за счет мобилизации кальция из цитозольных запасов, что, в свою очередь, стимулирует фосфорилирование легких цепей миозина. Активация бета2-адренорецепторов салбутамолом на фоне действия карбахолина (1 мкМ) вызывала дозозависимое расслабление гладкомышечных сегментов воздухоносных путей крыс контрольной и опытной групп. Дилатационные реакции деэпителизированных сегментов крыс экспериментальной группы значительно снижались по сравнению с контрольной группой в диапазоне концентраций 1–100 мкМ ($p < 0,05$). Одним из механизмов снижения релаксирующего эффекта на действие бронходилататора является десенсibilизация бета2-адренорецепторов, возникающая при ожирении, вследствие повышенной экспрессии фосфодиэстеразы 4 типа, разрушающей циклический АМФ (цАМФ). Вероятно, что активация холинергических механизмов нивелирует цАМФ-зависимую релаксацию гладких мышц. На фоне действия активатора аденилатциклазы форсколина происходило дозозависимое расслабление деэпителизированных сегментов воздухоносных путей крыс контрольной и опытной групп ($p < 0,05$), 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).

Механизмы усиления кортикальной депрессии в соматосенсорной коре крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией

Яковлев А.В.^{1*}, Шахматова В.И.¹, Гатаулина Э.Д.¹, Ситдикова Г.Ф.¹
¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет;*
alv.yakovlev@gmail.com

Гомоцистеин, серосодержащая аминокислота, образующаяся в ходе метаболизма метионина, в высоких концентрациях обладающая нейротоксическими эффектами. Генетические мутации ферментов метаболизма

гомоцистеина, дефицит витаминов группы В, избыток метионина и нарушения выделительной функции, прием некоторых лекарственных препаратов приводит к повышению уровня гомоцистеина в организме – гипергомоцистеинемии (гГЦ). Показано, что высокий уровень ГЦ в крови в следствии оксидативного стресса, митохондриальных нарушений, ведет к повреждению нейронов и активации эндотелиальных клеток, и повышает риск тромбозов и ишемии, вызывает увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера и как следствие к развитию нейродегенеративных заболеваний. Клинические данные указывают на то, что повышение уровня гомоцистеина может являться фактором риска возникновения мигрени. Показано, что частота кортикальной депрессии (РКД), лежащей в основе мигрени с аурой, ассоциируется с высоким уровнем гомоцистеина. Целью работы анализ развития распространяющаяся кортикальная депрессия в соматосенсорной коре крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией. Эксперименты проводились на животных в возрасте P14-26 (P0 – день рождения). В таламокортикальных срезах (400 мкм) соматосенсорной коры крыс с помощью внеклеточного электрода регистрировали РКД и внутренней оптический сигнал (ВОС) в режиме пропускания света. РКД индуцировали при помощи двух протоколов: эквимоллярной заменой NaCl на KCl во внеклеточном растворе в концентрациях 50 mM в течение 5 мин или локальной аппликации 50-100 mM KCl в течение 5с. Для оценки изменения синаптической активности регистрировали возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП) нейронов 4 слоя. Анализ экспериментальных данных в контрольных условиях показал, что аппликация KCl вызывала развитие РКД через 88 ± 6 с ($n=20$). Амплитуда и длительность РКД составили 5.9 ± 1.1 мВ и 342 ± 24 с ($n=20$), соответственно. Предварительная инкубация срезов в метаболите гомоцистеина – гомоцистеинтиолактон (Гц-Т, $500 \mu\text{M}$) в течение 60 мин не вызвало достоверных изменений амплитуды и длительности РКД, но латентный период РКД уменьшался в 1.5-2 раза относительно контроля ($n=6$, $p<0.05$). В срезах коры крыс с пренатальной гГЦ регистрировалось уменьшение латентного периода развития РКД до 36 ± 5 с ($n=7$, $p>0.05$), амплитуда и длительность достоверно не изменялись. Аппликация KCl приводило к полному ингибированию вызванных синаптических ответов в 4 слое. Восстановление синаптических ответов наблюдалось через 15-20 мин. К 60 мин после индукции РКД амплитуда ВПСП восстанавливалась до $84 \pm 9\%$ ($n=14$) относительно контроля. В срезах крыс с пренатальной гГЦ или после предварительной инкубации в Гц-Т наблюдалось замедление восстановления амплитуды ВПСП и к 60 мин после индукции РКД составила $65 \pm 8\%$ ($n=6$, $p<0.05$) относительно контроля. В следующей серии экспериментов анализировали ВОС, состоящий из 2 пиков: первый - отражающий деполяризацию нейронов, а второй – общее набухание клеток. В срезах коры крыс с гГЦ наблюдалось только снижение амплитуда 1 пика в 2 раза ($n=7$, $p<0.05$) относительно контроля и увеличение времени восстановления светопроницаемости с 236 ± 31 с ($n=29$) до 346 ± 47 с ($n=27$, $p<0.05$). Предварительная инкубация таламокортикальных срезов (10 мин) в присутствии селективного ингибитора АМПА-рецепторов – CNQX ($10 \mu\text{M}$) не приводила к изменениям амплитуды и латентного периода РКД в срезах крыс, как контрольной, так и гГЦ групп. Блокирование НМДА-рецепторов ($20 \mu\text{M}$ d-APV) приводило к снижению амплитуды и увеличению латентного периода РКД, как в контрольных, так в срезах коры крыс с гГЦ. В условиях ингибирования NR2A ($3 \mu\text{M}$ TCN) и NR 2B ($3 \mu\text{M}$ Ro-256981) субъединиц НМДА-рецепторов у крыс контрольной группы регистрировалось угнетение амплитуды РКД. В срезах коры крыс с гГЦ достоверное снижение амплитуды РКД наблюдалось только при блокировании 2B-субъединицы НМДА-рецепторов. Время до пика РКД в присутствии блокаторов 2A/B субъединиц в контрольной группе крыс не отличалось достоверно, соответственно, относительно контрольных условий. В срезах крыс с гГЦ блокирование NR2A/B субъединиц приводило к увеличению времени до пика РКД, особенно ярко проявляющееся при ингибировании NR2B субъединицы. Блокирование различных субъединиц НМДА-рецепторов в коре крыс как в контрольной, так и в экспериментальной группах не приводило к достоверному изменению длительности РКД. Таким образом, было показано, что при инкубации срезов в Гц-Т, так и у крыс с пренатальной гГЦ происходит снижение латентного периода и увеличение амплитуды РКД, а также снижение скорости восстановления вызванных синаптических ответов, регистрируемых в соматосенсорной коре. Также, можно предположить, что глутаматные рецепторы НМДА-типа участвуют в развитии РКД в таламокортикальных срезах крыс как в контроле, так в условиях пренатальной гГЦ, при этом эффект блокирования НМДА рецепторов и особенно 2B субъединицы в большей степени проявлялся в группе гГЦ. Работа выполнена за счёт средств РНФ 20-15-00100.

Митохондриальная мегапора (mPTP) и процесс клеточной гибели

Крицкая К.А.^{1*}, Стельмашук О.А.², Бережнов А.В.^{1,2}, Абрамов А.Ю.^{2,3}

¹ИБК РАН - ФИЦ ПНЦБИ РАН;

²Лаборатория клеточной физиологии и патологии, Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия;

³Department of Clinical and Movement Neurosciences, UCL Queen Square Institute of Neurology, London, UK;

kritskayak96@yandex.ru

Различные патологические состояния, такие как нейродегенерация, сердечно-сосудистые заболевания, рак и старение связаны с нарушением функций митохондрий и, в частности, митохондриальной мегاپоры (mPTP). Открытие mPTP приводит к резкому увеличению проницаемости митохондриальной мембраны, потере митохондриального потенциала и запуску запрограммированной клеточной гибели – апоптоза, либо некроза. В свою очередь открытие mPTP может быть вызвано чрезмерной продукцией АФК, перегрузкой кальцием, низкой доступностью субстрата, ингибированием дыхательных комплексов митохондрий и т.д. Предполагают, что в опухолевых клетках нарушен механизм запуска апоптоза, опосредуемый mPTP, в то время как при нейродегенерации токсичность белковых агрегатов, таких как α -синуклеина, опосредована открытием mPTP.

Известно, что открытие mPTP – это универсальный механизм индукции апоптоза для различных типов клеток млекопитающих, однако, до сих пор не было установлено количественное соотношение митохондрий с открытыми mPTP к общему пулу митохондрий клетки, необходимое для запуска клеточной гибели.

Чтобы проверить это соотношение мы выбрали четыре типа клеток млекопитающих: нейроны, астроциты, клетки рака молочной железы и фибробласты. Клетки загружали потенциал-чувствительным красителем TMRM (25нМ) и флуоресцентным субстратом каспазы3 NucView (2мкМ). Далее проводили поэтапное введение ферутина – электрогенного ионофорного индуктора открытия mPTP, опосредующего увеличение проницаемости митохондриальной мембраны и кальциевую перегрузку митохондрий. Открытие mPTP происходит, если добавка ферутина сопровождается быстрой потерей митохондриального потенциала и угасанием флуоресценции TMRM. Далее вычисляли процент митохондрий с открытыми mPTP во время индукции апоптоза (о котором свидетельствовало резкое увеличение флуоресценции NucView) к общему пулу митохондрий в начальный момент съёмки (начальная митохондриальная площадь, 100%).

Было обнаружено, что для индукции апоптоза в фибробластах необходим наименьший процент митохондрий с открытыми mPTP (25±1,4%). В нейронах же для индукции апоптоза требовалось 64 ±4% митохондрий с открытыми mPTP, в то время как в астроцитах это значение составляло 77±5%. В опухолевых клетках, несмотря на большую гетерогенность данных, для индукции апоптоза была необходимо открытие mPTP в более чем 90±8% митохондрий.

Поскольку эволюционная роль нейронов и астроцитов прочно связана с кальциевой сигнализацией, вероятно, такие различия в этом показателе могут объясняться более низкой чувствительностью нейрональных и астроцитарных митохондрий к кальциевой перегрузке по сравнению с митохондриями фибробластов. Для опухолевых же клеток, характерна высокая скорость митофагии и аутофагии, которая, возможно, до определённого момента сдерживает индукцию апоптоза, несмотря на активацию mPTP в большинстве митохондрий клетки.

Таким образом, в настоящей работе получены данные, описывающие порог чувствительности к индукции апоптоза через открытие mPTP и кальциевую перегрузку в разных типах клеток. Поскольку вещества, модулирующие работу mPTP рассматриваются в качестве потенциальной мишени для терапии различных заболеваний, необходимо детальное изучение чувствительности митохондрий различных типов клеток к их действию.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИБК РАН № 075-01512-22-03 по теме: "Нейропротекторные препараты нового поколения" № 1022080100047-5-1.6.4

Модель организации физиологических функций организма человека на основе спектрального анализа акустоэнцефалограммы

Шабанов Г.А.¹, Рыбченко А.Ф.¹, Луговая Е.А.^{1*}

¹Научно-исследовательский центр «Арктика» ДВО РАН;
elena_plant@mail.ru

Вибрационная чувствительность является одной из наиболее глобальных форм отражения связей человеческого организма с самыми разнообразными воздействиями внешней среды. Нервные клетки, эпителиальные клетки, мышечные волокна способны непосредственно, без участия специфических рецепторов, воспринимать звуковые раздражения и вибрации. Эволюция донервных видов передачи информации не могла обойти механические микровибрации клеток т.к. на частотах от 0,1 до 30 Гц информация передается на большие расстояния практически без затухания, наименее энергозатратна в сравнении с химической и нервной передачей, обладает свойством диффузно распространяться по всему организму. Один из основателей сравнительной физиологии, эволюционного подхода к передаче информации Х.С. Коштыянец (1950) утверждал, что в живом организме имеют место и функционируют совместно абсолютно все – новые и более простые, старые механизмы передачи информации. Новые механизмы не только замещают, но и встраиваются в старые, которые продолжают функционировать совместно, каждый на своем месте [1].

Начиная с обобщающей монографии Г. Мэгун [2] сложилось представление, что физиологический подход в оценке поведения функций требует изучения регулирующих или модулирующих влияний из спонтанно активных ретикулярных активирующих структур мозга, а их функциональную гетерогенность можно рассматривать как самостоятельный сложный нейрофизиологический механизм. В наших исследованиях был сделан вывод, что энергия колебаний как наиболее простая форма аккумуляции энергии, используется природой для формирования неспецифическими структурами мозга фонового адаптационного потенциала – многочастотной матрицы множества функциональных состояний. Важнейшим признаком активности такой системы должно быть наличие в ней достаточно длительных периодических режимов, формирующих пространственную организацию и функциональное состояние вышележащих мозговых структур, динамический тонус периферических эффекторов и организма в целом [3]. Для каждой функции – от организменных до клеточных, выстраивается на основании потребностей частотный кластер, состоящий из нервных и соматических клеток, организующим фактором которых является одна частота, а функциональное состояние определяется амплитудой микровибраций. Такая модель корректно решает задачи «глобального доступа» и синхронизации работы клеток в частотном кластере вне зависимости от их расположения в пространстве, наличия и траектории нервных проводников. Нейронные кластеры тесно связаны между собой в сети, обеспечивают иерархию функций и целостность организма, представляют потенциально громадный набор конкурирующих потребностей и векторов поведения.

Спектральный анализ акустического сигнала головного мозга носил ряд особенностей – полоса анализируемого сигнала от 0,1 до 27 Гц, количество спектральных гармоник 8400, для выделения длительно текущих осцилляций активирующей системы мозга оптимальное время интегрирования составило 160 сек, точность определения спектральных гармоник до четвертого знака после запятой обеспечивал рубидиевый стандарт частоты Ч1-1013.

Любая функция может быть представлена во времени как множество последовательных точек измерений. Кросс-корреляционный анализ позволяет синхронно для такой функции подобрать одну частотную гармонику осцилляций мозга, огибающая спектра которой дает максимальный коэффициент корреляции. Примеры частотных кластеров для функций на разных ступенях иерархии: белок S100 – 0,8270 Гц; белок TRPM8 – 6,1655 Гц; ферритин FTN1 – 0,4046 Гц; глюкоза крови – 0,2465 Гц; WBC крови – 3,2323 Гц; индекс депрессии – 6,3961 Гц; личностная тревожность – 6,8588 Гц и т.д.

1. Коштыянец Х.С. Основы сравнительной физиологии. Том 1. М.: Изд. АН СССР, 1950. 524 с.

2. Мэгун Г. Бодрствующий мозг. М.: Изд. Иностранной литературы, 1965. 212 с.

3. Шабанов Г.А., Максимов А.Л., Рыбченко А.А. Функционально-топическая диагностика организма человека на основе анализа ритмической активности головного мозга. – Владивосток: Дальнаука, 2011. 206 с.

Модулирующее действие полифенолов на факторы роста поврежденного соматического нерва

Отряскин Я.С.^{1*}, Пиняев С.И.¹

¹МГУ им. Н.П. Огарёва;
otryaskin.yaroslav@mail.ru

Повреждения периферических нервов - распространенные травмы с широким диапазоном симптомов в зависимости от степени тяжести и пораженных нервов. В процессе, если поддержка нейротрофинов не будет получена, проксимальный сегмент быстро дегенерирует, и тело клетки погибнет. Поэтому исследования роста, развития и защиты нервных клеток семейством нейротрофических факторов представляют большую ценность с точки зрения фундаментальных и клинических исследований.

Полифенолы являются важной группой фитохимических веществ, которые в избытке присутствуют в пище. Сообщается, что полифенолы обладают терапевтической ценностью при нейродегенеративных заболеваниях. Также известно, что они играют важную роль в профилактике различных видов рака. Передача клеточных сигналов выживания важна для подавления механизма клеточной гибели и уравнивания передачи сигналов апоптоза в нервной системе.

Полифенолы, фенольные соединения, флаваноиды и терпены хорошо известны своей антиоксидантной активностью. Фенолы были определены как группа полифенолов, которые являются важным вторичным метаболитом, содержащимся в растениях. Именно они ответственны за антиоксидантное действие флаваноидов и их положительный эффект на множество заболеваний. Флаваноиды являются мощными антиоксидантами против свободных радикалов, и они описываются как поглотители свободных радикалов. Способность поглощения свободных радикалов главным образом приписывается высокой реактивности гидроксильных групп. Эта активность приписывается их способности донора водорода, и, несомненно, фенольная группа флаваноидов служит источником легко доступных атомов водорода.

Ресвератрол (3,4',5-тригидроксистерилбен) представляет собой природный полифенол, обнаруженный в различных растительных объектах, винограде и красном вине, который естественным образом вырабатывается некоторыми растениями в ответ на повреждение или патогены. Ресвератрол обладает множеством полезных свойств для гомеостаза тканей головного мозга, связанных, главным образом, с его способностью улавливать свободные радикалы, индуцируя антиоксидантные пути и оказывая противовоспалительное действие.

Дигидрокверцетин (таксифолин) – это соединение, которое относится к флавоноидам. Это соединения, содержащие флаван – 3 – он, со структурой, характеризующейся 2 – фенил – 3,4 – дигидро – 2Н – 1 – бензопираном, содержащим гидроксильную группу, и кетоном с атомами углерода C2 и C3 соответственно. Дигидрокверцетин относится к естественным антиоксидантам растительного происхождения, является биофлавоноидом.

Фактор роста нервов (NGF) был первым открытым членом семейства нейротрофических факторов и является важным нейротрофическим фактором для развития и поддержания центральной и периферической нервной системы. В нескольких исследованиях было высказано предположение, что NGF и его рецепторы, тропомиозин-связанный киназный рецептор 1 и рецептор NGF, участвуют в процессе заживления ран и являются важными составляющими заживления нескольких ран как *in vivo*, так и *in vitro*.

Учеными факультета биотехнологии и биологии ведутся работы с использованием ресвератрола и дигидрокверцетина в качестве стимулятора регенерационных процессов в поврежденных нервных тканях. Опытным путём было показано, что при введении ресвератрола и дигидрокверцетина содержание белков миелина увеличивается, восстанавливается фосфолипидный и жирнокислотный состав поврежденных нервных проводников.

Модуляция ноопептом возбудимости нейрональной мембраны виноградной улитки

Мурзина Г.Б.^{1*}

¹ИВНД и НФ РАН;
gbmurzina@mail.ru

Ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) нашел широкое применение в медицинской практике при нарушениях памяти и внимания, вызванных черепно-мозговой травмой, сосудистой мозговой недостаточностью, астеническими расстройствами. Наравне с влиянием ноопепта на долговременные процессы (которое является доминирующим воздействием препарата), обнаружено его воздействие на возбудимость нейрональной мембраны в более короткий промежуток времени. Было показано, что этот препарат изменяет

амплитуду вызванного ацетилхолином входящего тока (АХ-тока) командных нейронов виноградной улитки [1]. Дозовая кривая воздействия ноопепта – колоколообразная, и усиление АХ-тока наблюдается при низких концентрациях (0.1нМ – 0.01мкМ). Анализ амплитуды вызванного АХ-тока с целью выяснения механизмов холинопозитивного воздействия ноопепта осуществлялся с помощью математической модели. Модель описывает основные процессы от аппликации медиатора до регистрации вызванного АХ-тока [2]. Результаты моделирования показали, что наибольшее соответствие расчетной и экспериментальной кривых при воздействии ноопепта наблюдается при изменении параметров модели, описывающих увеличение общего количества рецепторов на нейрональной мембране и увеличение времени жизни (или вероятности перехода) мембранных рецепторов в открытое состояние. Увеличение количества ацетилхолиновых рецепторов на мембране нейронов может являться следствием влияния ноопепта на процессы эндо- или экзоцитоза рецепторов путем взаимодействия с белками примембранного матрикса или вследствие влияния на протеинкиназы или протеинфосфатазы, участвующие в процессе мембранной или внутриклеточной транспортировки ацетилхолиновых рецепторов.

С целью конкретизации, на какие именно процессы эндо- или экзоцитоза ацетилхолиновых рецепторов ноопепт оказывает влияние, были проведены исследования воздействия препарата на депрессию вызванного ацетилхолином входящего тока на командных нейронах виноградной улитки. Проведенные нами ранее исследования о влиянии ингибиторов протеинкиназ и протеинфосфатаз, и ряда блокаторов транспортных процессов на депрессию АХ-тока [3] позволили соотнести их воздействие с влиянием ноопепта, что дало возможность конкретизировать внутриклеточные мишени воздействия препарата. Для анализа экспериментальных данных использовалась модифицированная математическую модель, учитывающая различное расположение рецепторов (на клеточной мембране и в сформированных и рециклированных везикулах), транспорт рецепторов из эндоплазматического ретикулума к мембране и процесс деградации рецепторов. Параметрами уравнений модели являлись скорости изменения местоположения рецепторов. Выводы о том, на какие процессы воздействует препарат, делались на основании того, какие параметры изменяли для получения моделируемых кривых. Исследования проводились для двух концентраций ноопепта - 1нМ и 10мкМ, поскольку, как было показано ранее, препарат по-разному действует на депрессию входящего АХ-тока: при первой концентрации наблюдалось наибольшее увеличение входящего тока, а при второй – его недостоверное уменьшение. Сравнение кривых выработки депрессии при воздействии ноопепта с ранее полученными кривыми воздействия различных блокаторов на депрессию АХ-тока позволило сделать вывод о возможном влиянии ноопепта при меньшей концентрации - на активность протеинфосфатазы 2А, а при большей – также на активность протеинфосфатазы 1.

Произведенные дополнительные расчеты и существующие литературные данные позволили уточнить, какие внутриклеточные процессы, связанные с активностью этих протеинфосфатаз, могут определять воздействие ноопепта на возбудимость мембраны нейронов виноградной улитки.

В обнаруженной области воздействия ноопепта находится эффективная для человека средняя концентрация препарата в крови, поэтому при приеме лекарства необходимо учитывать возможность и его кратковременного воздействия.

Литература

- 1.Разумовская М.А., Мурзина Г.Б., Островская Р.У., Пивоваров А.С. Журн.Высш.Нервн. Деят. 2018. Т.68(4). С.537-548.
- 2.Мурзина Г.Б., Пивоваров А.С. Биофизика. 2019. Т.64(3). С.507-514.
- 3.Пивоваров А.С., Мурзина Г.Б., Васильева Н.В. Журн.Высш.Нервн. Деят. 2020. Т.70(1). С.125-132.

Морфологическое обоснование снижения значений модуля упругости опухолевой ткани на фоне терапии

Плеханов А.А.^{1*}, Губарькова Е.В.¹, Сироткина М.А.¹, Елагин В.В.¹, Советский А.А.², Павлов М.В.³, Воронцов Д.А.³, Богомолова А.Ю.¹, Воронцов А.Ю.³, Гамаюнов С.В.³, Зайцев В.Ю.², Гладкова Н.Д.¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия;

²Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, Россия;

³Нижегородский областной клинический онкологический диспансер, Нижний Новгород, Россия;
strike_gor@mail.ru

К настоящему моменту мнение радиологов о надёжности и диагностической значимости исследований упругости ткани молочной железы методами ультразвуковой диагностики до конца не сформировано ввиду неоднозначных результатов клинических испытаний. Однако ряд последних исследований демонстрирует

неразрывную связь статистически значимого снижения значений модуля упругости после первого курса неoadьювантной химиотерапии (НАХТ) и полного / выраженного патоморфологического ответа опухоли по завершению терапии. При этом часто очертания масштабного опухолевого узла после первого курса НАХТ сохраняются, несмотря на выраженное снижение значений модуля упругости. Представленное исследование направлено на морфологическое обоснование изменений упругости ткани рака молочной железы на фоне НАХТ при использовании метода компрессионной оптической когерентной эластографии (ОКЭ), позволяющего определять упругость отдельных структурных компонентов биологических тканей.

Основной целью нашей работы являлось изучение особенностей изменения упругости и морфологии опухолевой ткани молочной железы в процессе проводимой неoadьювантной химиотерапии.

На проведение исследования получено заключение локального этического комитета ГБУЗ НО «НОКОД» (выписка № 8 из протокола №12). У пациентов с установленным диагнозом инвазивного протокового рака молочной железы осуществлён забор трепан-биоптатов до и после первого курса НАХТ (для клинически обоснованных задач определения целесообразности дальнейшего проведения терапии). Кроме того, опухолевой узел исследовали с помощью ультразвуковой компрессионной эластографии (Samsung RS80A, Южная Корея). Модуль упругости Юнга структурных компонентов ткани полученных трепан-биоптатов исследовали методом ОКЭ, используя мультимодальную установку оптической когерентной томографии (ИПФ РАН, Нижний Новгород). Затем осуществляли гистологическое исследование ткани.

При ультразвуковом исследовании после первого курса НАХТ наблюдалось снижение упругости отдельных участков ткани в проекции опухолевого узла, при сохранении участков высокой упругости. При этом размеры опухолей статистически значимо не уменьшались, что считалось невыраженным ответом опухолей на терапию. При ОКЭ исследовании трепан-биоптатов обнаружено общее снижение упругости за счёт трёх патоморфологически подтверждённых изменений: (1) уменьшения участков высокой упругости за счёт редуцирования количества жизнеспособных опухолевых клеток, (2) детекции участков низкой упругости за счёт появления некротизированных опухолевых клеток, (3) и повышения участков низкой упругости за счёт образования стромальных волокон (которые замещают некротизированные опухолевые клетки).

По итогам, наши результаты демонстрируют особенности изменения упругости и морфологии опухолевой ткани молочной железы в процессе терапии. Показано, что снижение значений упругости ткани происходит за счёт редуцирования количества жизнеспособных опухолевых клеток, появления некротизированных опухолевых клеток и образования стромальных волокон, замещающих некротизированные клетки. Дальнейший мониторинг и сбор ОКЭ данных может позволить разработать новые предиктивные критерии ранней оценки эффективности НАХТ рака молочной железы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект № 18-75-10068.

Мультимодальная оптическая когерентная томография для клинической оценки восстановления кожи вульвы после ФДТ терапии склеротического лишена

Потапов А.Л.^{1*}, Логинова М.М.^{1,2}, Плеханов А.А.¹, Моисеев А.А.³, Матвеев Л.А.³, Седова Е.С.⁴, Гамаюнов С.В.⁴, Раденска-Лоповок С.Г.⁵, Гладкова Н.Д.¹, Сироткина М.А.¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет;

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского;

³Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики РАН;

⁴Нижегородский областной клинический онкологический диспансер;

⁵Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет);

Arseniy1109@gmail.com

Мультимодальная оптическая когерентная томография (ОКТ) – современная технология неинвазивной визуализации, позволяющая получать 3D изображения биологических тканей с пространственным разрешением 10-15 микрометров на глубину до 2 мм без дополнительных контрастирующих веществ [1]. Одновременно из одной и той же области интереса в режиме реального времени извлекаются данные о структурно-функциональных характеристиках ткани, что повышает информативность и специфичность исследования. Общая структура ткани и состояние коллагеновых волокон оценивается на кросс-поляризационных ОКТ изображениях; состояние микроциркуляции (кровеносных и лимфатических сосудов) – на ОКТ ангиографических изображениях. Важно, что все типы получаемой информации подлежат как визуальной, так и количественной оценке. В результате сканирования, менее чем за 30 секунд получается 3D массив данных, из

которого можно анализировать В-сканы и en face изображения на разных глубинах в пределах сканированной области. Глубина сканирования является важным лимитирующим фактором для технологии ОКТ, что накладывает ограничения на объекты исследования. При условии прямого доступа ОКТ зонда к биоткани, объектами исследования могут служить: кожа, слизистые оболочки гинекологического тракта, ротовой полости, злокачественные новообразования кожи. При интраоперационном доступе объектами исследования могут быть опухоли головного мозга, рак молочной железы, органы брюшной полости в абдоминальной хирургии. Мультимодальная ОКТ показала свою эффективность для диагностики разных молекулярных подтипов рака молочной железы [2]. ОКТ ангиография является перспективной для оценки эффективности фотодинамической терапии базальноклеточного рака кожи [3].

Важное свойство ОКТ ангиографии – визуализация сосудистой сети на разных глубинах – этот принцип может быть использован при оценке глубины поражения соединительной ткани, как например, при склеротическом лихене вульвы.

Склеротический лихен вульвы (СЛВ) — это хроническое воспалительное заболевание кожи, которое преимущественно поражает область вульвы у женщин и сильно снижает качество жизни. Фотодинамическая терапия (ФДТ) является эффективным методом лечения СЛВ, воздействуя на волокна коллагена и сосудистый компонент дермы. Из-за рецидивирующего характера заболевания и аномального синтеза коллагена, восстановление ткани может происходить не полностью. Для неинвазивной оценки восстановления ткани предложено использование метода мультимодальная оптическая когерентная томография.

Цель исследования. Поиск оптических критериев эффективности ФДТ и раннего рецидива склеротического лихена.

Материалы и методы. Исследовано 12 пациенток с диагнозом СЛВ и 10 пациенток без патологии вульвы на базе Нижегородского областного онкологического диспансера. ФДТ проведена медицинским лазером «Ляхта-Милон» 662 нм в дозе 0,16 Вт/см² с в/в введением Фотодитазина (0,7 мг/кг). Исследование выполнено на ММ ОКТ, разработанном в Институте прикладной физики РАН (г. Нижний Новгород). 3D-массив данных размером 3,4×3,4×1,25 мм³, получен в течение 26 с, из которого извлекалась информация о структуре ткани и микроциркуляции. Динамическое наблюдение проведено до ФДТ, сразу после ФДТ, через 24 часа, 1 - 4 месяца и 6 месяцев после ФДТ. Гистологическое исследование выполнено до ФДТ и через 4 месяца после ФДТ.

Результаты. Мультимодальная ОКТ при СЛВ демонстрирует изменение рассеивающих и поляризационных свойств ткани вульвы из-за атрофии эпидермиса, гиперкератоза, отека и формирования склеротической дермы, а также снижение кровеносных и лимфатических сосудов относительно нормы. После ФДТ наблюдалось снижение плотности сосудистой сетки, вплоть до полного их исчезновения через 24 часа. Начиная с 1 месяца после ФДТ, плотность кровеносных и лимфатических сосудов постепенно восстанавливалась, достигнув максимального уровня через 2 - 3 месяца после ФДТ, однако при этом не достигая значений плотности характерных для нормальной ткани. Восстановление рассеивающих и поляризационных свойств одновременно с восстановлением слоистой структуры на ОКТ изображениях наблюдали на 2й месяц после ФДТ. Биопсия на 4 месяце после ФДТ демонстрирует картину нормотрофического рубца.

Выводы. Мультимодальная ОКТ является перспективным прижизненным методом контроля за восстановлением как сосудистого компонента ткани вульвы, так и волокон коллагена в динамике. Это может позволить оценить эффективность лечения и вовремя обнаружить возникновение рецидива СЛВ.

Работа проведена при поддержке гранта Российского научного фонда №19-75-10084-П.

1. Bouma B. E. et al. Optical coherence tomography // Nat Rev Methods Primers. 2022. Vol. 2 P.79
2. Gubarkova, E. V. et al. Multiphoton tomography in differentiation of morphological and molecular subtypes of breast cancer: A quantitative analysis // Journal of biophotonics. 2021. Vol. 14 P. e202000471.
3. Gubarkova, E. V. et al. Optical coherence angiography for pre-treatment assessment and treatment monitoring following photodynamic therapy: a basal cell carcinoma patient study // Scientific reports. 2019. Vol. 9. P. 18670.

Наличие полового диморфизма в морфо-функциональной организации астроцитов в репликативной модели старения

Широкова О.М.^{1*}, Васильчиков П.И.^{1,2}, Коротченко С.А.¹, Першин В.И.^{1,2}, Чернов Я.В.¹, Давыдов Д.И.^{1,2}, Козляева Е.В.¹, Щелчкова Н.А.^{1,2}, Мухина И.В.^{1,2}

¹*Приволжский исследовательский медицинский университет, 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1; ;*

²*Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского, 603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23;;*
shirokovaom@gmail.com

Ранее предполагалось, что клетки организма у особей мужского и женского пола животных и человека имеют одинаковые молекулярные пути в онтогенезе, и поэтому в целях экономии средств все исследования, включая те, которые легли в основу доказательной медицины, проводились преимущественно на особях мужского пола (Clayton, 2016). Однако в дальнейшем выяснилось, что многие отличия в реакции на различные типы лечения у мужчин и женщин заключаются не только в эндокринной регуляции, но и в генетическом половом диморфизме на уровне внутриклеточных компонентов соматических клеток (Mauvais-Jarvis et al., 2020). Поскольку митохондрия-эндоплазматические контакты (МЭРК) являются не только высоко консервативными компонентами клетки, но и центральными участниками в большинстве заболеваний, изучение их свойств в контексте биологического пола становится актуальным для дальнейшего адекватного понимания патогенетических механизмов.

Целью работы был поиск полового диморфизма глиальных клеток мозга при старении в зависимости от наличия половых хромосом, и определения роли МЭРК в этом процессе.

Старение в первичной культуре астроцитов коры головного мозга достигалось уменьшением репликативного потенциала. Функциональные, молекулярные и структурные различия между культурами клеток, содержащих XX- и XY - половые хромосомы, оценивались после генотипирования новорожденных мышей, от которых были взяты клетки коры. Экспрессию ряда генов оценивали методом ПЦР в реальном времени, функциональное состояние клеток изучали с помощью кальциевого имиджинга с использованием кальциевого красителя Fluo-4-AM (Thermo Fischer, США). Иммуноцитохимическое маркирование астроцитарных клеток позволило идентифицировать клетки, состояние контактов между митохондриями и эндоплазматическим ретикуломом оценивали с помощью просвечивающей электронной микроскопии, содержание NSE, S100, BDNF и эстрадиола выявляли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) (Cloud-Clone, Китай).

Количественное определение белков и эстрадиола в клеточной среде и лизатах клеток методом ИФА не показал статистически достоверных различий между клетками, содержащими разные половые хромосомы. По кальциевому имиджингу *in vitro* обнаружена статистически достоверная разница в кальциевой активности астроцитарных клеток в зависимости от принадлежности половых хромосом на 8-м и 9-м пассажах. Длительность и частота кальциевых осцилляций у XX-генотипа была выше, чем у XY-генотипа. Обнаружены различия в жизнеспособности глиальных клеток между генотипами на поздних пассажах: в XX-генотипе жизнеспособность клеток выше, чем клеток с XY-генотипом. Была определена разница в экспрессии ряда генов: *snrH*; *stat3*; *MFN*; *IgF1*; *П6*; *cGamp*. Объем астроцитарных клеток XX-генотипа был больше, чем у астроглии XY-генотипа. В то же время, каких-либо ультраструктурных различий при качественном анализе между астроцитами разного генотипа по половым хромосомам не обнаружено.

Таким образом, выявлены данные, доказывающие существование различий в функциональных свойствах (кальциевая активность, экспрессия ряда генов) и морфометрических показателях (объем клеток) астроцитов при старении в зависимости от наличия половых хромосом, что свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения полового диморфизма соматических клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-15-20043.

Нейропротекторный потенциал закисления внутриклеточной среды в токсической модели болезни Паркинсона

Надеев А.Д.^{1*}, Крицкая К.А.¹, Федотова Е.И.¹, Бережнов А.В.¹

¹Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»; madeev1987@gmail.com

Болезнь Паркинсона (БП) - это прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, вызванное потерей дофаминергических нейронов среднего мозга. Механизм нейродегенерации связан с накоплением патологических белковых агрегатов, окислительным стрессом и митохондриальной дисфункцией, включая нарушение митофагии. Предполагается, что активация митофагии позволяет избежать гибели клеток и вернуть их к нормальному функционированию. Ранее мы продемонстрировали, что лактат и пируват способны восстанавливать функцию митохондрий, путем индуцирования митофагии через снижение внутриклеточного рН. Концентрация лактата в организме может резко увеличиваться во время физической активности, при этом мозг поглощает лактат пропорционально концентрации в артериальной крови. Исходя из этого, мы предположили, что физические упражнения могут косвенно индуцировать митофагию в нейронах среднего мозга. Помимо этого, увеличение концентрации углекислого газа (5-20%) во вдыхаемом воздухе, вызывает обратимое закисление клеток мозга. Следовательно, это может способствовать митофагии. Таким образом, мы предположили, что принудительное вдыхание газовой смеси с высоким содержанием CO₂ может активировать митофагию и способствовать выживанию нейронов.

В данной работе мы стремились проверить два экспериментальных терапевтических подхода: принудительную умеренную физическую активность и ингаляцию высокого содержания CO₂ для лечения БП на модели грызунов, получавших модельный токсикант ротенон.

В экспериментах использовались 12-месячные мыши линии CD-1. Ротенон, растворенный в оливковом масле, вводили внутривентрикулярно 5 раз в неделю в течение 6 недель в дозе 2 мг/кг массы тела. Лечение проводилось начиная с третьей недели токсического моделирования. Умеренная физическая активность заключалась в принудительном беге на беговой дорожке; для принудительной ингаляции животных помещали в закрытый стеклянный цилиндр, заполненный 20% атмосферой CO₂ на 2 минуты. Симптомы развития БП оценивались в поведенческих тестах на нарушение локомоции и координации: «сужающаяся дорожка» и «цилиндр». Парафинизированные срезы мозга окрашивали по Нисслю.

Через 2 недели ротенон вызывал достоверные снижение двигательной активности и нарушение координации.

В наших экспериментах лечение умеренной физической нагрузкой не привело к значительным восстановительным изменениям в исследуемых нейроповеденческих параметрах.

Напротив, наша вторая терапевтическая процедура, состоящая в принудительной ингаляции высокого CO₂, продемонстрировала многообещающие результаты. Мыши, подвергавшиеся воздействию 20% CO₂ три раза в неделю, не проявляли признаков нарушения координации в тесте «сужающаяся дорожка» на протяжении 4 недель экспериментальной терапии с достоверным отличием от уровня до лечения на 2-й неделе. Кроме того, в тесте «цилиндр» мы наблюдали восстановление и даже повышение на 1-й неделе общей локомоторной активности, сниженной после введения ротенона. В совокупности эти тесты демонстрируют эффективность воздействия CO₂ на сенсомоторную функцию. Также, на гистологических срезах мозга мышей не наблюдалось поражений нейронов черной субстанции, в отличие от контрольной группы, получавшей ротенон. Однако, анализ выживаемости не выявил отличий этой терапии в сравнении с группой без лечения.

Таким образом, мы провели первичную экспериментальную проверку предложенного нами, ранее не применявшегося терапевтического подхода. На токсической модели БП мы впервые продемонстрировали, что вдыхание высокого CO₂, предположительно через транзитное закисление мозга и, таким образом, инициирование митофагии, может устранять симптомы БП.

Работа поддержана грантом РФФИ 22-24-01043.

Новая технология оценки метаболического ответа глиом на химиотерапию с использованием время-разрешенной флуоресцентной микроскопии

Сачкова Д.А.^{1,2*}, Ширманова М.В.², Дружкова И.Н.², Щеславский В.И.², Можеров А.М.², Яшин К.С.², Южакова Д.В.²

¹*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия;*

²*Приволжский исследовательский медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Россия;*
sachkova.collins@gmail.com

Введение. Центральной проблемой в лечении глиомы является низкая эффективность стандартных схем химиотерапии, не учитывающих индивидуальных особенностей опухоли пациента. Развивающимся направлением в решении данной проблемы является разработка персонализированного подхода на основе использования пациент-специфических моделей и оценки эффективности терапии с помощью перспективного метода флуоресцентной время-разрешенной микроскопии (FLIM) метаболических коферментов. FLIM основан на детектировании времени жизни флуоресценции молекул, и отличается от стандартных методов оценки тем, что не требует использования красителей, деструкции клеток и тканей, позволяет получать данные в режиме реального времени.

Цель работы. Разработка новой технологии оценки метаболического ответа глиом на химиотерапию с использованием время-разрешенной флуоресцентной микроскопии.

Материалы и методы. Исследования проводили на культурах клеток, полученных из послеоперационного материала пациентов с диагнозом астроцитомы высокой степени злокачественности (Grade II-IV). Краткосрочные культуры выделяли путем механической дезагрегации и культивирования мелких фрагментов опухоли. Химиотерапию проводили препаратом Темодал (OrionPharma, Финляндия). Визуализацию автофлуоресценции метаболического кофермента никотинамиддинуклеотида (фосфата) НАД(Ф)Н осуществляли с помощью конфокального микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) с FLIM приставкой на основе время-коррелированного счета одиночных фотонов TCSPC (Becker & Hickl, Германия) (возбуждение 375 нм, прием 435 – 485 нм).

Результаты. Была набрана библиотека первичных культур глиом пациентов. Была разработана технология оценки метаболического ответа культур глиом после воздействия химиотерапией. Технология включает в себя оптимизированные условия выделения и культивирования краткосрочных культур, подобранные дозы химиопрепарата для воздействия на культуры и параметры визуализации НАД(Ф)Н методом FLIM.

Показано, что использование метода FLIM позволяет выявлять культуры глиом с метаболическим ответом, развивающимся в результате действия химиотерапии. Было продемонстрировано увеличение относительного вклада связанной с белком формы НАД(Ф)Н a_2 в среднее время жизни флуоресценции в опухолевых клетках после инкубации с Темодалом в течение 72 ч, что коррелирует со снижением жизнеспособности после проведения химиотерапии по результатам МТТ-теста. Наличие подобных изменений может быть связано с метаболическим сдвигом в сторону окислительного фосфорилирования и снижением пролиферативной активности опухолевых клеток в результате эффективно подобранной схемы терапии. В том случае, если не наблюдается изменений в параметрах времени жизни НАД(Ф)Н, либо регистрируется снижение относительного вклада a_2 , это коррелирует с отсутствием выраженного ответа клеток на химиотерапию.

Выводы. Инновационный метод FLIM-имиджинга способен выявлять метаболические изменения в культурах глиом пациентов после химиотерапии на основе параметров времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н. Разработанная технология оценки метаболического ответа опухолевых клеток на лечение может являться эффективным подходом для подбора персонализированной терапии. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 21-75-00098).

Новые коллоидные системы на основе биомиметических поликомплексов

Григорян И.В.^{1,2*}, Спиридонов В.В.¹, Адельянов А.М.¹, Кокшаров Ю.А.^{1,2}, Потапенков К.В.¹, Таранов И.В.², Хомутов Г.Б.^{1,2}, Ярославов А.А.¹

¹МГУ;

²Институт радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН;
grigorian.iv19@physics.msu.ru

В настоящее время одной из наиболее актуальных междисциплинарных проблем на стыке биофизики, химии и медицины является создание новых эффективных систем лекарственной терапии, основанных на избирательной и целенаправленной доставке лекарственных препаратов непосредственно в области организма, являющиеся целями терапевтического воздействия. Решение этой проблемы связано с разработкой биосовместимых коллоидных средств капсулирования лекарственных препаратов, способных обеспечить управляемую адресную доставку и высвобождение лекарств в целевые области организма. При этом управление локализацией коллоидных носителей и лекарственных препаратов в биологических жидких средах организма может быть обеспечено химическими, биохимическими и физическими (в частности, магнитными) воздействиями.

В данной работе описаны новые коллоидные магнитные поликомплексы на основе биосовместимых полимеров, модифицированные биогенным полиамином спермином, которые могут использоваться для капсулирования и доставки лекарств.

В ходе работы:

1. Были получены новые коллоидные поликомплексы на основе молекул полиакриловой кислоты различной молекулярной массы, модифицированных спермином. Были определены основные характеристики поликомплексов: дзета-потенциалы, гидродинамические диаметры, изучена агрегативная устойчивость комплексов и определено оптимальное для дальнейшей модификации соотношение между числом звеньев полианиона и числом молекул катионного “сшивателя”.

2. Была продемонстрирована возможность включения в поликомплексы лекарственных соединений. В качестве такого соединения в работе использовали противоопухолевый препарат доксорубин

3. Методом ЭПР исследованы магнитные свойства поликомплексов, функционализированных магнитными наночастицами. Получены данные, указывающие на природу наночастиц, образующихся в биополимерной матрице.

Полученные результаты указывают на возможность создания новых магнитных поликомплексов на основе биосовместимых полимеров, модифицированных биогенным полиамином спермином, способных включать в свой состав лекарственные препараты.

Литература

1 - V.V. Spiridonov et al., “Magnetosensitive Water-Soluble Nanocomposite Based on Sodium Alginate and Fe₂O₃ Nanoparticles”. Macromolecular Symposia. Том 389, № 1, 2020

2 - D.A. Gorin et al., “Effect of Microwave Irradiation on Composite Iron Oxide Nanoparticle/Polymer Microcapsules”. Proc. of SPIE Vol. 6536, 2007.

3 - Yu. A. Koksharov et al, “Low temperature electron paramagnetic resonance anomalies in Fe-based nanoparticles”. Journal of Applied Physics. Volume 88, Number 3. 1 august 2000.

Новый подход для оценки эффективной внутриклеточной концентрации биоактивных молекул на примере модульных нанотранспортеров, способных взаимодействовать с Nrf2-системой клеток

Храмцов Ю.В.^{1*}, Бунин Е.С.^{1,2}, Алиева Р.Т.^{1,2}, Слестникова Т.А.¹, Соболев А.С.^{1,2}

¹Институт биологии гена РАН;

²Биологический факультет МГУ;

ykhram2000@mail.ru

При изучении внутриклеточных взаимодействий биоактивных молекул с белками-мишенями, часто возникает задача определения концентраций данных молекул в клетке. Особый интерес при этом представляет концентрация только тех молекул, которые способны взаимодействовать с белком-мишенью, т.е. эффективная их концентрация. В цитоплазме она может довольно существенно отличаться от средней концентрации,

например, за счет того, что биоактивная молекула и белок-мишень могут находиться в разных клеточных компартментах. Для определения эффективной концентрации нами был разработан подход, основанный на обработке данных клеточного анализа теплового сдвига с помощью простой равновесной математической модели взаимодействия между молекулами. Этот подход был проверен на примере белковых конструкций, способных взаимодействовать с белком Kear1, приводя, тем самым к высвобождению транскрипционного фактора Nrf2 из комплекса с Kear1.

В нашей лаборатории активно разрабатываются полипептидные модульные системы доставки биоактивных молекул, которые способны связываться с выбранным рецептором на поверхности клеток-мишеней, интернализироваться в клетки путем эндоцитоза и выходить из эндосом. В настоящей работе осуществляется доставка антителоподобной молекулы – монободии R1 к белку Kear1. Для связывания с клетками и последующей интернализации использовалась другая антителоподобная молекула – аффибодии к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR). За выход из эндосом отвечал транслокационный домен дифтерийного токсина (ДТокс). Гемоглобиноподобный белок E.coli соединял все модули вместе и придавал конструкции необходимую растворимость. Такой модульный нанотранспортер в дальнейшем обозначен МНТ, а контрольная конструкция без монободии к Kear1 – МНТк.

Интернализация МНТ, меченного флуоресцентным красителем, изучалась с помощью метода проточной цитофлуориметрии на клетках печени мыши (alpha mouse liver 12, AML12). Уже через 15 минут инкубации клеток AML12 с МНТ флуоресценция клеток достоверно возрастает по сравнению с контролем без добавления МНТ. Показано, что интернализация в большей мере обусловлена взаимодействием МНТ с EGFR, а не неспецифическим связыванием с клетками.

Способность ДТокс в составе МНТ вызывать рН-зависимое нарушение целостности липидных мембран исследовали по выходу флуоресцентного красителя кальцеина из фосфатидилхолиновых липосом, нагруженных кальцеином в концентрации, приводящей к самотушению флуоресценции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ДТокс сохраняет свою активность в полученном МНТ, что видно по наличию пика мембранолитической активности при значении рН 5,5.

Способность монободии R1 в составе МНТ взаимодействовать с Kear1 в растворе была проверена с помощью метода термфореза. Было показано, что константа диссоциации комплекса МНТ с Kear1 составляет 8 ± 3 нМ, т.е. это взаимодействие является высокоаффинным. Учитывая, что сродство свободного монободии к Kear1 значительно выше, чем монободии в составе МНТ, отщепление данного монободии в эндосомах будет способствовать его взаимодействию с Kear1 в клетках.

Доказательство взаимодействия МНТ с Kear1 в клетках было получено с помощью метода резонансного переноса энергии по Фёрстеру с использованием микроскопии времени жизни флуоресценции. Сущность этого метода заключается в том, что время жизни донора существенно уменьшается, если молекула акцептора находится на расстоянии не больше, чем 10 нм. Клетки AML12 были трансформированы белком Kear1, слитым с зеленым флуоресцентным белком (eGFP). А МНТ и МНТк были помечены флуоресцентным красителем AlexaFluor568. После 1 часа инкубации клеток с МНТ, но не с МНТк, наблюдается достоверное уменьшение среднего времени жизни флуоресценции eGFP.

Количественно описать взаимодействие МНТ с Kear1 и последующее вытеснение Nrf2 из комплекса с Kear1 можно с помощью клеточного анализа теплового сдвига. Этот метод позволяет определить так называемую кривую плавления выбранного белка, которая зависит от образования данным белком комплекса с другой молекулой. Таким образом, с помощью иммуноблота, например, с антителами на Nrf2 можно получить долю свободного Nrf2 при разных временах инкубации клеток с МНТ. Используя эту долю и простую равновесную модель конкурентного взаимодействия МНТ с Nrf2-системой, можно оценить концентрацию МНТ в цитоплазме клеток. С помощью предложенного нами подхода были оценены концентрации в цитоплазме Nrf2, Kear1 и МНТ для нескольких линий клеток и полученные результаты хорошо совпадают с данными иммуноблота, выполненными с антителами на выбранный белок и соответствующими калибровочными зависимостями.

Для повышения эффективности МНТ в его состав был введен сайт отщепления монободии R1 эндосомной протеазой катепсином В. Применение предложенного нами подхода для такого МНТ показало существенное возрастание его эффективности, как за счет того, что свободная монободия имеет большее сродство к Kear1, по сравнению с монободией в составе МНТ, так и за счет увеличения доли монободии, вышедших из эндосом.

Таким образом, нами был предложен новый подход для оценки эффективной внутриклеточной концентрации биоактивной молекулы, способной взаимодействовать с выбранным белком-мишенью. Данный подход был использован для оценки концентрации модульных нанотранспортеров, способных взаимодействовать с белком Kear1 и приводить к вытеснению транскрипционного фактора Nrf2 из комплекса с Kear1.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-24-00035).

О молекулярных механизмах действия оксида азота и аскорбиновой кислоты в перитонеальных макрофагах

Куроптева З.В.^{1*}, Белая О.Л.², Жумабаева Т.Т.³

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;

²Московский государственный медико-стоматологический университет Минздрава России;

³Ошский государственный университет, Киргизия;

zv.kuropteva@gmail.com

В 1980-е годы было установлено, что активированные макрофаги (МФ), культивируемые совместно с опухолевыми клетками-мишенями, убивают клетки-мишени. И агентом, ответственным за гибель опухолевых клеток, является синтезируемый макрофагами оксид азота. Было показано, что ингибирование синтеза NO в макрофагах приводит к снижению противоопухолевой сопротивляемости организма и установление этого основного факта внесло огромный вклад в расширение исследований, связанных с образованием и функцией NO в норме и при патологии. И хотя имеются разнообразные, иногда и противоречивые данные о роли NO в развитии опухолей, всё же определённо установлено, что NO, синтезированный лейкоцитами и макрофагами, играет основную роль в их способности уничтожать опухолевые клетки.

Оказалось, что поддерживаемая продолжительная продукция NO в макрофагах обеспечивает их цитостатическую/цитотоксическую активность не только по отношению к опухолевым клеткам, но и в отношении вирусов, бактерий, грибов, простейших, гельминтов. На клеточных линиях и линиях мышей было показано, что резистентность к микробам часто связана с экспрессией индуцируемой NO-синтазы (iNOS). Более прямое доказательство роли iNOS было получено вначале Hibbs J. и его коллегами (1987 г.), а затем и многими другими исследователями. Они использовали ингибиторы iNOS и показали, что ингибиторы ухудшают течение болезней, вызванных множеством вирусов и бактерий. Очевидно, что NO не единственный антипатогенный эффектор иммунной защиты, но в значительном большинстве случаев он является либо индуктором, либо исполнителем бактерицидной программы. Поэтому повышение синтеза (NO) в клетках иммунной системы имеет важное значение для повышения устойчивости организма к инфекционным заболеваниям, и, возможно, исходя из данных литературы, и профилактике опухолевых заболеваний.

В работе использовали перитонеальные макрофаги, выделенные стандартным способом вымывания содержимого брюшной полости мышей линии SHK 0,9% раствором NaCl. Собранные клетки дважды промывали тем же раствором и центрифугировали при 250 g в течение 10 мин. Осадок суспендировали в физрастворе. Концентрация клеток составила 2×10^9 в 1 мл. Для питания клеток добавляли 2% р-р сыворотки КРС (Biowest, France). Оказалось, что выделенные стандартным способом перитонеальные МФ, инкубируемые при комнатной температуре, без дополнительного стимулирования также могут синтезировать незначительное количество NO, которое можно было обнаружить по появлению нитритов и нитратов, являющихся стабильными продуктами окисления NO и регистрируемых методом УФ-спектроскопии при поглощении 330-340 нм. При исследовании образования NO методом ЭПР в качестве ловушки NO использовали Hb, который имеет высокое сродство к NO, и при взаимодействии с ним образует стабильные нитрозильные комплексы Гем-NO (НК Гем-NO), которые обуславливают хорошо известный сигнал ЭПР – широкий синглет с g-фактором 2,02 и характерным триплетным расщеплением 17 Гс при g-факторе 2,01. Суспензии МФ были инкубированы в течение 20 и 48 ч как в присутствии АК, так и без неё. К 48 ч интенсивность сигнала ЭПР НК Гем-NO а, следовательно, и количество образовавшегося NO, в образцах, инкубированных с АК более, чем втрое превышали интенсивность этого сигнала в образцах без АК. Количественная оценка показала, что каждая клетка МФ в условиях эксперимента за 48 часов могла синтезировать до $1,5 \times 10^9$ молекул NO. По спектрам поглощения нитритов/нитратов было зафиксировано меньшее увеличение синтеза NO, чем методом ЭПР. Это связано с тем, что в опытах ЭПР все образующиеся молекулы NO акцептируются гемоглобином, приводя к появлению стабильных НК Гем-NO, тогда как при регистрации спектров поглощения до тех пор, пока не израсходована вся АК в надосадочной жидкости, образовавшиеся нитриты частично могут разлагаться под действием АК. По полученным и имеющимся в литературе данным, можно сделать наиболее вероятное предположение, что основная роль АК заключается в восстановлении кофакторов iNOS. NO-синтаза - тщательно регулируемый фермент и для нормального функционирования этого фермента необходимы 6 кофакторов: FMN, FAD, NADH, BH₄, NADPH и связанный с активным центром кальмодулин. При этом, ключевым кофактором iNOS является тетрагидробиоптерин (BH₄), который окисляется при работе iNOS, превращаясь в дигидробиоптерин (BH₂). АК восстанавливает BH₂ и тем самым поддерживает уровень BH₄, восстанавливая активность iNOS, что в результате приводит к увеличению синтеза NO.

О радиозащитных свойствах препаратов на основе хлорофилла

Ромодин Л.А.^{1,2*}

¹ГНЦ РФ ФМБЦ им А.И.Бурназяна;

²ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ»;

rla2904@mail.ru

Ввиду растущей угрозы радиоактивного загрязнения среды по причине возможных аварий на объектах радиационной промышленности, увеличивающегося количества радиоактивных отходов и вероятности применения и испытаний ядерного оружия, разработка эффективных и безопасных радиозащитных препаратов остаётся весьма актуальной задачей. Эти препараты необходимы и для облегчения последствий лучевой терапии у онкологических больных, а также профилактики лучевого поражения у космонавтов. И несмотря на то, что данной проблемой занимаются с середины прошлого века, считать её решённой на настоящий момент не представляется возможным.

Это связано со слабым радиозащитным действием используемых радиопротекторов с низкой химической токсичностью и высокой токсичностью хорошо действующих радиопротекторов: индралина и амифостина, применяемых, соответственно, в России и на Западе [1].

Однако в литературе имеются сообщения, что препараты на основе хлорофилла могут обладать значительными радиозащитными свойствами (подробнее – см. обзор [2]). За рубежом большое внимание уделяли хлорофиллину – водорастворимому производному хлорофилла [3–5]. Имеются сведения о его защитном действии на генетический аппарат облучённых животных [3, 4] и о возможном подавлении им метаболизма липидных радиотоксинов [5]. Способность хлорофиллина подавлять перекисное окисление липидов была доказана при использовании метода регистрации хемилюминесценции [6].

В России концепцию об использовании препаратов на основе хлорофилла как радиозащитных средств, независимо от иностранных коллег, предложил профессор Н.П. Лысенко. Он делал упор на применении непосредственно самого хлорофилла. В выполненной под его руководством докторской диссертации [7] было показано увеличение под его действием выживаемости мышей, подвергшихся воздействию γ -излучения, и снижение содержания в их печени и сыворотки крови продуктов липидной перекисидации.

Для успешного применения препаратов на основе хлорофилла необходимо определить наиболее эффективную клинически приемлемую форму препарата. Перспективным видится применение водорастворимого хлорофиллина. Поэтому именно он был выбран для дальнейших исследований.

В эксперименте, проведённом совместно с мл. научн. сотр. лаб. Радиационной биофизики ФМБЦ им. А.И. Бурназяна М.А. Игнатовым, суспензия лимфоцитов человека, предварительно инкубированная в присутствии Na-Cu-хлорофиллина в концентрациях 5–100 мкМ, подвергалась воздействию рентгеновского излучения в дозе 2 Гр. Проведённая после этого методом щелочного гель-электрофореза единичных клеток оценка степени повреждения ДНК не выявила достоверных отличий между образцами, инкубированными в хлорофиллине различных концентраций, и контрольными пробами.

Этот результат стал причиной проведения исследования на предмет способности Na-Cu-хлорофиллина проникать внутрь лимфоцитов. В ходе него суспензия лимфоцитов инкубировалась в растворе хлорофиллина концентрацией 300 мкМ, после чего лимфоциты с помощью центрифугирования при 200 g в течение 20 минут были отделены от среды инкубации и были лизированы 0,5% тритоном X-100. Спектрофотометрическая оценка содержания хлорофиллина в лизатах и среде инкубации выявила, что концентрация хлорофиллина в лизатах лимфоцитов оказалась выше, чем в среде. Это позволило предположить, что он проникает в цитоплазму по механизму активного транспорта.

Однако через ядерную мембрану хлорофиллин, скорее всего, не проникает. Этим можно объяснить то, что он не смягчил деструктивное действие рентгеновского излучения на ДНК лимфоцитов в облучённой суспензии, а в работах [3, 4], в которых оценивалось его действие в клетках костного мозга и сперматогониях облучённых мышей, хлорофиллин показал генопротекторный эффект. Данные клетки постоянно претерпевают митоз, в ходе которого ядерная мембрана разрушается. Поэтому хлорофиллин из цитоплазмы легко оказывался в их ядрах, где уже мог защитить их генетический аппарат.

А так как наибольшей радиочувствительностью обычно обладают именно быстроделющиеся клетки, хлорофиллин можно считать веществом, достойным дальнейшего изучения на предмет использования для нивелирования последствий лучевого поражения.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-24-00383, <https://rscf.ru/project/23-24-00383/>.

Литература

1. Рождественский Л.М. Проблемы разработки отечественных противолучевых средств в кризисный период: поиск актуальных направлений развития // Радиационная биология. Радиозоология. 2020. № 60(3) – С.: 279–290. doi: 10.31857/S086980312003011X

2. Ромодин Л.А., Лысенко Н.П. Радиопротекторное действие препаратов на основе хлорофилла // Биофизика. 2022. № 67(1) – С.: 96–104. doi: 10.31857/S0006302922010094
3. Morales-Ramirez P., Mendiola-Cruz M.T. In vivo radioprotective effect of chlorophyllin on sister chromatid exchange induction in murine spermatogonial cells // Mutation research. 1995. № 344(1-2) – P.: 73–78. doi: 10.1016/0165-1218(95)90041-1
4. Morales-Ramirez P., Garcia-Rodriguez M.C. In vivo effect of chlorophyllin on gamma-ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells // Mutation research. 1994. № 320(4) – P.: 329–334. doi: 10.1016/0165-1218(94)90085-x
5. Kumar S.S., Shankar B., Sainis K.B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes in vitro and in vivo // Biochimica et biophysica acta. 2004. № 1672(2) – P.: 100–111. doi: 10.1016/j.bbagen.2004.03.002
6. Ромодин Л.А. Угнетение хлорофиллином хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую комплексом цитохрома с с кардиолипином квазилипоксигеназную реакцию // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2020. № 20(4) – С.: 427–432. doi: 10.18500/1816-9775-2020-20-4-427-432
7. Поздеев А.В. Разработка радиозащитных средств на основе веществ растительного и минерального происхождения. Диссертация на соискание учёной степени доктора биологических наук. 2015. Кострома – 313 с.

Обнаружение радиационно-индуцированных изменений оптических свойств белого вещества головного мозга методом оптической когерентной томографии

Ачкасова К.А.^{1*}, Моисеев А.А.², Богомолова А.Ю.¹, Гладкова Н.Д.¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия;

²Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, Россия;

achkasova.k@bk.ru

Введение. Лучевая терапия является активно применяющимся методом лечения злокачественных новообразований головного мозга. Известно, что для повышения эффективности лечения необходимо подвергнуть воздействию ионизирующего излучения не только саму опухоль, но и прилежащие нервные ткани. Таким образом, радиотерапевтическое воздействие позволяет замедлить рост опухоли, но приводит к возникновению патологических изменений в окружающих тканях мозга, в частности, в белом веществе. К сожалению, возникновение структурных повреждений ткани белого вещества далеко не всегда выявляется на ранних сроках развития, что подчеркивает важность поиска новых способов их детектирования. Настоящее исследование направлено на исследование возможности использования оптической когерентной томографии (ОКТ) для обнаружения радиационно-индуцированных изменений белого вещества головного мозга.

Материалы и методы. Исследование проведено на *ex vivo* образцах головного мозга крыс, подразделенных на контрольную группу и группу, подвергшуюся воздействию рентгеновского излучения. На 7 временных точках (2-14 недель) после однократного облучения правого полушария в дозе 15 Гр проводилось ОКТ исследование фронтальных срезов головного мозга лабораторных животных. Последующая обработка ОКТ данных включала в себя вычисление коэффициента затухания в ко-поляризации Att(co), а также построение цветокодированных карт. Изучение структурных характеристик образцов проводилось с помощью окрашивания гистологических срезов гематоксилин-эозином, а также путем иммуногистохимического исследования с использованием антител к основному белку миелина (МВР). В качестве области интереса для детального исследования было выбрано мозолистое тело.

Результаты. Гистологический анализ исследуемых образцов позволил зарегистрировать появление структурных изменений в ткани мозолистого тела на этапах 2, 6 и 12 недель после облучения, что соответствует периодам острых и ранних отсроченных повреждений. На данных временных точках был отмечен отек *corpus callosum*, характеризующийся увеличением промежутков между миелиновыми волокнами. При этом, через 2 недели после облучения отек обнаруживался только в области облученного полушария, тогда как на этапах 6 и 12 недель регистрировался в обоих полушариях, что свидетельствует о распространении процесса по ходу миелиновых волокон. Анализ ОКТ данных позволил выявить соответствующие изменения в значениях коэффициента затухания. Так, на этапах 2, 6 и 12 недель были обнаружены статистически значимые снижения значения Att(co) в области мозолистого тела в облученном полушарии ($p < 0.0086$) по сравнению с контрольной группой. Кроме того, через 6 и 12 недель после облучения снижение значений коэффициента затухания также отмечалось в области контралатерального полушария ($p < 0.0346$). Таким образом, зарегистрированные изменения ОКТ сигнала подтверждают обнаруженные структурные повреждения.

Вывод. В ходе работы были зарегистрированы острые и ранние отсроченные радиационно-индуцированные изменения ткани белого вещества, обратимость которых подтверждается их последующим

исчезновением. Данные изменения характеризуются снижением рассеивающих свойств ткани, что может быть обнаружено при помощи метода ОКТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, грант №23-25-00118.

Образование пор в мембранах липосом, в присутствии комплексов цитохрома С с фосфатидной кислотой

Благова А.В.^{1*}, Степанов Г.О.¹, Осипов А.Н.¹

¹*РНИМУ им. Н.И.Пирогова;*

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 распределения красителя по объему кюветы, 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 MR. 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 Nov 13;9(11):2475-2487. p. 231-241.

2) Firsov AM, Kotova EA, Korepanova EA, Osipov AN, Antonenko YN. Peroxidative permeabilization of liposomes induced by cytochrome c/cardiolipin complex. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Mar;1848(3):767-74.

Объединение методов прижизненной кальциевой визуализации и электрофизиологической регистрации активности нейронов гиппокампа мышей

Винокуров Е.К.^{1*}, Ерофеев А.И.¹, Власова О.Л.¹, Безпрозванный И.Б.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого, Лаборатория Молекулярной Нейродегенерации;

²Отделение физиологии, Юго-Западный медицинский центр Техасского университета, Даллас, Техас, США;

eg.vinokurov@yandex.ru

Изучение фундаментальных и прикладных основ функционирования мозга входит в число приоритетных направлений современной науки. Исследования *in vivo* позволяют получать данные о прижизненной активности нейронной сети, которая представляет собой совокупность нейронов и других типов клеток, связанных между собой и выполняющих специфические физиологические функции. Нейронные сети обеспечивают сложную и высокоорганизованную работу головного мозга, а ее активность влияет как на ментальные, так и на физические стороны человеческой жизни. При этом важные результаты, полученные в ходе исследований головного мозга, в настоящий момент являются неполными, так как они были получены *in vitro* или *ex vivo*, поэтому исследование головного мозга *in vivo* является важной задачей современной нейробиологии.

В данном проекте мы разработали и изготовили микроэлектрод, который позволит объединить методы прижизненной кальциевой визуализации с помощью миниатюрного флуоресцентного микроскопа (минископа) и электрофизиологической регистрации.

Визуализация нейрональной активности *in vivo* может быть осуществлена при помощи специальных сенсоров, флуоресцирующих при изменении концентрации различных ионов, например, кальция. Семейство генетически кодируемых индикаторов кальция GCaMP (который представляет собой гибрид зеленого флуоресцентного белка (GFP), кальмодулина (CaM) и M13 (пептидной последовательности киназы легкой цепи миозина)) широко представлено в научной практике и часто используется в исследованиях нейронной активности. Кальциевая сигнализация связывает мембранную возбудимость и клеточные биологические функции, она играет важную роль в визуализации активности нейронов [1,2]. Метод кальциевой визуализации дает возможность понять функциональные взаимосвязи путем регистрации больших популяций нейронов [3,4].

Технология прижизненной кальциевой визуализации с помощью однофотонного миниатюрного флуоресцентного микроскопа (минископа) является важным современным инструментом для исследования нейронных сетей в различных областях мозга. Использование минископа позволяет регистрировать нейронную активность на свободно передвигающихся лабораторных животных, в отличие от традиционно применяемой двухфотонной визуализации.

Тем не менее, достижимое временное разрешение ограничено медленной (миллисекундной) кинетикой связывания Ca²⁺, поскольку генетически кодируемые флуоресцентные индикаторы Ca²⁺ на основе кальмодулина всегда демонстрируют увеличенное время затухания флуоресценции. Другими словами, регистрация высокочастотных потенциалов действия может быть ограничена динамикой кальциевого сенсора. Поэтому кальциевая визуализация *in vivo* не отражает всю активность нейронных сетей, что негативно сказывается на понимании механизмов, лежащих в основе формирования памяти, обучения, сна, социального поведения, питания, а также процессов, лежащих в основе их нарушения [5,6]. Одним из возможных путей решения данной проблемы является совмещение электрофизиологической регистрации и оптической визуализации. Для этого в данной работе мы спроектировали и изготовили микроэлектрод, адаптированный под размеры градиентной линзы и совмещенный с ней.

Данный микроэлектрод представляет собой трехслойную структуру прямоугольной формы из полиимидной пленки и контактных/токопроводящих дорожек из золота, нанесенных методом термоформовки. На одной из сторон пленки расположены 12 открытых токопроводящих контактов для регистрации локальных полевых потенциалов, а на другой стороне аналогичное количество токопроводящих дорожек для подключения коннектора, осуществляющего передачу данных на плату обработки.

Разработанный микроэлектрод позволит объединить методы прижизненной кальциевой визуализации с помощью минископа и электрофизиологической регистрации. Такой подход даст возможность более детально исследовать активность нейронных сетей, а также картировать мозг свободно движущихся лабораторных животных с высоким пространственно-временным разрешением, что расширит возможности исследований в области нейробиологии.

Целью нашей дальнейшей работы будет анализ активности нейронов гиппокампа на основе данных миниатюрной флуоресцентной микроскопии и параллельной регистрации локального полевого потенциала за счет разработанного микроэлектрода у лабораторных мышей дикого типа и с моделью болезни Альцгеймера во время оценки условно-рефлекторного замирания. Данное исследование позволит выявить нарушения при болезни Альцгеймера на уровне нейронных сетей и как следствие предположить потенциально новые методы

лечения или механизмы развития патологии, связанной с прогрессирующей потерей памяти при болезни Альцгеймера.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-75-00028 (АИЕ).

Список литературы

1. Berridge, M.J., Neuronal calcium signaling. *Neuron*. 1998. 21: p. 13-26.
2. Bezprozvanny, I.B. and Mattson, M.P., Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 2008. 31: p. 454-63.
3. Timko, B.P., et al., Electrical recording from hearts with flexible nanowire device arrays. *Nano Lett*. 2009. 9: p. 914-918.
4. Khodagholy, D., et al., Highly conformable conducting polymer electrodes for in vivo recordings. *Adv. Mater*. 2011. 23: p. 268-272.
5. Cai, D.J., et al., A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time. *Nature*. 2016. 533: p. 115-8.
6. de Groot, A., et al., NINscope, a versatile miniscope for multi-region circuit investigations. *Elife*. 2020. 9.

Объяснение молекулярных механизмов гипертермии через цитохром С-зависимые процессы

Степанов Г.О.^{1*}, Харитонов Д.В.¹, Алексеева А.О.¹, Ерёмина Я.В.¹, Бадалов А.А.¹, Волков В.В.¹,
Владимиров Ю.А.¹, Осипов А.Н.¹

¹*РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России;*
stepg@yandex.ru

Лечение онкологических заболеваний является одной из самых сложных задач для медицины. Хорошо известно, что в онкологических клетках сложно инициировать апоптотические процессы, включение которых необходимо для их элиминации из организма. В связи с этим особое внимание исследователей и врачей сегодня привлекают механизмы контролируемой клеточной гибели и способы их регуляции.

Как известно, одним из методов, который увеличивает эффективность лечения онкологических заболеваний, является гипертермия. При гипертермии выполняется избирательное нагревание опухолевых тканей до температур в диапазоне от 39 до 45°C. Последние разработки, основанные на терморадиобиологическом обосновании гипертермии, указывают на то, что она является мощным радио- и хемосенсибилизатором [1]. Кроме того, применение гипертермии может быть разделено во времени с сеансом лучевой терапии (согласно рекомендациям примерно на час) и, конечно, остается вопросом, как объяснить усиление проапоптотических свободнорадикальных процессов после незначительного увеличения температуры и тем более сохранение этого эффекта при возвращении к исходным значениям температуры.

Цель настоящего исследования: изучение структурных и функциональных изменений цитохрома с (CytC) как одного из основных белков, инициирующих апоптотические процессы по митохондриальному пути, а также влияние температуры на цитохром с – зависимые апоптотические процессы. Исследования выполнены на молекулярном уровне при помощи методов спектрофотометрии, спектрофлуориметрии и хемилюминесценции комплексов цитохрома С с кардиолипином (CL), фосфатидной кислотой (PA) и фосфатидилхолином (PC), при температурах до 45°C.

Было обнаружено, что комплексы CytC с PA или CL характеризуются увеличением интенсивности флуоресценции триптофана 59 примерно в 1.7 раза. Изменение интенсивности полосы 695 нм цитохрома с наблюдается только в присутствии CL содержащих липосом (на ~13.7% при 25°C, ~19.4% при 37°C и ~21.4% при 45°C), но отсутствует как в присутствии PC, так и PA. Интенсивность хемилюминесценции при повышении температуры с 25 до 37°C в присутствии PA увеличивается на 26%. При переходе с 37 на 45°C увеличения интенсивности хемилюминесценции Cyt C в присутствии фосфолипидов обнаружено не было. Особенно интересно, что и методами спектрофлуориметрии, и при оценке цитохром с - индуцированного ПОЛ (хемилюминесценция с кумарином) было показано явление гистерезиса при нагревании комплексов CytC с анионными фосфолипидами. Данное явление проявлялось в том, что структурные и функциональные свойства цитохрома с при его нагревании до 45°C с последующим охлаждением до 25°C значительно отличались (примерно до 26%) от аналогичных образцов, которые не подвергались предварительному нагреванию, а просто измерялись при 25°C.

Таким образом, показано, что: 1. Увеличение температуры изменяет конформацию и пероксидазную активность CytC; 2. Пероксидазная активность в присутствии анионных фосфолипидов возрастает; 3. Температурная инкубация CytC с PA и CL привела к необратимым конформационным изменениям, в отличие от

контрольного РС, что может служить объяснением молекулярных механизмов эффекта гистерезиса, который проявляется при проведении гипертермии и даже затрагивает рекомендации по его применению.

Библиографические ссылки

1. Datta NR, et al. Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: recent advances and promises for the future. *Cancer Treat Rev.* 2015.

Определение относительной биологической эффективности тонкого сканирующего пучка протонов с энергией 90–150 МэВ при облучении мышей до пика и в пике Брэгга

Стрельникова Н.С.^{1*}, Балакин В.Е.¹, Розанова О.М.², Смирнова Е.Н.², Белякова Т.А.¹, Шемяков А.Е.^{1,2}, Смирнов А.В.¹

¹Физико-технический центр Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Протвино, Россия;

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия;
strelnikova.ns@lebedev.ru

Введение. В настоящее время в лучевой терапии ускоренными заряженными частицами наиболее часто используются протоны, основным преимуществом которых является возможность высокоточного равномерного облучения даже небольшого объема мишени без дополнительного воздействия на окружающие здоровые ткани. Величина относительной биологической эффективности (ОБЭ) протонов практически не отличается от фотонов и в клинической практике при планировании облучения применяется коэффициент, равный 1.1. В последние годы фиксированное значение ОБЭ ставится под сомнение с позиции оценки безопасности и эффективности лечения, так как если доза в опухоли занижена, то риск рецидивирования увеличивается, а если завышена, то возрастает вероятность возникновения побочных эффектов. Основной проблемой при исследовании действия ускоренных частиц на биологические объекты является то, что величина ОБЭ зависит от многих факторов, как биологического характера: вида, пола, возраста животного; линии культивируемых клеток млекопитающих; метода регистрации повреждений, концентрации кислорода в тканях, стадии клеточного цикла, условий культивирования *in vitro* и метаболизма *in vivo*, так и физико-технических характеристик облучения: способа доставки и расчета дозы, дозы за фракцию, величины линейной передачи энергии (ЛПЭ) частиц (облучение до пика или в пике Брэгга), состава и однородности пучка ионов и вторичного излучения.

Цель. Определение относительной биологической эффективности тонкого сканирующего пучка протонов в зависимости от линейной передачи энергии частиц при тотальном облучении мышей в дозах 6.5–8.5 Гр по критерию 30-суточной выживаемости.

Материалы и методы. Эксперименты проводили в соответствии с международными требованиями на 2-месячных самцах мышей колонии SHK, которых содержали в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН. В работе было использовано 120 мышей. Каждую из групп делили на подгруппы (n=10–15) для облучения разными видами излучения и дозами. По отдельным экспериментальным точкам проведено 2–3 независимых эксперимента.

Животных облучали тотально в индивидуальных хорошо вентилируемых контейнерах. Облучение животных протонами проводили на комплексе протонной терапии ФТЦ ФИАН (Протвино) тонким сканирующим пучком с одного направления в импульсном режиме (длительность импульса 200 мс, 1 импульс в 2 с) и сигмой пучка – 2.8–3.6 мм в двух областях кривой Брэгга дозами 6.5–8.5 Гр. При облучении до пика Брэгга протонами с энергией частиц 150 МэВ ЛПЭ, рассчитанная по программе планирования, составляла 0.7±0.04 кэВ/мкм, а в пике Брэгга энергия частиц на выходе из ускорителя была 91–123 МэВ при среднем значении ЛПЭ 2.5±0.7 кэВ/мкм. Контроль дозы проводили дозиметром PTW UNIDOS (Германия) и дозиметрической пленкой (ЕВТЗ, США) с погрешностью поглощенной дозы ~5%.

Для определения коэффициента ОБЭ контрольные группы мышей были облучены жестким рентгеновским излучением (РИ) на установке РУТ (200 кВ, 2 кэВ/мкм, 1 Гр/мин; ЦКП “Источники излучения” ИБК, Пушино). Затем в течение 30 сут после радиационного воздействия ежедневно учитывали число павших животных, а также мышей взвешивали дважды в неделю. По итогам наблюдений получали кривые выживаемости, по которым оценивали динамику гибели и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) погибших от облучения мышей.

Результаты и обсуждение. Было обнаружено, что выживаемость мышей после облучения протонами как до пика, так и в пике Брэгга в исследованном диапазоне зависит от дозы. При дозе 6.5 Гр динамика гибели животных практически не отличалась и к 30-м суткам выживаемость в пике составила 70%, а до пика – 80%. Существенное различие в динамике гибели наблюдали только при 7.5 Гр: в пике Брэгга основная масса животных погибла с 10 по 13 сут, тогда, как до пика гибель проходила равномерно на протяжении всех 30 сут.

Во всех группах не зависимо от величины дозы наблюдалась максимальная потеря веса мышей до 25–30 % на 12–14 сут после облучения протонами. СПЖ погибших животных составила для групп 6.5 Гр: в пике Брэгга – 18±4 сут, до пика – 14±4 сут; 7.5 Гр: в пике Брэгга – 14±7 сут, до пика – 17±9 сут; 8.5 Гр: в пике Брэгга - 12±4 сут, до пика – 14±5 сут. Для определения величины дозы ЛД50/30, при которой выживает 50% животных в течение месяца, и которая является базовой радиобиологической характеристикой излучения, в качестве метода преобразования кривых смертности был использован пробит-анализ, с помощью которого были вычислены значения ЛД50/30: для протонов до пика Брэгга оно равнялось 7.6 Гр, в пике Брэгга – 6.9 Гр, а для РИ – 5.5 Гр. По критерию значений ЛД50/30 была вычислена величина ОБЭ до и в пике Брэгга, которая составила 0.72 и 0.80 соответственно, и статистически значимой разницы между величинами выявлено не было. Полученные значения согласуются с результатами ряда исследований определения ОБЭ по острым кожным реакциям мышей при облучении пучком протонов в пике Брэгга задней лапы и жесткого РИ, где величина ОБЭ находится в диапазоне 0.85–0.97. В экспериментах на культурах и тканях млекопитающих при оценке краткосрочных эффектов протонов при аналогичных дозах было определено, что в низком диапазоне ЛПЭ 0.3–10 кэВ/мкм величина ОБЭ протонов ниже или близка 1, то есть при 2–3- кратном увеличении ЛПЭ не наблюдается роста ОБЭ, в отличие от таких ускоренных частиц, которые применяются в радиотерапии, как ионы углерода и нейтроны, ЛПЭ которых значительно выше протонов. В нашей работе показано, что ОБЭ протонов с энергией 90–150 МэВ по критерию выживаемости мышей близко к 1 и не зависит от ЛПЭ. Полученные данные позволяют более широко использовать возможности комплекса “Прометеус” для разработки современных схем терапии, поиска новых радиопротекторов, а также корректировки радиационных рисков от галактических космических лучей при длительных полетах.

Особенности глиотрансммиттерного взаимодействия нейронов и астроцитов при распространении кальциевых сигналов

Верисокин А.Ю.^{1*}, Вервейко Д.В.¹, Браже А.Р.², Постнов Д.Э.³

¹*Курский государственный университет;*

²*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова;*

³*Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.*

Чернышевского;

ffalconn@mail.ru

Интенсивные экспериментальные исследования головного мозга показали, что для полноценного понимания основных механизмов передачи сигналов в нервной ткани нельзя ограничиваться исключительно моделированием нейронных связей. Так, показано, что не меньшее значение играют разнообразные внесинаптические связи, опосредованные процессами, протекающими как в глии, в частности в астроцитах, так и диффузией нейромедиаторов в межклеточном пространстве. Современное понимание особенностей функционирования нервной ткани привело к осознанию целесообразности моделирования процессов, протекающих в единой нейроглиоваскулярной единице, результат согласованного взаимодействия элементов которой как раз и является необходимым условием нормального физиологического состояния нервной ткани в целом. Представленное модельное исследование опирается на доступные к настоящему моменту, однако ещё далеко не полные, знания о действии нейромедиатора норадреналина на функционирование нейроглиоваскулярной единицы и влиянии глиотрансммиттерных путей на активность нервной ткани в целом. Мы основываемся на экспериментальных данных, согласно которым в присутствии норадреналина астроцит становится более чувствителен к окоლოსинаптическому глутамату, отвечая всплесками кальциевой активности на более слабую активность синапсов [1], согласно GANE-гипотезе ("glutamate amplifies noradrenergic effects") [2] высвобождение норадреналина в отдельных местах усиливается при выбросе глутамата в случае повышенной активности близкорасположенных синаптических терминалов. Изучение указанных процессов имеет ключевое значение для понимания процессов вывода вредных метаболитов из паренхимы мозга и, таким образом, определения путей снижения рисков развития и прогрессирования нейродегенеративных заболеваний [3].

Учёт указанных механизмов требует адекватного построения пространственной структуры математической модели. Существенными особенностями предложенной модели являются: основанное на экспериментальных данных двумерное представление морфологии астроцита; рандомизированное по пространству и времени распределение активности синаптических терминалов; пространственно неоднородное распределение уровня норадреналина, включающего как рассеянный уровень, так и локализованные источники; действие глиотрансммиттера, выделяемого астроцитом в ходе кальциевой активности. В качестве основы была взята предложенная нами ранее модель, описывающая кальциевую динамику на двумерном шаблоне астроцита, учитывающем сложную морфологию клетки [4].

Было проведено вычислительное исследование предложенной модели, позволившее подтвердить соответствие результатов численных экспериментов имеющимся экспериментальным данным. Показана высокая степень регулярности формирования кальциевых волн, связанная с тем, что при пространственно нерегулярной морфологии астроцита неизбежно присутствует область преимущественной инициации волны, а наличие времени рефрактерности у кальциевого осциллятора закрепляет эту локацию в роли пейсмейкера будущих волн. Показано, что добавление норадреналина вызывает немедленный всплеск уровня IP3 и рождение кальциевой волны (для биологических осцилляторов этот эффект известен как "переустановка фазы"), в зависимости от путей стимуляции норадреналином возникает разный уровень изменения концентрации IP3, определяющий различную частоту генерации кальциевых волн. Выполнена проверка работоспособности GANE-гипотезы: показано, что "удачное" взаиморасположение источников норадреналина и синаптических терминалов делает возможным взаимное усиление глутаматной и норадреналиновой активности и, таким образом, создает очаги высокой нейронной активности. Показано, что норадреналин, помимо прямого действия на астроцит, усиливает и пресинаптическую активность. В свою очередь распространение глутамата ведёт к активированию N-метил-D-аспартат (NMDA) рецепторов, выделению глиотрансмиттеров (например, D-serine) ускоряя дальнейшее высвобождение норадреналина. Все вместе эти пути образуют двойную цепь положительной обратной связи, которая может резко усилить нейромодуляторный эффект в небольшой области астроцита. Предложенная модель может быть использована в качестве шаблонной модели для дальнейших теоретических исследований эффектов, связанных с действием норадреналина на синапс и астроцит с учётом глиотрансмиттерной динамики, в том числе для анализа ситуаций, которые затруднительно или невозможно воспроизвести и проконтролировать экспериментально.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 21-74-00095.

Список литературы

1. Paukert M., Agarwal A., Cha J., Doze V.A., Kang J.U., Bergles D.E. Norepinephrine controls astroglial responsiveness to local circuit activity // *Neuron*. – 2014. – V. 82. – P. 1263–1270.
2. Mather M., Clewett D., Sakaki M., Harley C.W. Norepinephrine ignites local hotspots of neuronal excitation: How arousal amplifies selectivity in perception and memory // *Behavioral and Brain Sciences*. – 2016. – V. 39. – e200.
3. O'Donnell J., Ding F., Nedergaard M. Distinct functional states of astrocytes during sleep and wakefulness: Is norepinephrine the master regulator? // *Curr Sleep Med Rep*. – 2015. – V. 1(1). – P. 1-8.
4. Verisokin A. Yu., Vervevko D. V., Postnov D. E., Brazhe A. R. Modeling of Astrocyte Networks: Toward Realistic Topology and Dynamics // *Front. Cell. Neurosci*. – 2021. – V. 15. – 645068.

Особенности распространяющейся кортикальной депрессии и чувствительность к нитроглицерин-вызванной модели мигрени крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией

Ситдикова Г.Ф.^{1*}

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет;*
sitdikovaguzel@gmail.com

Мигрень - это неврологическое заболевание, первичная форма головной боли, симптомами которой являются периодические приступы головной боли средней и высокой интенсивности. Приступы мигрени, сопровождаются тошнотой, рвотой, фонофобией и/или светобоязнью. Одним из основных механизмов развития мигрени является повышение нейрональной возбудимости как периферических, так и центральных структур, активность которых лежит в основе генерации боли при мигрени. Гомоцистеин – это серосодержащая, образуется из метионина, поступающего с пищей. Нарушения метаболизма метионина приводят к повышению уровня гомоцистеина в плазме и цереброспинальной жидкости - гипергомоцистеинемии (гГЦ) [1, 2]. Распространяющаяся кортикальная деполаризация (РКД) представляет собой электрофизиологическое явление, лежащее в основе ауры при мигрени, приводит к нарушению ионного гомеостаза и к изменениям локальных сосудистых реакций. гГЦ по данным клинических является фактором развития мигрени, однако, экспериментальные данные, доказывающие такую зависимость, отсутствуют. Целью работы было исследование чувствительности к РКД у крыс с пренатальной гГЦ. Кроме того, были проанализированы механическая чувствительность и тревожность крыс с гГЦ в модели мигрени, вызванной нитроглицерином (НТГ).

Эксперименты проводили на крысах линии Wistar и были одобрены Локальным этическим комитетом КФУ (протокол № 33 от 25.11.2021 г). Пренатальную гГЦ индуцировали диетой с повышенным уровнем метионина. РКД регистрировали в соматосенсорной коре крыс *in vivo* в ответ на аппликацию повышающихся концентраций KCl (0.01-1.0 M). Кроме того, анализировали особенности распространения длительно возникающих РКД. После регистрации РКД для оценки метаболической активности клеток ткани мозга

окрашивали 2,3,5-трифенилтетразолий хлор (ТТС). Механическую чувствительность исследовали с помощью волосков Фрея, уровень тревожности определяли в тесте темно-светлая камера и открытое поле.

В контрольной группе пороговая концентрация КСI для индукции РКД составляла 100 мМ, в группе гГЦ 10-50 мМ. Кроме того, в группе гГЦ РКД были более длительные, а скорость деполяризации РКД ниже по сравнению с контролем. Фоновый показатель нейрональной активности (множественные потенциалы действия, МПД) в гранулярном и инфрагранулярном слоях был значительно выше в гГЦ группе, что указывает на большую возбудимость нейронов. Кроме того, прирост частоты МПД в группе гГЦ вначале РКД был достоверно выше относительно контроля. В следующей серии экспериментов исследовали способность соматосенсорной коры проводить длительные РКД при аппликации КСI в течение 2 часов. Количество РКД за 2 часа аппликации в гГЦ группе было достоверно выше, чем в контроле. В группе гГЦ повторные РКД распространялись преимущественно в нижних слоях, что может быть связано с пониженной резистентностью нейронов к деполяризации, вызванной КСI. Действительно, окрашивание срезов мозга красителем ТТС показало наличие «некротическая воронки» у животных гГЦ группы.

Известно, что чувствительность к генерации РКД коррелирует с таким поведенческим фенотипом как механическая аллодиния, тревожность и фотофобия, поэтому мы проанализировали эти параметры у крыс гГЦ группы. В группе гГЦ механический порог был значительно ниже, чем в контрольной группе. Введение НТГ снижало механический порог животных группы гГЦ в течение первого часа, уже ко второму часу наблюдения порог достигал минимального уровня. В контрольной группе механическая гипералгезия развивалась только к третьему часу введения НТГ. Повторное введение НТГ вызывало хроническую базальную механическую гиперчувствительность, которая в контроле наблюдалась на 5 сутки, а в группе гГЦ - на третьи сутки эксперимента. В тесте «темно-светлая камера» время до первого входа в темную камеру и общее время, проведенное в светлой камере, в контрольной группе было достоверно больше, чем в группе гГЦ. Через 2 часа после инъекции НТГ оба параметра сократились в обеих группах, однако, более значительные изменения наблюдались в группе гГЦ.

Таким образом, у крыс с пренатальной гГЦ наблюдается повышенная возбудимость нейронов и предрасположенность к возникновению связанного с мигренью с аурой феномена РКД. При этом механическая алгезия, светобоязнь и тревожность крыс с гГЦ также ассоциируется с высоким риском развития РКД [3,4,5].

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-15-00100)

Список литературы:

1. Petras, M.; Tatarkova, Z.; Kovalska, M.; Mokra, D.; Dobrota, D.; Lehotsky, J.; Drgova, A. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. *J. Physiol. Pharmacol.* 2014, 65, 15–23.
2. Sitdikova, G.F.; Hermann, A.; Yakovlev, A.V. Neurotoxic and neuroprotective effects of homocysteine and hydrogen sulfide. *Uchenye Zap. Kazan. Univ. Seriya Estestv. Nauk.* 2018, 160, 686–704.
3. Gerasimova E, Burkhanova G, Chernova K, Zakharov A, Enikeev D, Khaertdinov N, Giniatullin R, Sitdikova G. Hyperhomocysteinemia increases susceptibility to cortical spreading depression associated with photophobia, mechanical allodynia, and anxiety in rats // *Behav Brain Res.* 2021 Jul 9;409:113324. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113324
4. Yakovleva O, Bogatova K, Mukhtarova R, Yakovlev A, Shakhmatova V, Gerasimova E, Ziyatdinova G, Hermann A, Sitdikova G. Hydrogen Sulfide Alleviates Anxiety, Motor, and Cognitive Dysfunctions in Rats with Maternal Hyperhomocysteinemia via Mitigation of Oxidative Stress // *Biomolecules.* 2020 Jul 2;10(7):995. doi: 10.3390/biom10070995
5. Gerasimova, E.; Yakovleva, O.; Enikeev, D.; Bogatova, K.; Hermann, A.; Giniatullin, R.; Sitdikova, G. Hyperhomocysteinemia Increases Cortical Excitability and Aggravates Mechanical Hyperalgesia and Anxiety in a Nitroglycerine-Induced Migraine Model in Rats. *Biomolecules* 2022, 12, 735. <https://doi.org/10.3390/biom12050735>

Отличия морфодинамических процессов в селезенке у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДЦТ

Гагулаева Б.Б.¹, Яглова Н.В.^{1*}, Тимохина Е.П.¹, Обернихин С.С.¹, Яглов В.В.¹, Назимова С.В.¹

¹НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского;
yaglova@mail.ru

Морфодинамические процессы в организме отражают как реализацию генетической программы развития органов, так и влияние разнообразных внешних и внутренних факторов. Среди внешних факторов значительную роль играют эндокринные дисрапторы, поскольку их воздействие происходит повсеместно [1]. Эндокринные дисрапторы — химические вещества антропогенного происхождения, нарушающие функционирование эндокринной системы и регуляцию гомеостаза эндогенными гормонами [2]. Особую важность имеет способность эндокринных дисрапторов проникать через фетоплацентарный барьер [1,2]. Способность

эндокринных дисрапторов вызывать изменения морфодинамических процессов в организме остается открытым вопросом. Целью настоящего исследования было определение основных параметров морфодинамики у крыс, развивавшихся при пренатальном и постнатальном воздействии распространенного эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлортана (ДДТ).

Самки крыс Вистар получали раствор о,п-ДДТ 20 мкг/л («Sigma-Aldrich», США) вместо водопроводной воды с момента спаривания, во время беременности и лактации (n=5). После окончания подсосного периода потомство самок крыс получало тот же раствор о,п-ДДТ в постнатальном развитии. В группу исследования вошли самцы крыс (n=22), получавшие малые дозы о,п-ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах, и потомство мужского пола интактных самок (n=23). Животных выводили из эксперимента на 1-е (новорожденные), 7-е (подсосный период) сутки, а также в возрасте 6 (половое созревание) и 10 (половая зрелость) недель. Проводили определение массы тела, массы селезенки, гистологическое и компьютерное морфометрическое исследование препаратов селезенки. Полученные данные были статистически обработаны.

У новорожденных крыс отличий в массе органа не выявлено. В подсосном и пубертатном периодах динамика массы органа была аналогична контролю, то есть увеличивалась по мере взросления, особенно до полового созревания. После наступления половой зрелости у крыс контрольной группы увеличение массы органа было незначительным, а у крыс, развивавшихся при низкодозовом воздействии ДДТ, при переходе к половой зрелости выявлено значительное увеличение массы органа. Относительная масса органа также значительно превышала значения контрольной группы. Исследование морфодинамики паренхимы органа установило, что развитие белой пульпы у крыс контрольной группы отличалось от развития органа в целом. У новорожденных крыс белая пульпа отсутствовала, ее рост начался позднее. Аналогичная картина наблюдалась и у развивавшихся при воздействии ДДТ животных. Определение доли белой пульпы показало, что возрастная морфодинамика лимфоидных образований была одинаковой в сравниваемых группах.

Проведенное исследование показало, что у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, морфодинамические процессы в селезенке отличаются. После достижения половой зрелости увеличение органа, то есть его рост, не прекращается, а, наоборот, активируется, и происходит это за счет активного развития и лимфоидных образований и красной пульпы. Таким образом, низкодозовое воздействие эндокринного дисраптора ДДТ является фактором, обуславливающим нарушение морфодинамических процессов в селезенке.

Исследование выполнено при поддержке РНФ (грант № 23-25-00012).

Литература

1. La Merrill M.A., Vandenberg L.N., Smith M.T., Goodson W., Browne P., Patisaul H.B., Guyton K.Z., Kortenkamp A., Cogliano V.J., Woodruff T.J., et al. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2020. V.18. P.45–57.

2. Яглова Н.В., Яглов В.В. Эндокринные дисрапторы – новое направление исследований в эндокринологии. *Вестник РАМН.* 2012. №3. С.56-61.

Оценка влияния температурных рецепторов на активность менингеальных афферентов тригеминального нерва крысы

Ананьев А.С.¹, Федорина А.И.¹, Телина Э.Н.², Гафуров О.Ш.^{1*}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия;

osgafurov@kpfu.ru

Поддержание температуры тела является жизненно-важным процессом у теплокровных животных и человека. Учитывая, что повышение температуры тела зачастую приводит к головной боли, было показано участие термосенсоров в патогенезе мигрени. Считается, что пусковым механизмом боли при мигрени является активация волокон тройничного нерва. Известно, что термосенсорами в термочувствительных нейронах являются каналы суперсемейства TREK и TRP, при этом разные представители каналов активируются в различных диапазонах температур. Среди TRP каналов наиболее значимыми для патогенеза мигрени являются TRPV1, которые активируются при температуре выше 42°C; TRPV3 – выше 32°C; TRPV4 – при 27-34°C; TRPM8 – при 8-25°C; и TRPA1 – ниже 16°C, что также не исключает вероятность их кооперативного взаимодействия.

В настоящей работе мы исследовали влияние изменения температуры на электрическую активность тройничного нерва крысы.

Эксперименты проводили с использованием препарата полужелудка крысы. Регистрацию потенциалов действия (ПД) проводили от тройничного нерва, выделенного из менингеальной оболочки, с использованием внеклеточного электрода. Препарат помещался в ванночку и перфузировался раствором Кребса. В ходе эксперимента регистрировали ПД, возникающие в течение 10 минут на следующих этапах: в контроле при

температуре 22-23°C; после повышения температуры раствора в ванночке до 27°C; после повышения температуры раствора в ванночке до 37°C; после понижения температуры до 27°C с добавлением в раствор капсаицина в концентрации 1 мкМ.

ПД группировались с помощью кластерного анализа, который позволяет оценить вклад отдельных нервных волокон в общую активность тройничного нерва.

В среднем количество ПД за 5 минут в контроле составило 612 ± 219 (среднее \pm стандартная ошибка среднего; $n=5$). Повышение температуры раствора от 22 до 27°C приводило к достоверному увеличению количества ПД за 5 минут до 1616 ± 347 (ttest; $p<0.01$). Затем повышали температуру до 37°C, что в течение 5 минут вызывало увеличение количества ПД с 1066 ± 270 до 1421 ± 314 ($p<0.05$). Последующая аппликация капсаицина в концентрации 1 мкМ не изменяла частоту ПД. Среднее количество ПД за 5 минут действия капсаицина незначительно уменьшилось с 1362 ± 222 до 1271 ± 281 ($p=0.86$).

Серия экспериментов с увеличением температуры от 22 до 37°C показала достоверное увеличение количества ПД за 5 минут от 447 ± 214 в контроле до 1764 ± 717 при повышении температуры (Т-критерий Уилкоксона; $p<0.01$; $n=9$). Последующая аппликация капсаицина после понижения температуры показала незначительное увеличение количества ПД за 5 минутный интервал с 931 ± 388 до 959 ± 358 ($p=0.75$).

Кластерный анализ зарегистрированных в тригеминальном нерве ПД показал, что активность возникновения ПД в кластерах различается. Кластерный анализ проводили для серии экспериментов с последовательным изменением температуры до 27, 37°C и после аппликации капсаицина для того, чтобы выявить способность нервных волокон отвечать на различные воздействия, приводящие к изменению электрической активности. Кластер считался ответившим, если количество ПД в этом кластере удвоилось при увеличении температуры до 27°C, 37°C или при аппликации капсаицина. В результате анализа было показано: 22% кластеров не ответили ни на одно из воздействий; 16% кластеров отвечали на увеличение температуры до 27°C; 5% только на увеличение температуры до 37°C; 10% кластеров ответило только на аппликацию капсаицина; 32% кластеров ответило и на увеличение температуры до 27°C и на последующее увеличение температуры до 37°C. Таким образом, наличие кластеров с различным профилем активности предполагает, что нервные волокна тригеминального нерва могут отвечать на температурные воздействия в различных диапазонах и, следовательно, могут содержать разные типы термосенсоров.

Предположив, что в нервных волокнах Аδ- и С-типа (с соответствующими амплитудно-временными параметрами ПД) присутствуют различные типы термосенсоров либо их сочетания, мы провели расчет средней амплитуды ПД по группам кластеров, ответивших на изменение температуры и капсаицин. Оказалось, что существует достоверное отличие между некоторыми группами. Например, средняя амплитуда ПД не ответивших кластеров составила 8.7 ± 0.76 отн. ед. ($n=22$) и была достоверно ниже ($p<0.05$) средней амплитуды кластеров, ответивших на повышение температуры до 37°C и была равна 12.9 ± 1.6 отн.ед. ($n=5$). В то же время средняя амплитуда ПД для самой многочисленной группы кластеров ($n=41$), ответивших на увеличение температуры до 27°C и до 37°C, составила 10.8 ± 2.05 отн.ед. и была достоверно ниже средней амплитуды групп кластеров, ответивших на увеличение температуры до 27°C (11.5 ± 1.18 отн.ед., $n=21$, $p<0.005$), 37°C (12.9 ± 1.6 отн.ед., $n=5$, $p<0.001$), и аппликацию капсаицина (11.8 ± 1.46 отн.ед., $n=13$, $p<0.05$).

Таким образом, можно сделать следующие выводы: 1) при увеличении температуры происходит увеличение количества ПД; 2) волокна, входящие в состав тригеминального нерва, могут содержать характерное для каждого типа нервных волокон сочетание TRP каналов, определяющее их реакцию на различную температуру; 3) различное сочетание TRP каналов может указывать на принадлежность нервных волокон к Аδ или С-типу.

Мы предполагаем, что активация термосенсоров, действуя совместно с химическими агентами, играет большую роль в возникновении патологической активности в нервных волокнах менингеальной оболочки, что может приводить к возникновению болевого синдрома в патогенезе мигрени.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030)».

Оценка локомоторной активности вызванной чрескожной электрической стимуляцией спинного мозга у пациентов со спинальной травмой

Милицкова А.Д.^{1*}, Мухаметова Э.Р.¹, Яковлева Е.И.¹, Андрианов В.В.¹, Лавров И.А.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, НИЛ Нейромодуляция;
mamashotmilktea@gmail.com

Широкая распространенность патологий ЦНС, вызванная травмами и заболеваниями спинного мозга, требует разработки новых подходов в реабилитации двигательных функций. Метод электрической стимуляции спинного мозга является одним из наиболее многообещающих в экспериментальной и медицинской практике, позволяющий изучать функции различных систем организма. Одним из достижений последних лет стало выявление в спинном мозге определенных областей, электрическая стимуляция которых приводит к вызову и управлению ритмическими движениями в нижних конечностях. На сегодняшний день существует два основных метода стимуляции спинного мозга для управления локомоцией – инвазивная стимуляция с помощью электродов, расположенных на дорсальной поверхности мозга (эпидуральная стимуляция) и неинвазивная стимуляция, при которой установка электродов производится на поверхности кожи (чрескожная электрическая стимуляция спинного мозга (ЧЭССМ)). Представляет интерес оценка эффективности методики электростимуляции для вызова шагоподобных движений при различной степени поражения спинного мозга.

Целью данного исследования являлась оценка эффектов чрескожной электрической стимуляции спинного мозга на изменение параметров двигательной активности у пациентов с травмой спинного мозга (ТСМ).

В исследовании принимали участие 15 субъектов (3 женщины и 12 мужчин) с ТСМ на уровне С4-С5 и Th3-L2 позвонков, с травмой оцененной по шкале AIS (American Spinal Cord Injury Association Impairment Scale), как А, В и С. Оценка локомоторной активности у субъектов с ТСМ осуществлялась в системе разгрузки веса тела (Redcord, Норвегия) в положении лежа на боку. ЧЭССМ проводилась с помощью двух гелевых накожных электродов (24 мм), на уровне Th11-Th12 и Th12-L1 позвонков. Частота стимуляции составляла 35 Гц, интенсивность стимула варьировала в диапазоне от 20 до 115 мА. Для регистрации кинематических характеристик движений ног использовали систему захвата движения Vicon (Nexus, Великобритания). Объем движений в суставах вычисляли по положению светоотражающих датчиков, расположенных на анатомических ориентирах туловища и нижних конечностей по осям движения в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах. Оценка локомоторной активности осуществлялась при попытке субъектов выполнить шагательные движения как без стимуляции, так и во время ЧЭССМ.

Оценка локомоторной активности, вызванная ЧЭССМ показала, что объем движения в суставах имеет зависимость от степени и уровня поражения спинного мозга. Так, при неполном характере ТСМ значительно легче инициировалась локомоторная активность в нижних конечностях. В группе субъектов с ТСМ на уровне С4-5 позвонков наблюдалось достоверное увеличение угловых перемещений в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах ($p \leq 0.05$). В группе субъектов с ТСМ на уровне Th3-Th9 позвонков достоверное увеличение значений угловых перемещений наблюдалось в коленном и голеностопном суставах ($p \leq 0.05$). Аналогичная стимуляция в группе субъектов с ТСМ на уровне Th10-L2 позвонков приводила к достоверному увеличению значений угловых перемещений только голеностопном суставе ($p \leq 0.05$).

Таким образом, наблюдаемые эффекты ЧЭССМ могут позволить повысить эффективность реабилитационных мероприятий и открыть хорошие перспективы использования неинвазивной чрескожной стимуляции в рутинной клинической практике для различных групп пациентов со спинальной патологией.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Оценка модуля упругости лимфатических узлов с помощью компрессионной оптической когерентной эластографии

Губарькова Е.В.¹, Воронцов Д.А.², Храмушина И.А.³, Бедерина Е.Л.¹, Советский А.А.⁴, Плеханов А.А.^{1*}, Зайцев В.Ю.⁴, Сироткина М.А.¹, Гамаюнов С.В.², Воронцов А.Ю.², Криворотько П.В.⁵, Гладкова Н.Д.¹

¹ФГБОУ ВО "Приволжский исследовательский медицинский университет" Минздрава России;

²Нижегородский областной клинический онкологический диспансер;

³Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского;

⁴Институт прикладной физики РАН;

⁵ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России;

strike_gor@mail.ru

Оценка состояния лимфатических узлов (ЛУ) является важным фактором для определения стадии заболевания и выбора оптимальной тактики лечения при раке молочной железы (РМЖ). При традиционной диссекции ЛУ часто обнаруживается, что лишь небольшая часть ЛУ являются метастатическими, и этот факт необходимо сопоставлять с потенциальными осложнениями диссекции, такими как лимфедема. Золотым стандартом оценки состояния ЛУ остается послеоперационный гистопатологический анализ, который может быть реализован только при условии извлечения ЛУ, и не достижим при интраоперационной диагностике без лимфаденэктомии. В качестве методов интраоперационной маркировки сигнальных ЛУ применяют радиоизотопный метод и ряд новых технологий, таких как флуоресцентная лимфография, ультразвуковое исследование с контрастным усилением и др. [1]. Ограничениями этих методов являются введение экзогенных агентов и вероятность ложноотрицательных результатов. Поэтому актуальной задачей является развитие и применение новых интраоперационных, высокоразрешающих и высокочувствительных методов, способных обнаруживать и оценить состояние ЛУ, удаление которых будет достоверно определять степень распространения опухолевого процесса в регионарных лимфатических коллекторах без лимфаденэктомии. Таким методом может стать оптическая когерентная томография (ОКТ) с ее новой эластографической модальностью – ОКТ-эластографией (ОКЭ), демонстрирующей высокий контраст морфологических структур ЛУ и способной количественно оценивать их упругие свойства, которые значительно изменяются при метастатическом поражении ЛУ. Ранее в наших исследованиях был показан потенциал применения ОКЭ с оценкой модуля упругости для дифференциальной диагностики подтипов РМЖ и обнаружения границ резекции РМЖ [2]. Целью данного исследования является определение значений жесткости различных морфологических структурных компонентов неизмененных ЛУ и ЛУ с метастатическим поражением при РМЖ с помощью метода компрессионной ОКЭ.

Исследование методом ОКЭ было проведено на 19 послеоперационных образцах ЛУ от 17 пациентов с диагнозом РМЖ (в возрасте от 42 до 72 лет) после подмышечной лимфаденэктомии. Все образцы были разделены на три группы согласно результатам патоморфологического исследования: нормальные (n=5), ЛУ с реактивными воспалительными изменениями (n=8) и метастатические (n=6) ЛУ. В исследовании использовалась установка скоростной спектральной мультимодальной ОКТ (ИПФ РАН, Россия) с центральной длиной волны 1310 нм, мощностью излучения 20 мВт, поперечным пространственным разрешением ~ 20 мкм, разрешением по глубине ~ 15 мкм, глубиной сканирования ~ 1,7 мм и скоростью сканирования 20 000 А-сканов/сек. Система обеспечивает выполнение фазочувствительной компрессионной ОКЭ для визуализации упругих свойств ткани. В основе данного метода для картирования деформации ткани лежит векторный подход к оценке межкадровой вариации градиента фазы ОКТ-сигнала [3]. Использование калибровочного силиконового слоя с известной жесткостью на поверхности исследуемой ткани позволяет вычислять абсолютные значения жесткости ткани – модуль упругости Юнга в кПа. Двухмерные ОКЭ изображения получаются в режиме реального времени с пространственным разрешением 40-50 мкм и размером изображения (В-сканов) 4,0 × 1,25 мм. Для построения и анализа ОКЭ изображений выбирается стандартизированный уровень давления на ткань, позволяющий не только качественно сравнивать, но и количественно оценивать жесткость в различных морфологических структурах и при различных условиях.

В результате исследования были установлены характерные диапазоны значений жесткости для различных морфологических структурных компонентов неизмененных ЛУ и ЛУ с метастатическим поражением. В случае нормальных ЛУ на ОКЭ изображении жировая ткань характеризуется самыми низкими значениями жесткости (50-150 кПа), фиброзная капсула и трабекулы между фолликулами идентифицируются по высоким значениям жесткости (400-800 кПа), в коре фолликулы представлены в виде областей овальной формы со средними значениями жесткости (150-400 кПа). Кроме того, ОКЭ позволяет дифференцировать ЛУ с реактивными изменениями, которые характеризуются разрастанием лимфатической ткани и нарушением нормальной структуры ЛУ. На ОКЭ изображениях реактивные ЛУ визуализируются как однородные области со средними значениями жесткости (200-400 кПа). При этом на ОКЭ изображениях четкая граница между капсулой,

трабекулами и корой теряется. В случае метастатического поражения ЛУ, подтвержденных патоморфологическим исследованием, на ОКЭ изображениях нарушается нормальная структура коры ЛУ, идентификация капсулы и фолликулов невозможна, отмечается преобладание областей с самыми высокими значениями жесткости (более 800 кПа), морфологически соответствующие скоплениям опухолевых клеток.

Компрессионная ОКЭ позволяет на основе оценки значений жесткости не только определять статус ЛУ, но и статистически достоверно дифференцировать основные микроструктурные компоненты ЛУ, такие как соединительнотканная капсула, кора с фолликулами, трабекулы, жировая ткань и области скопления опухолевых клеток. Компрессионная ОКЭ представляет собой новый высокоэффективный метод для интраоперационной оценки состояния ЛУ *in situ*. Требуется проведение дальнейших исследований для разработки алгоритма введения данной методики в клиническую практику.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №18-75-10068.

1. Ahmed M. et al. Novel techniques for sentinel lymph node biopsy in breast cancer: a systematic review // *Lancet Oncol.* 2014. Vol. 15. P. e351-62.

2. Gubarkova E.V. et al. OCT-elastography-based optical biopsy for breast cancer delineation and express assessment of morphological/molecular subtypes//*Biomed Opt Express.* 2019. Vol. 10. P. 2244-2263.

3. Zaitsev V.Y. et al. Strain and elasticity imaging in compression optical coherence elastography: The two-decade perspective and recent advances // *J Biophotonics.* 2021. Vol. 14. P. e202000257.

Оценка связанности в кортико-гиппокампальной сети мозга у крыс-моделей эпилепсии

Грищенко А.А.^{1,2*}, Сулейманова Е.М.³, Виноградова Л.В.³, Сысоев И.В.^{1,2}

¹*Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А.Котельникова РАН;*

²*Саратовский Государственный Университет им.Н.Г.Чернышевского;*

³*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН;*

vili_von@mail.ru

Височная эпилепсия (лимбическая) – наиболее тяжелая и фармакорезистентная форма эпилепсии. В ходе вторичной генерализации эта локальная эпилептическая активность может распространяться по синаптическим связям широко за пределы лимбических структур[1]. У экспериментальных животных спонтанные лимбические судороги развиваются после эпилептического статуса, вызываемого фармакологической [2] или электрической стимуляцией [3]. Ранее было обнаружено, что лимбические судороги также могут развиваться у неэпилептических крыс в ответ на введение антагониста эндоканнабиноидных СВ1 рецепторов [4]. Между приступами у животных-моделей возникают интериктальные спайки, видимые на электроэнцефалограмме [5]. Ранее нами была изучена связанность в коре головного мозга крыс-моделей во время пик-волновых разрядов[6, 7], а интериктальная динамика не изучалась.

Целью данной работы является сравнение интериктальной активности с разрядами, а так же поиск связанности во время такой активности. В данной работе анализировались 2х часовые записи ЭЭГ от 11 мышей, ЭЭГ записывалось с левого и правого полушарий головного мозга. Затем для поиска связанности мы использовали метод причинности по Грейнджеру [8]. Идея метода причинности по Грейнджеру состоит в построении предсказательных моделей. При проверке возможного воздействия системы Y на систему X сначала строится эмпирическая прогностическая модель для системы X по данным из её собственного временного ряда, а затем — с привлечением временного ряда системы Y. Если учёт данных из ряда системы Y позволяет значительно уменьшить ошибку прогноза будущего системы X, делается вывод о влиянии Y на X. На основе анализа связанности можно сделать выводы, что во время интериктальной активности присутствует связанность в мозге, активнее всего вовлекается левый гиппокамп.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 19-72-10030-П, <https://rscf.ru/project/19-72-10030>

Список литературы:

1. Bertram E.H. The functional anatomy of spontaneous seizures in a rat model of chronic limbic epilepsy. *Epilepsia*, 1997, 38: 95–105.

2. Cavalheiro E.A. The pilocarpine model of epilepsy. *The Italian Journal of Neurological Sciences*, 1995. 16 (1–2): 33–37.

3. Curia G., Longo D., Biagini G., Jones R.S.G., Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods*, 2008. 172: 143–157.

4. van Rijn C.M., Perescis M.F.J., Vinogradova L., van Luijtelaaar G. The endocannabinoid system protects against cryptogenic seizures. *Pharmacological Reports*, 2011. 63: 165–168.

5. Tao J.X., Ray A., Hawes-Ebersole S., Ebersole J.S. Intracranial EEG Substrates of Scalp EEG Interictal Spikes. *Epilepsia* 2005; 46 (5): 669—676.
6. Grishchenko AA, Sysoeva MV, Medvedeva TM, van Rijn CM, Bezruchko BP, and Sysoev IV. Connectivity detection in application to spike-wave discharge study. *Cybernetics and Physics*, 9(2):86–97, 2020.
7. Сысоева М. В., Виноградова Л. В., Перескис М. , К. М. ван Рейн, И. В. Сысоев. Выявление изменений направленных межструктурных связей при лимбических судорогах, вызванных введением антагониста эндоканнабиноидных рецепторов, методом нелинейной причинности по Грейнджеру. *Журнал высшей нервной деятельности*, 2019, том 69, № 6, с. 752–767
8. Sysoeva M.V., Sitnikova E., Sysoev I.V., Bezruchko B.P., van Luijtelaaar G. Application of adaptive nonlinear Granger causality: Disclosing network changes before and after absence seizure onset in a genetic rat model. *Journal of Neuroscience Methods*, 2014. 226: 33–41.
9. Granger C.W.J. Investigating Causal Relations by Econometric Models and Cross-Spectral Methods. *Econometrica*, 1969. 37 (3): 424–438.

Оценка созревания профессиональных антигенпрезентирующих клеток после сокультивации с фотоиндуцированными тетра(арил)тетрацианпорфиразином клетками мышинной глиомы

Редькин Т.С.^{3*}, Савюк М.О.^{3,1}, Слепцова Е.Е.³, Турубанова В.Д.³, Ведунова М.В.³, Крысько Д.В.^{3,1,2}
¹*Лаборатория исследования и терапии гибели клеток (CDIT), факультет анатомии и реабилитации человека, Гентский университет, Гент, Бельгия;*
²*Институт исследований рака Гента, Гент, Бельгия;*
³*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского;*
big.t.nsdav@outlook.com

В предыдущих исследованиях был продемонстрирован иммуногенный потенциал умирающих/мертвых клеток глиомы GL261, которые были подвергнуты фотодинамической терапии (ФДТ) на основе рз II. Фотоактивированные клетки активно испускают молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMPs), такие как АТФ, НМGB1, и экспонируют кальретикулин (CRT) на внешней клеточной мембране, что является сигналом к активации профессиональных антигенпрезентирующих клеток - дендритных клеток.

Целью стала оценка созревания дендритных клеток *in vitro* при сокультивировании с ФДТ-активированными клетками глиомы.

Для подтверждения созревания дендритных клеток была проведена оценка уровня экспозиции клеточного рецептора CD86 на поверхности дендритных клеток. Клетки глиомы GL261 подвергались ФДТ на базе рз II. После мертвые/умирающие клетки сокультивировались вместе с наивными дендритными клетками, изолированными из костного мозга мыши линии C75/B17, в течение 24 часов. Созревание дендритных клеток оценивалось при помощи красителя anti-CD86-eFluor 450 (eBioscience), который связывается с CD86 на поверхности дендритных клеток (CD11c+), методом проточной цитометрии.

Было показано, что клеточный рецептор CD86 активно экспонируется на поверхности дендритных клеток, которые распознали мертвые/умирающие клетки глиомы GL261, что говорит об их созревании. Однако, для полноценного вывода об активной антигенпрезентации необходимо рассмотреть фагоцитарную активность дендритных клеток и проанализировать активность высвобождения основных сигнальных молекул IL-12p70 и IL-6 активированными дендритными клетками.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00716, <https://rscf.ru/project/22-25-00716/>

Пациент-специфические 3D модели глиомы с иммунным микроокружением для исследования эффективности иммунотерапии методом FLIM

Южакова Д.В.^{1*}, Сачкова Д.А.^{2,1}, Изосимова А.В.^{1,2}, Яшин К.С.¹, Можеров А.М.¹, Юсубалиева Г.М.³,
Кулемзин С.В.⁴, Ширманова М.В.¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия;

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского; Нижний Новгород, Россия;

³Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, Москва, Россия;

⁴Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия;
yuzhakova-diana@mail.ru

Основной проблемой в области иммунотерапии глиомы являются недостаточные знания об индивидуальных особенностях иммунных механизмов для каждого конкретного пациента. Для успешного применения иммунотерапевтических подходов, таких как чек-пойнт ингибиторы и CAR-терапия, в отношении глиальных опухолей требуется внедрение персонализированного подхода.

Исследования проводили с использованием материала от пациентов с диагнозом астроцитомы Grade II-IV, прооперированных в Университетской клинике ПИМУ.

Разработана новая пациент-специфическая 3D модель глиомы с иммунным микроокружением. Для этой цели создана библиотека первичных глиальных и лимфоцитарных культур пациентов, а также разработан оригинальный подход, включающий оптимизированные методики экстракции клеток, технологию культивирования трехмерной опухолевой структуры на основе культивируемого фрагмента ткани либо сфероидов, условия наращивания и схему сокультивирования клеток. Для анализа субпопуляционного состава и активационного профиля лимфоцитов использовали клеточный сортер BD FACSAria III. Для моделирования микроокружения, близкого к реальному, анализировали дополнительно субпопуляционный состав опухолеинфильтрирующих лимфоцитов.

Установлено, что иммунные клетки в присутствии опухолевых антигенов сохраняют жизнеспособность и активно пролиферируют.

Продемонстрировано, что данная модель способна отражать ответ иммунных и опухолевых клеток на различные виды чек-пойнт иммунотерапии. Как пример, добавление анти-CTLA4 терапевтического антитела к 3D модели конкретного пациента приводит к значительному увеличению числа иммунных клеток и снижению числа опухолевых по сравнению с контролем без лечения, а также к увеличению уровня экспрессии CD25 в пуле CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток по сравнению с контролем без лечения. Однако добавление анти-PD-1 антитела к модели данного пациента не привело к терапевтическому эффекту.

Второй блок экспериментов посвящен клеточной иммунотерапии с использованием новых модифицированных/таргетированных линейных NK клеток. Показана высокая цитотоксическая активность “усиленных” YT клеток с оверэкспрессией белка VAV1 и нокаутом гена CISH, а также линии с CAR-рецептором, специфичным к EGFRvIII. Помимо стандартных методов, ответ клеток на терапию оценивали с помощью метаболического имиджинга FLIM в канале кофермента НАД(Ф)Н (ex. 375 нм, em. 435 – 485 нм) на конфокальном микроскопе LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) с FLIM приставкой TCSPC (Becker & Hickl, Германия). Установлено значимое возрастание среднего времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н в глиальных клетках сфероидов при инкубировании с модифицированными иммунными клетками, что может быть ассоциировано со сдвигом метаболизма в сторону окислительного фосфорилирования и, соответственно, со снижением пролиферации глиальных клеток.

Работа поддержана Грантом Президента № МК-2092.2022.3 (3D модель глиобластомы с лимфоцитарным микроокружением, чек-пойнт иммунотерапия) и РФФ №22-64-00057 (клеточная терапия).

Повышенная агрегация эритроцитов и тромбоцитов и ее коррекция в образцах крови больных артериальной гипертензией

Луговцов А.Е.^{1*}, Ермолинский П.Б.¹, Семенов А.Н.¹, Приезжев А.В.¹
¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
anlug1@gmail.com

Агрегация эритроцитов и тромбоцитов является одним из ключевых факторов, определяющих кровоток и тем самым влияющих на реологию крови и микроциркуляцию. Изменение этих свойств приводит к изменению вязкости крови и, как следствие, к изменению кровотока в сосудах и капиллярах. Это может привести к значительному нарушению функции крови. Артериальная гипертензия (АГ) представляет собой заболевание, при котором артериальное давление в артериях постоянно повышено. АГ может приводить к тяжелым изменениям жизненно важных систем организма человека, в том числе сердечно-сосудистой системы, приводя к поражению сосудов и капилляров, нарушению гемореологических свойств крови.

Предполагается, что индуцированная фибриногеном агрегация эритроцитов (эритроцитов) вызвана неспецифическим связыванием молекул фибриногена с клеточными мембранами красных клеток крови, что приводит к образованию молекулярных мостиков между взаимодействующими клетками. Напротив, известно, что тромбоциты содержат мембранные гликопротеиновые комплексы класса IIb/IIIa, высоко специфичные к фибриногену. Этот факт может быть использован для коррекции агрегации тромбоцитов и, как мы полагаем, агрегации эритроцитов с помощью ингибиторов гликопротеинов.

Основной целью настоящей работы является оценка агрегационных свойств крови больных АГ и здоровых доноров, а также проверка гипотезы о снижении агрегации эритроцитов при использовании ингибиторов гликопротеиновых комплексов IIb/IIIa при АГ и повышенной агрегации эритроцитов.

В данной работе исследования агрегационных свойств крови больных АГ проводились методом лазерного диффузного светорассеяния *in vitro* на ансамблях клеток. Использовали методику лазерной агрегометрии [1], реализованную в лазерном агрегометре-деформометре Rheoscan AnD-300 (Республика Корея) [1]. Нами измерялись несколько параметров: гидродинамическая прочность агрегатов эритроцитов - критическое напряжение сдвига (CSS), характерное время образования агрегатов эритроцитов, индекс агрегации (доля эритроцитов, участвующих в агрегации в течение первых 10 секунд процесса спонтанной агрегации). Двухканальный оптический пинцет использовался для *in vitro* измерения скорости агрегации, а также сил взаимодействия клеток [2].

Было исследовано влияние широко используемых ингибиторов (РГДС, эпифибатид, тирофибан) на агрегацию эритроцитов с целью ее коррекции. Все измерения проводились с кровью, взятой у больных АГ (88 человек) и практически здоровых добровольцев - контроль (18 человек). Образцы крови стабилизировали ЭДТА для предотвращения свертывания крови. Измерения проводились в течение двух часов после забора крови.

Показано, что у больных АГ повышена способность эритроцитов и тромбоцитов к агрегации: скорость агрегации и силы взаимодействия клеток значительно увеличены по сравнению с контрольной группой.

Экспериментально подтверждена гипотеза о том, что агрегация клеток может быть скорректирована за счет уменьшения адсорбции фибриногена на мембране эритроцитов посредством ингибирования гликопротеиновых комплексов IIb/IIIa. Данное ингибирование уменьшает неспецифическое связывание молекул фибриногена с клеточными мембранами, что приводит к уменьшению молекулярных мостиков между взаимодействующими клетками.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 22-15-00120) в соответствии с программой развития Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова "Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина".

[1] S. Shin, Y. Yang, J.-S. Suh, "Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip stirring system by light transmission", Clin. Hemorheol. Microcirc., vol. 41, pp. 197-207, 2009.

[2] K. Lee, A.Priezzhev, S.Shin, F.Yaya, I.Meglinski, "Characterization of shear stress preventing red blood cells aggregation at the individual cell level : The temperature dependence", Clin. Hemorheol. Microcirc., vol. 64, pp. 853-857, 2016

Показатели оксидативного стресса у здоровых беременных женщин и беременных женщин с урогенитальной инфекцией на ранних сроках гестации

Жамбалова Б.А.^{1*}, Осипов А.Н.¹, Тесёлкин Ю.О.¹

¹РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России;

zhambalovaba@inbox.ru

Цель исследования. Изучение показателей оксидативного стресса у женщин на ранних сроках физиологической беременности, а также беременности, осложненной урогенитальной инфекцией.

Материалы и методы. Обследовано 90 женщин в возрасте 20-45 лет, которые были распределены на 3 группы: 1-я группа – здоровые небеременные женщины (n=30); 2-я группа - здоровые беременные женщины (n=30); 3-я группа - беременные женщины с урогенитальной инфекцией (n=30). Все беременные женщины находились в первом триместре гестации (8-10 неделя). Определение функциональной активности фагоцитов цельной крови проводили методом люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛХЛ). Хемилюминесцентный метод также использовали для измерения антиоксидантной активности плазмы крови (АОА). Содержание в ней одного из продуктов перекисного окисления липидов, малонового диальдегида (МДА), определяли спектрофотометрически.

Результаты исследования. Обнаружено, что у беременных женщин 2-й и 3-й групп интенсивность ЛХЛ цельной крови была выше, чем у женщин 1-й группы. Так, при стимуляции зимозаном средние значения этого показателя во 2-й и 3-й группах увеличивались соответственно в 2,8 и 8 раз, а при стимуляции опсонизированным зимозаном - в 2,4 и 4,6 раз по сравнению с 1-й группой (p<0,05). При сравнении интенсивности ЛХЛ цельной крови женщин 2-й и 3-й групп также были обнаружены достоверные различия. В частности, при стимуляции фагоцитов цельной крови пациенток 3-й группы зимозаном, интенсивность регистрируемого свечения превышала интенсивность свечения цельной крови женщин 2-й группы в 2,9 раз (p<0,05), а при стимуляции опсонизированным зимозаном - в 1,9 раз (p<0,05).

Наблюдаемые изменения интенсивности ЛХЛ цельной крови у женщин 2-й и 3-й групп по сравнению с 1-й группой могут быть обусловлены, как свойствами самих фагоцитирующих клеток, так и большим количеством их в крови. Чтобы исключить последнее, нами было выполнено сравнение интенсивностей ЛХЛ, нормированной на содержание фагоцитов в исследуемом объеме крови. Однако и в этом случае различия между интенсивностью нормированной ЛХЛ цельной крови у женщин указанных групп оставались достоверными. Важно отметить, что при стимуляции зимозаном или опсонизированным зимозаном интенсивность нормированной ЛХЛ фагоцитов цельной крови пациенток 3-й группы была соответственно в 3,5 и 2 раза выше, чем у женщин 1-й группы (p<0,05) и в 1,8 и 1,2 раз выше, чем у женщин 2-й группы (p<0,05).

Полученные результаты показывают, что уже в первом триместре физиологической беременности наблюдается достоверное повышение функциональной активности фагоцитов крови. Наличие урогенитальной инфекции (УГИ) у беременных женщин сопровождается еще большим повышением способности фагоцитов продуцировать активные формы кислорода (АФК).

Для оценки уровня оксидативного стресса у женщин обследованных групп определяли содержание МДА в плазме крови, а также ее АОА. Обнаружено, что содержание МДА в плазме крови у женщин 2-й и 3-й групп было соответственно в 1,3 и 1,5 раз выше по сравнению с его содержанием у женщин 1-й группы (p<0,05). Что касается АОА плазмы крови, то она была соответственно в 1,4 и 1,5 раз ниже (p<0,05). Повышение содержания МДА в плазме крови женщин 2-й и 3-й групп свидетельствует об активации в их организме процесса перекисного окисления липидов, тогда как уменьшение АОА плазмы крови - о снижении уровня его антиоксидантной защиты.

На основании полученных результатов для женщин каждой группы был рассчитан индекс оксидативного стресса, который представляет собой отношение МДА/АОА. В этом отношении числитель отражает интенсивность свободнорадикальных реакций, а знаменатель характеризует состояние антиоксидантной системы. Рассчитанный индекс оксидативного стресса у здоровых беременных женщин и беременных женщин с урогенитальной инфекцией превышает его значение у здоровых небеременных женщин соответственно в 1,8 и 2,2 раза (p<0,05). Это позволяет предположить, что у женщин 2-й и 3-й групп существует выраженный дисбаланс между продукцией прооксидантов и состоянием антиоксидантной защиты в сторону усиления продукции прооксидантов. При этом имеется тенденция в усилении свободнорадикальных реакций у женщин 3-й группы по сравнению со 2-й группой. Существенный вклад в общую продукцию АФК фагоцитами крови в первом триместре беременности, осложненной УГИ, может вносить активация TLR-зависимых сигнальных путей в результате экспрессии Toll-подобных рецепторов на цитоплазматической мембране клеток. В пользу данного предположения свидетельствует тот факт, что коэффициент корреляции между ЛХЛ фагоцитов цельной крови, стимулированных зимозаном, и содержанием МДА в плазме крови у женщин 3-й группы был равен +0,71 (p<0,05), тогда как у женщин 1-й и 2-й групп он был существенно ниже и составил соответственно +0,15 и +0,23 (p<0,05).

Заключение. Сравнение показателей оксидативного стресса у здоровых беременных женщин и беременных женщин с урогенитальной инфекцией с соответствующими показателями у здоровых небеременных женщин позволяет сделать вывод о развитии оксидативного стресса уже в первом триместре беременности. Наличие урогенитальной инфекции у беременных женщин способствует еще большему дисбалансу между продукцией прооксидантов и активностью антиоксидантной системы.

Ключевые слова: физиологическая беременность, урогенитальная инфекция, фагоциты крови, активные формы кислорода, оксидативный стресс, антиоксидантная активность плазмы крови, хемилюминесценция.

Применение метода корреляционных отношений для сравнения ЭЭГ здоровых испытуемых и пациентов нервно-психического профиля

Соболев М.Е.^{1*}, Горелик А.Л.², Власова О.Л.¹

¹*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого;*

²*Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии им. В.М. Бехтерева;
m.e.sobolev@mail.ru*

Электроэнцефалография (ЭЭГ) – широко применяющийся в научных исследованиях и в клинической практике неинвазивный метод исследования функционального состояния головного мозга. ЭЭГ позволяет наблюдать биоэлектрические процессы в динамике, а также увидеть отклик на различные раздражители. Одними из основных характеристик электроэнцефалограмм являются амплитуда и частота измеряемого биоэлектрического сигнала. В настоящее время развитие количественного анализа и обработки электроэнцефалограмм требует применения соответствующих математических подходов и методов, так как возможности визуального анализа ЭЭГ, по мнению многих специалистов, практически исчерпаны.

Одним из тех, кто высказал предположение о диагностической значимости искажения соотношений между количественными характеристиками ЭЭГ у пациентов с различными нервно-психическими заболеваниями, был А.Г. Нарышкин с коллегами [1]. Для развития этой идеи мы разработали физико-математическую модель, адекватно описывающую амплитудно-частотные характеристики электроэнцефалограмм человека [2]. Кроме того, другими авторами был предложен метод корреляционных отношений [3]. Данный метод основан на нелинейности связи между отведениями ЭЭГ, по сравнению с коэффициентами когерентности, использующими линейный подход. Метод корреляционных отношений позволяет установить не только факт взаимодействия между каналами, но и направленность связи.

Результаты. С помощью метода корреляционных отношений в нашей работе было проведено сравнение ЭЭГ в состоянии спокойного бодрствования с закрытыми глазами у здоровых испытуемых и у пациентов с депрессией и с параноидальной шизофренией. Были получены существенные отличия в пространственной организации ЭЭГ между группами испытуемых по диапазонам частот: дельта (0,5 – 4 Гц), тета (4 – 8 Гц), альфа (8 – 13 Гц) и бета (13 – 30 Гц). Полученные отличия в корреляционных отношениях между здоровыми пациентами и испытуемыми с депрессией и шизофренией были схожими в теменно-височных отведениях, однако было обнаружено достаточно отличий в других отведениях между здоровыми испытуемыми и испытуемыми с депрессией и шизофренией. Из этого следует, что, используя метод корреляционных отношений, можно определить отличия в межканальном взаимодействии, характерные для конкретного нервно-психического заболевания. Помимо этого, была установлена направленность связи между отведениями.

Заключение. С помощью метода корреляционных отношений было проведено сравнение в межканальном взаимодействии электроэнцефалограмм человека. Были обнаружены существенные отличия между здоровыми испытуемыми и пациентами нервно-психического профиля.

Список литературы:

1) Нарышкин А.Г., Скоромец Т.А., Горелик А.Л., Егоров А.Ю. Клинические и нейрофизиологические проявления межполушарной асимметрии при цервикальной дистонии // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2009. Т. 109. № 10. С. 51-56

2) Соболев М.Е., Горелик А.Л., Власова О.Л. Разработка и применение нового физико-математического метода анализа количественных электроэнцефалограмм // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2020. Т. 13. № 3. С. 119–129.

3) Ивановский Р.И., Новожилов М.А. Анализ межканальных связей электроэнцефалограмм на основе корреляционных отношений // Математическая биология и биоинформатика. 2016. Т. 11. № 2. С. 214-224.

Применение транскраниальной электротерапии импульсным током в комбинированном лечении деформирующего остеоартроза

Онищук В.В.¹, Каде А.Х.¹, Трофименко А.И.^{1,2,3*}

¹Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия;

²Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского, Краснодар, Россия;

³Кубанский государственный технологический университет, Краснодар, Россия;
artentrofimenko@mail.ru

Деформирующий остеоартроз (ДОА) – это хроническое заболевание преимущественно поражающее крупные суставы, его структурными характеристиками являются дегенерация хряща, ремоделирование субхондральной кости, образование остеофитов, изменения в синовиальной оболочке и суставной капсуле, что приводит к появлению ряда типичных клинических симптомов, таких как сильная боль в суставах, скованность и значительное снижение их подвижности, течение заболевания сопровождается снижением продуктивности и качества жизни пациентов.

Современная консервативная терапия ДОА включает медикаментозные – нестероидные противовоспалительные препараты, хондропротекторы и внутрисуставные инъекции препаратов гиалуроновой кислоты, глюкокортикоидов и синтетических вископротезов, а также немедикаментозные вмешательства – модификация образа жизни, снижение веса, физические упражнения, ортезы и физиотерапия.

Фармакотерапия зачастую обеспечивает лишь ограниченное облегчение боли и сопряжена с риском серьезных побочных эффектов, в связи с чем, актуальной является разработка консервативных немедикаментозных подходов к лечению заболевания.

Показано, что боль при ДОА связана с реорганизацией соматосенсорной и моторной коры, а также перестройкой ее нейропластичности. Вышеуказанные нарушения могут быть модифицированы посредством центральных эффектов транскраниальной электростимуляции.

За счет воздействия на структуры антиноцицептивной системы ствола головного мозга, особый интерес среди методик транскраниальной электростимуляции импульсным током представляет ТЭС-терапия.

ТЭС-терапия – метод неинвазивной электростимуляции биполярным импульсным током с частотой 77,5 Гц и плотностью протекания тока через структуры антиноцицептивной системы ствола головного мозга 0,01-0,05 мА / см².

Цель: изучить эффективность применения ТЭС-терапии в рамках консервативного лечения пациентов с ДОА крупных суставов.

Материалы и методы:

Критерии включения: мужчины и женщины в возрасте от 35 до 60 лет; клинически и рентгенологически верифицированный диагноз ДОА крупных суставов (коленных и тазобедренных) II и III ст. (согласно МКБ-10); подписание добровольного информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии исключения и невключения: декомпенсированная соматическая патология; эндокринная патология; онкопатология; аутоиммунная патология; наркозависимость и/или алкоголизм; хронические инфекционные заболевания – вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекция, туберкулез; другие заболевания и состояния – эпилепсия, прием иммуносупрессивной терапии, иммобилизация, внутрисуставное введение глюкокортикоидов, язвенная болезнь желудка и ДПК; наличие противопоказаний к проведению ТЭС-терапии; развитие острых инфекционных заболеваний в период проведения исследования; отказ от участия в исследовании на любом из этапов.

Характеристика групп пациентов: группа 1 (n = 30, контрольная) – «условно-здоровые» пациенты; группа 2 (n = 30, сравнения) – пациенты с ДОА крупных суставов, которым проводилось только стандартное лечение; группа 3 (n = 30, основная) – то же, проведение ТЭС-терапия совместно со стандартным лечением.

В контрольные точки исследования (до начала лечения; через 2 недели и 6 недель) проводились оценка интенсивности болевого синдрома с использованием визуальной аналоговой шкалы боли (ВАШ), а также определение в сыворотке крови β-эндорфина, МСР-1.

ТЭС-терапия проводилась с помощью двухпрограммного электростимулятора «ТРАНСАИР-03» (ООО «Центр транскраниальной электростимуляции», Россия). Использованы следующие параметры электростимуляции: импульсный биполярный режим, фронто-мастоидальное наложение электродов, сила тока 2 мА, частота тока 77,5 Гц, продолжительность сеанса 45 мин. Всего пациентам из основной группы, начиная с первого визита к врачу, проведено 10 процедур, с частотой 1 сеанс в сутки; далее 8 сеансов, по 2 процедуры в неделю.

Результаты: До начала в группах №2 и №3 с ДОА крупных суставов концентрация β-эндорфина на 63,4 и 65,3% ниже (p<0,05), при этом содержание МСР-1 на 93,0 и 85,2 % выше (p<0,05), чем у «условно-здоровых»

добровольцев. Статистически значимых отличий ($p > 0,05$) между группами №2 и №3 по баллам ВАШ не выявлено.

Спустя две недели от начала лечения концентрация β -эндорфина у пациентов группы №2 была на 51,5% и 73,5% ниже ($p < 0,05$), чем у «условно-здоровых» добровольцев и в группе №3. На этом фоне концентрация МСР-1 в группах №2 и №3 оставалась на 81,3 и 65,7 % выше ($p < 0,05$), чем у «условно-здоровых» добровольцев. У пациентов группы №2 интенсивность болевого синдрома была на 18,2 % выше ($p < 0,05$), чем в группе №3.

Спустя шесть недель от начала лечения у пациентов группы №2 концентрация β -эндорфина оставалась на 46,7% и 43,3% ниже ($p < 0,05$), чем у «условно-здоровых» добровольцев и в группе №3. На этом фоне в группе №3 концентрация МСР-1 статистически значимо ($p < 0,05$) ниже на 49,0 %, чем в группе №2 и выше на 43,6 % по отношению к группе №1. У пациентов группы №2 интенсивность болевого синдрома была на 50,0 % выше ($p < 0,05$), чем в группе №3.

При внутригрупповом анализе концентрации β -эндорфина в динамике по контрольным точкам исследования: в группе №2 выявлена тенденция к росту показателя на 19,7% ($p > 0,05$) и в группе №3 статистически значимый рост на 89,9% ($p < 0,05$). Анализ динамики концентрации МСР-1 показал: в группе №2 снижение показателя на 6,1 % ($p > 0,05$) и в группе №3 статистически значимое снижение на 37,3 % ($p < 0,05$). При анализе оценки ВАШ в группе №2 выявлено ее снижение на 26,5 % ($p < 0,05$), в группе №3 также наблюдали снижение интенсивности болевого синдрома на 56,5 % ($p < 0,05$).

Заключение: Показано, что для пациентов с ДОО крупных суставов характерна выраженная гипосенсория и стойкое повышение сывороточной концентрации МСР-1. На фоне применения ТЭС-терапии наблюдался статистически значимый рост концентрации β -эндорфина и снижение МСР-1, что сопровождалось выраженным регрессом интенсивности болевого синдрома.

Программно-аппаратный комплекс для прототипирования зрительных нейропротезов

Кравченко С.В.^{1*}, Сахнов С.Н.^{1,2}, Мясникова В.В.^{1,2}

¹Краснодарский филиал «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава России, Краснодар, Россия;

²Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия;
k.v.1991@yandex.ru

Слепота, возникающая вследствие различных причин – серьезная медико-социальная проблема, одним из вариантов решения которой является протезирование зрения. Зрительные протезы бывают разных типов и конструктивных исполнений, однако имеют общий принцип, заключающийся в преобразовании изображения, получаемого с видеокамеры в паттерн для многоканальной электростимуляции нейронных структур зрительного анализатора: сетчатки, зрительного нерва, зрительной коры и т.д. Визуальная сцена, воспринимаемая пользователем зрительного протеза, существенно отличается от таковой, обеспечиваемой работой естественного зрительного анализатора у здорового человека и представляет собой паттерн фосфенов обладающий низким пространственным разрешением и не способный передавать информацию о цвете и глубине изображения [1]. Прототипирование систем бионического зрения является важным этапом в их разработке, способным оптимизировать данный процесс.

Целью данной работы явилась разработка программно-аппаратного комплекса для прототипирования зрительных нейропротезов.

Разработанный программно-аппаратный комплекс состоит из видеокамеры, IBM PC-совместимой ЭВМ с операционной системой семейства GNU/Linux и цифрового блока формирования паттерна стимуляции, выполненного на основе микроконтроллера ATmega2560. В процессе работы устройства видеопоток с камеры обрабатывается на компьютере посредством разработанной ранее программы «Video-Simplificator U» (Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021660749 Российская Федерация) [2], и в виде серии массивов через последовательный порт передается в блок формирования паттерна стимуляции, программа которого (Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021680407 Российская Федерация) [3] выполняет конвертацию полученных данных в паттерны стимуляции. На выход блока формирования паттерна стимуляции может быть подключен многоканальный электростимулятор для стимуляции структур зрительного анализатора экспериментальных животных для экспериментов *in vivo* либо культур нейронов в моделях *in vitro*. Так же полученные паттерны могут визуализироваться при помощи массива светодиодов, что позволяет выполнять симуляцию фосфенной картины, необходимую для отработки различных алгоритмов предварительной обработки изображения в зрительных протезах.

1. Niketghad S, Pouratian N. Brain machine interfaces for vision restoration: the current state of cortical visual prosthetics. *Neurotherapeutics*. 2019;16(1): 134-143. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0660-1>

2. Кравченко С.В., Мясникова В.В., Сахнов С.Н. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021660749 Российская Федерация. Video-Simplificator U: № 2021619832: заявл. 21.06.2021; опубл. 01.07.2021. EDN DRJXXB.

3. Кравченко С.В., Мясникова В.В., Сахнов С.Н. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021680407 Российская Федерация. Программа управления блоком формирования паттерна стимуляции прототипа зрительного нейропротеза: № 2021669491: заявл. 30.11.2021; опубл. 09.12.2021. EDN ZPVVIR.

Продукция активных форм кислорода лейкоцитами, стимулированными зимозаном и липополисахаридом у женщин с невынашиванием беременности на ранних сроках гестации

Жамбалова Б.А.^{1*}, Осипов А.Н.¹, Тесёлкин Ю.О.¹

¹*РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России;*
zhambalovaba@inbox.ru

Цель исследования. Исследование продукции активных форм кислорода полиморфно-ядерными лейкоцитами периферической крови, стимулированными зимозаном и липополисахаридом, распознающимися Toll-подобными рецепторами, у женщин с невынашиванием беременности инфекционного генеза на ранних сроках гестации по сравнению со здоровыми беременными женщинами.

Материалы и методы. Обследовано 75 женщин в возрасте 18-42 лет, которые были распределены на 3 группы: 1-я группа – здоровые небеременные женщины (n=25); 2-я группа - здоровые беременные женщины (n=25); 3-я группа - женщины с невынашиванием беременности инфекционного генеза (n=25). Все беременные женщины находились в первом триместре гестации (5-12 неделя). Определение функциональной активности полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПЯЛ) периферической крови проводили методом люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛХЛ).

Результаты исследования. На первом этапе исследования для выявления максимально действующей концентрации зимозана и липополисахарида (ЛПС) нами с использованием крови здоровых небеременных женщин была изучена зависимость интенсивности ЛХЛ ПЯЛ периферической крови от концентрации добавляемого лиганда при постоянном количестве клеток. Обнаружено дозозависимое изменение интенсивности ЛХЛ ПЯЛ. Максимальное значение интенсивности наблюдалось при концентрации зимозана, равной 100 мкг/мл, а ЛПС – 200 мкг/мл. Для выявления достоверных различий в ответах клеток исследуемых групп пациенток на основании полученных результатов были выбраны следующие концентрации зимозана и ЛПС: 5, 50 и 100 мкг/мл. Далее у здоровых беременных женщин и женщин с невынашиванием беременности инфекционного генеза было изучено влияние этих лигандов на интенсивность ЛХЛ ПЯЛ периферической крови. Обнаружено, что интенсивность ЛХЛ ПЯЛ возрастает в обеих группах пациенток с увеличением концентрации зимозана от 5 до 100 мкг/мл. При этом у женщин с невынашиванием беременности инфекционного генеза интенсивность ЛХЛ клеток при их стимуляции зимозаном в концентрации 100 мкг/мл в 1,5 раз ($p < 0,05$) больше по сравнению со здоровыми беременными женщинами. В случае стимуляции клеток ЛПС с увеличением концентрации лиганда в исследуемых группах пациенток наблюдается выраженное различие в ответах клеток. Возрастание интенсивности ЛХЛ ПЯЛ с увеличением концентрации ЛПС от 5 до 100 мкг/мл наблюдается только у женщин с физиологической беременностью. У женщин с невынашиванием беременности инфекционного генеза интенсивность ЛХЛ ПЯЛ возрастает лишь при концентрациях от 5 до 50 мкг/мл, а дальнейшее увеличение концентрации ЛПС до 100 мкг/мл приводит к снижению интенсивности ЛХЛ ПЯЛ. При этом интенсивность ЛХЛ клеток, стимулированных ЛПС в концентрации 100 мкг/мл у женщин с невынашиванием беременности инфекционного генеза в 3,1 раз меньше ($p < 0,05$), чем у женщин с физиологической беременностью. Можно предположить, что одной из причин уменьшения продукции активных форм кислорода полиморфно-ядерными лейкоцитами, стимулированных большими концентрациями ЛПС, у женщин с невынашиванием беременности инфекционного генеза по сравнению с женщинами с физиологической беременностью является снижение экспрессии TLR4 (Toll-подобных рецепторов) на мембране этих клеток. При хронической инфекции постоянная стимуляция рецептора инфекционными агентами, возможно, вызывает угнетение TLR4, снижает экспрессию этого рецептора и уже на следующий стимул этими же лигандами наблюдается лишь угнетение клеточного ответа, уменьшается продукция активных форм кислорода. В результате происходит снижение бактерицидной активности полиморфно-ядерных лейкоцитов у женщин с невынашиванием беременности инфекционного генеза, что может являться одним из механизмов развития невынашивания беременности.

При проведении сравнительного анализа влияния лигандов TLR2 (зимозана) и TLR4 (ЛПС) на продукцию активных форм кислорода наблюдаются следующие различия: максимальное значение интенсивности ЛХЛ ПЯЛ у женщин с физиологической беременностью при стимуляции их свечения зимозаном в концентрации 100

мкг/мл в 2,2 раза выше ($p < 0,05$), по сравнению со стимуляцией клеток ЛПС. У женщин с невынашиванием беременности инфекционного генеза это различие существенно: интенсивность ЛХЛ ПЯЛ, стимулированных зимозаном в концентрации 100 мкг/мл в 10,7 раз выше ($p < 0,05$), по сравнению со стимуляцией клеток ЛПС такой же концентрации. Нельзя исключить, что заметный вклад в общую продукцию активных форм кислорода фагоцитами крови у женщин с невынашиванием беременности инфекционного генеза может вносить TLR2-опосредованная продукция активных форм кислорода.

Заключение. У женщин с невынашиванием беременности инфекционного генеза и у здоровых беременных женщин на фоне развития оксидативного стресса в первом триместре гестации продукция активных форм кислорода полиморфно-ядерными лейкоцитами периферической крови, стимулированными зимозаном или липополисахаридом, распознающимися Toll-подобными рецепторами, может зависеть от экспрессии этих рецепторов на мембране клеток.

Ключевые слова: полиморфно-ядерные лейкоциты, зимозан, липополисахарид, хемилюминесценция, Toll-подобные рецепторы

Пространственно-временная карта экспрессии серотониновых рецепторов 5-HT_{4R} в мозге мыши на разных стадиях онтогенеза

Митрошина Е.В.^{1*}, Перенков А.Д.¹, Ведунова М.В.¹

¹ННГУ;

helenmitroshina@gmail.com

Депрессия является одной из важнейших проблем здравоохранения как в России, так и во всем мире. Серотониновая система модулирует реакцию на острый стресс и участвует как в этиологии депрессивных и тревожных расстройств, так и в ответе на их лечение. Существует гипотеза о роли нескольких типов серотониновых рецепторов, в частности 5-HT_{1A} и 5-HT₂, в реализации эффектов, вызываемых серотонином. Эти данные согласуются со сведениями об участии серотониновых рецепторов в определенных аспектах развития нейронов, таких как рост нейритов, регуляция соматической морфологии, подвижности аксонального конуса роста и формы дендритных шипиков, помимо классической роли серотонина в качестве нейротрансмиттера. Менее изучена роль других типов серотониновых рецепторов в развитии депрессивных расстройств, в частности рецепторов 5-HT_{4R}. В последнее время большое внимание уделяется положительному воздействию активации 5-HT_{4R} на обучение и память, поскольку дефицит когнитивных функций часто связан с беспокойством, депрессией, а также с развитием нейродегенеративных заболеваний, такими как болезнь Альцгеймера.

Нами была создана пространственно-временная карта экспрессии 5-HT_{4R} рецепторов в тканях головного мозга мышей линии C57BL/6. С помощью ПЦР в реальном времени был оценен уровень экспрессии 5-HT_{4R} в коре больших полушарий, мозжечке и гиппокампе мышей в возрасте P1, P5, P15, P30, 4-12 месяцев, 18 месяцев и 22-24 месяца. Показано, что уровень экспрессии 5-HT_{4R} в коре больших полушарий возрастает начиная с P5 до 1 года, после чего начинает необратимо снижаться. Аналогичная динамика экспрессии серотониновых рецепторов 4 типа наблюдается в мозжечке. В гиппокампе необратимое снижение экспрессии 5-HT_{4R} происходит начиная с 6 месяцев.

Сравнение уровня экспрессии 5-HT_{4R} в различных отделах мозга показало, что для периода новорожденности (P5) наиболее высокий уровень экспрессии 5-HT_{4R} выявлен в мозжечке (в 3,1 раза выше, чем в коре больших полушарий). В период фертильности (с P15 и до 6 месяцев) наибольший уровень экспрессии 5-HT_{4R} регистрируется в гиппокампе. В возрасте 12 месяцев 5-HT_{4R} экспрессируются во всех исследованных отделах мозга на одинаковом уровне. У пожилых животных от 18 месяцев и старше экспрессия 5-HT_{4R} в мозжечке значительно снижается по сравнению с корой и гиппокампом.

Работа выполнена в рамках проекта РФФ 22-15-00178.

Пространственно-временные паттерны кальциевой активности астроцитов: эксперимент и моделирование

Браже А.Р.^{1,2*}, Федотова А.А.^{1,2}, Верисокин А.Ю.³, Вервейко Д.В.³, Постнов Д.Э.⁴, Семьянов А.В.²

¹МГУ, биологический факультет;

²ИБХ РАН, отдел молекулярной нейробиологии;

³НИЦ физики конденсированного состояния, Курский государственный университет;

⁴кафедра оптики и биофотоники, Саратовский государственный университет;

brazhe@biophys.msu.ru

В настоящее время активно развивается область исследования роли астроцитов, самого распространенного типа глиальных клеток мозга, в когнитивных процессах различного масштаба: от обработки сенсорной информации до формирования памяти, паттернов поведения, регуляции циркадных ритмов и т.д. Количество все возрастающего объема новых экспериментальных данных кальциевого имиджинга астроцитов, однако, еще не перешло в качество понимания основных закономерностей их функционирования. Для совершения этого качественного скачка к описанию и пониманию роли кальциевой сигнализации астроцитов в регуляции работы мозга требуются новые подходы к обработке и анализу экспериментальных данных и теоретическим моделям такой сигнализации. Экспериментальные данные указывают на важность кальциевой сигнализации астроцитов для работы ЦНС, при этом следует различать спонтанную активность астроцитов и ассоциированную с выделением нейромодуляторов, таких как норадреналин.

В данной работе мы представляем синтез между экспериментальными данными и моделированием процессов кальциевой активности в астроцитах. Обработка и анализ экспериментальных данных базируются на разрабатываемых нами подходах для подавления шума и реконструкции отдельных эпизодов активности, где используется понижение размерности данных, факторизация сигнала на пространственные и временные компоненты и частичная реконструкция после отбрасывания незначущих элементов. Наблюдаемые эпизоды спонтанной кальциевой активности можно интерпретировать как стохастический процесс, однако открытым остается вопрос о наличии или отсутствии определенных закономерностей или повторяющихся паттернов активации на уровне отдельных клеток или астроцитарного синцития. В работе рассматриваются подходы к поиску таких закономерностей с использованием упрощенных динамических моделей, основанных на данных. Для дальнейшего понимания механизмов, вовлеченных в инициацию и распространение событий кальциевой сигнализации необходимо создание нелинейных математических моделей, описывающих предполагаемые биофизические механизмы кальциевой динамики в астроцитах. Мы рассматриваем такие распределенные модели, реализованные на реалистичных пространственных паттернах, а также закономерности кальциевой динамики в этих моделях, определяемые локальной морфологией астроцита.

Данные кальциевого имиджинга астроцитов на фоне спонтанной локомоции животного на подвижной платформе указывают на устойчивую активацию астроцитов при инициации движения. Выявлен характерный паттерн активации отдельных астроцитарных доменов, при котором ответ иницируется на периферии домена и распространяется центростремительно, постепенно достигая тела клетки и активируя ее. Отдельные астроциты в разных участках поля зрения могут активироваться неодновременно, но в пределах каждого пространственного домена данный паттерн воспроизводится. При этом продолжающиеся кальциевые ответы в some характеризуются кальциевыми колебаниями, что согласуется с представлением о IP3-зависимом механизме как кальциевом осцилляторе. Основные характеристики паттернов кальциевых ответов воспроизведены на генеративных моделях, диктуемых данными (DMDC). Реализованы компьютерные симуляции математической модели кальциевой динамики на реалистичных пространственных шаблонах.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 22-14-00033

Противовоспалительное действие полисахарида из *Helianthus tuberosus* L

Генералов Е.А.^{1,2*}, Пятигорская Н.В.²

¹МГУ, физический факультет;

²ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);

generals1179@gmail.com

Природные полисахариды обладают высокой биологической активностью, в купе с отсутствием токсичности, аллергенности и пирогенности. За счет этого углеводы являются весьма важным объектом исследований с практической точки зрения. Полисахарид из *Helianthus tuberosus* L. обладает более ярко

выраженным противовоспалительным действием, чем Глицирам, в моделях отека при субплантарном введении формалина и модели «карманной гранулемы».

Введение

Природные полисахариды обладают высокой биологической активностью, в купе с отсутствием токсичности, аллергенности и пирогенности. За счет этого углеводы являются весьма важным объектом исследований с практической точки зрения. Полисахариды, выделенные из растений, во многих случаях проявляют иммуномодулирующие свойства, стимулируют фагоцитоз, увеличивают число иммуноглобулинов в крови и активируют гуморальный иммунитет.

Воспаление - защитно-приспособительный процесс организма. Тем не менее, существуют патологические процессы, при которых воспаление играет важную роль в дизадаптации организма – аутоиммунные и аутовоспалительные процессы. Например, цитокиновый шторм при коронавирусной инфекции COVID-19, ревматоидный артрит, системная красная волчанка и другие подобные патологии вызывают наибольшее повреждение именно с участием воспалительных реакций. С другой стороны, современные противовоспалительные средства обладают набором отрицательных побочных эффектов, что вызывает необходимость поиска новых эффективных противовоспалительных средств с минимумом негативных побочных эффектов. В настоящей работе рассматриваются природные полисахариды с противовоспалительной активностью.

Материалы и методы

Полисахарид из *Helianthus tuberosus* L. (HTLP) был получен ранее [1]. Оценка противовоспалительного действия HTLP проводили в моделях отека при субплантарном введении формалина и модели «карманной гранулемы».

В первом случае острый воспалительный отек образовывался после субплантарного введения в заднюю лапу крысы 0,1 мл 2% -го водного раствора формалина. Интенсивность воспалительной реакции оценивали по приросту объема стопы (использовали цифровой плетизмометр) и рассчитывали процент угнетения воспаления (%). HTLP вводили подкожно однократно в дозах 100 мкг/животное в виде стерильного 0,9% раствора NaCl. Контролем служил 0,9% раствора NaCl и Глицирам – 25 мг/кг. Исследуемые вещества вводили самцам линии Wistar массой 180-250 г через час после развития воспаления [2].

В модели «Карманная гранулема» отек вызывался введением крысам в межлопаточную область 20 см³ воздуха. В образовавшийся "воздушный мешок" инъецировали 0,5 мл 50%-ного масляного раствора скипидара. HTLP вводили подкожно однократно в дозах 100 мкг/мышь в виде стерильного 0,9% раствора NaCl. Контролем служил 0,9% раствора NaCl и Глицирам – 25 мг/кг. Исследуемые вещества вводили самцам линии Wistar массой 180-250 г через час после развития воспаления [2].

Результаты

В результате было установлено, что в модели «карманной гранулемы» HTLP обладает противоэкссудативным действием на уровне 65,1%, в то время как Глицирам – только 33,5%, введение 0,9% NaCl достоверно не влияло на объем отека.

Выводы и обсуждение

Полученные результаты демонстрируют, что полисахарид обладает более выраженными противовоспалительными свойствами, чем глицирам, в выбранных моделях. HTLP почти в 2 раза более эффективно снижал объем воспаления в «Формалиновом тесте» и модели «Карманной гранулемы» через 24 ч. Кроме того, скорость развития угнетения отека, что наиболее важно для уменьшения объема пораженных тканей, была значительно выше у HTLP (уже через 4 ч – 46%), чем у Глицирама (25% через 6 ч).

Учитывая ранее полученные данные по иммуномодулирующей активности [3] и интерферониндуцирующей активности можно сделать вывод, что HTLP обладает противовоспалительной активностью опосредованной через активацию цитокиновых каскадов иммунокомпетентных клеток. Противовоспалительная активность и отсутствие побочных эффектов делают HTLP важным объектом для дальнейшего изучения.

Список литературы

1. Генералов Е.А. Спектральные характеристики и моносахаридный состав противовирусного полисахаридного индуктора интерферона из *Helianthus Tuberosus* L. Биофизика. 2015. 60 (1). С. 65-72.
2. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - 2-изд., перераб. и доп. - М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005, - 832 с.
3. Генералов Е.А. Водно-растворимый полисахарид из *Helianthus tuberosus* L.: радиозащитная, колониестимулирующая и иммуномодулирующая активность. Биофизика. 2015. 60 (1). С. 73-79
4. Генералов Е.А. Спектральные характеристики и моносахаридный состав противовирусного полисахаридного индуктора интерферона из *Helianthus Tuberosus* L. Биофизика. 2015. 60 (1). С. 65-72.

Разработка комбинационной терапии на основе радионуклидной, фототермической и химиотерапий с использованием золотых наностержней для лечения меланомы

Пельтек А.^{1*}, Агеев Э.¹, Постовалова А.¹, Рогова А.¹, Тимин А.С.¹, Зюзин М.В.¹

¹ИТМО;

peltek.oleksii@gmail.com

Онкологические заболевания являются ведущей причиной смерти во всем мире: ежегодно регистрируется 3 миллиона новых случаев и 1,7 миллиона смертей.¹ Традиционные методы лечения рака, включая хирургию, химиотерапию и лучевую терапию, не всегда эффективны для полного устранения солидных опухолей и их метастазов и могут привести к нежелательным побочным эффектам. Химиотерапевтические препараты, например, зачастую не обладают достаточной селективностью и могут повредить здоровые ткани. Таким образом, сегодня происходит развитие новых подходов к лечению онкологических заболеваний, которые используют комбинацию различных методов лечения рака, поскольку сочетание различных подходов может повысить эффективность и достичь синергетического эффекта.

Недавние достижения в разработке и применении наноструктурированных материалов способствовали прогрессу в комбинированной терапии рака. Одним из таких материалов являются золотые наночастицы, которые могут преобразовывать свет в тепло для локально индуцированной гипертермии, которую можно использовать для фототермической терапии (ФТТ).² В настоящее время проводятся многочисленные клинические испытания ФТТ, которые показывают многообещающие результаты. ФТТ обладает рядом преимуществ, таких как пространственная и временная селективность и повышенная иммуногенность, однако этот метод все же имеет определенные ограничения, такие как повреждение окружающих здоровых тканей при высоких дозах облучения, а также невозможность элиминации метастазов, которые могут возникать в процессе развития заболевания.³ Сочетание ФТТ с другими методами лечения рака, такими как радионуклидная терапия и химиотерапия, которые используют различные механизмы воздействия на опухолевые ткани, может преодолеть эти ограничения.⁴

В этой работе мы исследовали синергетический эффект лечения меланомы при помощи комбинации радио-, фототермической и химиотерапий с использованием золотых наностержней (Au NS). Для этого Au NS с максимальным пиком плазмонного поглощения в области 1160 нм, обеспечивают эффективное преобразование света и последующий нагрев в ближнем инфракрасном свете,⁵ были модифицированы терапевтическим изотопом рений-188 (¹⁸⁸Re). Для максимизации эффективности лечения меланомы была дополнительно проведена третья терапия – химиотерапия путем введения клинически значимого цитостатического препарата (паклитаксела).

Таким образом, были разработаны мультимодальные наноносители, которые комбинируют в себе химио-, радионуклидные и фототермические терапевтические свойства. Были синтезированы и модифицированы терапевтическим изотопом ¹⁸⁸Re для радионуклидной терапии фоточувствительные Au NS с эффективностью радиоактивного лечения более 96% и высокой стабильностью *in vitro*. Внутриопухолевая инъекция показала устойчивое распределение ¹⁸⁸Re-Au NS по всей опухоли без значительной утечки изотопов в здоровые ткани (более 97% Au NS в опухоли). Комбинация радионуклидной терапии с ¹⁸⁸Re-Au NS, фототермической терапии с Au NS и химиотерапии с паклитакселом привела к синергическому ингибированию роста опухоли у мышей с меланомой B16-F10 (CI = 0.79). Комбинированная терапия с использованием ¹⁸⁸Re-Au NS показала высокую терапевтическую эффективность в отношении меланомы B16-F10 без выраженного побочного действия на здоровые ткани. Стоит также отметить, что выживаемость животных при комбинированном лечении составила 75% при тройной терапии через 25 дней. Данные свойства Au NS подтверждают значительный потенциал для комбинированной радио-, фототермической и химиотерапии в будущем для применения данной системы в клиническом лечении меланомы.

Список литературы:

1. Conde, J. et al. Local triple-combination therapy results in tumour regression and prevents recurrence in a colon cancer model // *Nature Materials*. 2016. Vol. 15. P.1128–1138.
2. Nandan G. et al. Understanding and advancement in gold nanoparticle targeted photothermal therapy of cancer // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2021. Vol. 1875, № 2. P. 188532.
3. Li, W., et al. Targeting photodynamic and photothermal therapy to the endoplasmic reticulum enhances immunogenic cancer cell death // *Nature Communications*. 2022. Vol. 10. P. 3349.
4. Xiangyu D. et al. Solutions to the Drawbacks of Photothermal and Photodynamic Cancer Therapy // *Advanced Science*. 2021. Vol. 8, № 3. P. 2002504.
5. Peltek O.O. et al. Fluorescence-based thermometry for precise estimation of nanoparticle laser-induced heating in cancerous cells at nanoscale // *Nanophotonics*. De Gruyter Open Ltd, 2022. Vol. 11, № 18. P. 4323–4335.

Разработка комплексной информационной системы для изучения генетических регуляторов и физиологических механизмов индивидуальной устойчивости к формированию приобретенных нейродегенеративных расстройств

Степанов С.В.³, Найденов И.Е.¹, Корчагина В.М.¹, Кололеева В.С.^{1,4}, Глытов И.В.^{1,5}, Осипов А.А.^{1,2,3*}

¹ИТЭБ РАН;

²ИВНДиНФ РАН;

³ПуцГЕНИ;

⁴ИБХ МПГУ;

⁵РНИМУ;

aosypov@gmail.com

Нейродегенеративные заболевания - одна из наиболее распространенных причин инвалидности и смерти, при этом большинство стратегий, разработанных для их лечения, являются паллиативными и неэффективными, несмотря на многолетние усилия медиков и биологов. Исследования выявили множество факторов риска и отдельных элементов патологических процессов, однако до сих пор нет общего представления о фундаментальных механизмах развития нейродегенерации и фактически отсутствуют работы, посвященные комплексному анализу данных, полученных разными методами в рамках различных направлений исследований.

В рамках научной работы по изучению генетических регуляторов и физиологических механизмов индивидуальной устойчивости к формированию приобретенных нейродегенеративных расстройств нами разрабатывается комплексная информационная система сбора, хранения, анализа и представления всех типов данных, релевантных для изучаемого вопроса: таксономических, генетических, химических, биохимических, физиологических, электрофизиологических, гистологических, поведенческих и других. Система содержит постоянно пополняемый набор инструментов всестороннего анализа данных, в том числе методами биоинформатики и искусственного интеллекта, с целью выявления механизмов формирования нейродегенеративной патологии и поиска методов ее профилактики и лечения.

Нирросампус — комплексная информационная система, состоящая из базы данных и набора инструментов, позволяющих выполнять разные виды анализа в ручном, автоматическом или полуавтоматическом режимах. База данных имеет смешанный реляционно-файловый тип и содержит информацию обо всех типах данных, релевантных для изучаемого вопроса: таксономических, генетических, морфологических, физиологических, в т.ч. электрофизиологических, химических и биохимических. Источники данных — референсные международные БД, данные, полученные из массовых медицинских источников (результаты экспериментов и анализов больных), литературные данные и данные, полученные из прямых экспериментов нашей лаборатории и ее коллег.

Все объекты информационной системы позволяют проводить комплексный кросс-корреляционный структурно-функциональный анализ благодаря использованию универсальных идентификаторов и могут быть сгруппированы в следующие разделы: Библиографический, Раздел протоколов, Таксономический, Раздел внутриорганизменной локализации, Химический, Генетический, Электрофизиологический, Поведенческий, Гисто-морфологический, Биохимический, Раздел метаболических путей, Раздел математического моделирования.

Представленная информационная система может служить как платформой для исследований в заявленной области, так и шаблоном для разработки аналогичных систем для сходных задач, и даже основой для создания единого комплекса обеспечения исследований и разработок в рассматриваемой сфере научно-практической деятельности.

Разработка нового класса тераностиков для целей адронной терапии

Романов М.В.^{1*}, Шемяков А.Е.^{1,2}, Попов А.Л.¹

¹ИТЭБ РАН;

²ФТЦ ФИАН;

rmvya@yandex.ru

Радиосенсибилизаторы на основе наночастиц рассматриваются как один из наиболее перспективных классов тераностических агентов. Одними из наиболее перспективных материалов является оксид церия, допированный гадолинием (Ce_{0.9}Gd_{0.1}O_{2-x}). Ранее нами было показано, что наночастицы Ce_{0.9}Gd_{0.1}O_{2-x}, обладают радиосенсибилизирующими свойствами при воздействии рентгеновских лучей, индуцируя генерацию

гидроксильных радикалов и пероксида водорода, а также способны выступать в качестве эффективного МРТ-контрастирующего агента [1]. Таким образом такой состав нанокompозита обеспечивает высокую каталитическую активность в условиях воздействия ионизирующего излучения и способность визуализировать свою локализацию методом МРТ.

В рамках данной работы была проведена оценка цитотоксичности данного нанокompозита на культурах здоровых (фибробласты линия NCTC L929) и трансформированных (меланома линия В-16) клеток. Нами было установлено, что декстран-стабилизированные наночастицы $Ce_{0.9}Gd_{0.1}O_2$ -х в концентрациях 500, 250, 125 и 62.5 $\mu g/ml$ не вызывает гибель клеток обоих типов клеточных культур через 24, 48 и 72 часа соинкубации, однако способствует снижению их митохондриального мембранного потенциала в дозо-зависимой манере. Результаты МТТ-теста для обоих типов клеток продемонстрировали их жизнеспособность в районе 100% от контроля, а статистический анализ не выявил значимых отклонений для всех исследуемых концентраций. Для линии NCTC L929 отношение мертвых клеток к их общему числу не превысило 2%, а для линии В-16 не превысило 5% среди всех концентраций. В первые 2 дня наночастицы в концентрациях 500, 250 и 125 $\mu g/ml$ привели к снижению митохондриального потенциала у клеток линии NCTC L929, в третий день к такому результату привели только две наибольшие концентрации. В первый день наночастицы $Ce_{0.9}Gd_{0.1}O_2$ -х привели к снижению митохондриального потенциала клеток меланомы во всех концентрациях, а в последующие 2 дня к такому эффекту приводили все концентрации, кроме 62.5 $\mu g/ml$.

Нами разработан дизайн эксперимента на культуре клеток меланомы мыши линии В-16 для выявления радиосенсибилизирующих свойств различных наноматериалов с использованием протонного терапевтического комплекса «Прометеус» (АО Протом) (подобраны дозы облучения и позиционирования облучаемого объекта, а также условия подготовки и культивирования клеточной культуры). В дальнейшем планируется оценить радиосенсибилизирующие свойства наночастиц $Ce_{0.9}Gd_{0.1}O_2$ -х при воздействии пучка протонов при облучении культур клеток в пике Брэгга.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-73-10231.

Источники и литература

1. Popov A., Abakumov M., Savintseva I., Ermakov A., Popova N., Ivanova O., Kolmanovich D., Baranchikov A., Ivanov V. Biocompatible dextran-coated gadolinium-doped cerium oxide nanoparticles as MRI contrast agents with high T1 relaxivity and selective cytotoxicity to cancer cells J. Mater. Chem. B, 2021,9, 6586-6599

Разработка системы доставки радионуклида 223-радия на основе наночастиц аморфного карбоната кальция

Ахметова Д.Р.^{1,2*}, Карпов Т.Е.^{1,2}, Антуганов Д.О.², Сысоев Д.С.², Тимин А.С.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого;

²Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А. М. Гранова;
ahmetova.darya1999@yandex.ru

Неорганические частицы на основе карбоната кальция зарекомендовали себя как перспективные агенты для эффективной доставки биологически активных соединений и радиоизотопов благодаря их физико-химическим свойствам: твердости, большой площади поверхности, характерной рН-чувствительности и контролируемой биодеградации [1].

В биомедицине представляют интерес аморфные структуры карбоната кальция, отличающиеся пористой структурой, сферической формой и высокой эффективностью загрузки терапевтических агентов [2]. Поэтому желательным направлением является синтез наноразмерного аморфного карбоната кальция и его использование в качестве системы доставки терапевтических радиоизотопов для лечения злокачественных образований.

В данном исследовании были использованы наноразмерные носители на основе аморфного карбоната кальция, полученные методом соосаждения солей Na_2CO_3 и $CaCl_2$ в присутствии полиакриловой кислоты (ПАК) в качестве стабилизатора размера частиц. Данная методика позволяет получить стабильную систему наночастиц с узким средним размером (80-120нм). Наночастицы имеют высокие показатели биосовместимости и агрегативной устойчивости, что было доказано рядом *in vitro* исследований.

Для использования системы наночастиц в целях доставки терапевтических радиоизотопов для лечения злокачественных образований необходима разработка эффективного протокола радиомечения. В данной работе был испробован ряд методик включения изотопа ^{223}Ra в носители:

(1) Включение изотопа на этапе соосаждения солей – поэтапное смешивание растворов ПAK+ $CaCl_2/RaCl_2 + Na_2CO_3$ для образования $RaCO_3$ и его включения в структуру носителя.

(2) Включение на этапе «пост синтеза» методом физической адсорбции – инкубирование готовых носителей в растворе $RaCl_2$.

(3) Включение изотопа на этапе соосаждения солей с последующей модификацией поверхности частиц биосовместимыми полимерами (бычий сывороточный альбумин и дубильная кислота) методом послойного нанесения.

(4) Включение на этапе «пост синтеза» в присутствии ионов Ba^{+} и SO_4^{+} в качестве катализаторов реакции обмена ионов Na^{+}/Ra^{2+} и последующего включения изотопа в структуру носителя.

Для проверки эффективности методики радиомечения были исследованы такие параметры, как эффективность загрузки активности в частицы и радиохимическая стабильность готового препарата в физиологических жидкостях.

Для измерения процента загрузки радиоизотопа в наночастицы, после завершения протокола радиомечения частицы были осаждены на центрифуге при 14000 об/сек и надосадочная жидкость была извлечена из образца. Измерение активности были произведены сцинтилляционной гамма-камерой Triathler (HIDEX, Финляндия). Процент загрузки изотопа вычисляется методом сравнения исходной активности с оставшейся в осадке наночастиц.

Радиохимическая стабильность готового препарата измеряется путем инкубирования полученных наночастиц с включенным изотопом в физиологическом растворе и человеческой сыворотке крови со снятием измерения активности в частицах и инкубируемой жидкости в течение 1, 3, 7 суток.

Результаты данных исследований методики радиомечения (4) продемонстрировала высокие показатели эффективности загрузки активности ($\approx 70\%$) и радиохимической стабильности ($>90\%$ на 7 сутки), что соответствует общепринятым критериям для контроля качества радиофармпрепаратов.

Работа была выполнена при поддержке государственного задания (FSEG-2022-0012)

[1] Y. Huang, L. Cao, B. V. Parakhonskiy, and A. G. Skirtach, "Hard, Soft, and Hard-and-Soft Drug Delivery Carriers Based on $CaCO_3$ and Alginate Biomaterials: Synthesis, Properties, Pharmaceutical Applications," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 5, 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14050909.

[2] P. Zhao, Y. Tian, J. You, X. Hu, and Y. Liu, "Recent Advances of Calcium Carbonate Nanoparticles for Biomedical Applications," *Bioengineering*, vol. 9, no. 11, p. 691, 2022, doi: 10.3390/bioengineering9110691.

Разработка специализированной платформы для биопечати тканеинженерных эквивалентов структур глаза и компонентов систем орган-на-чипе для применения в экспериментальной офтальмологии

Кравченко С.В.^{1*}, Мясникова В.В.^{1,2}, Сахнов С.Н.^{1,2}

¹*Краснодарский филиал «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава России, Краснодар, Россия;*

²*Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия;*
kvs.1991@yandex.ru

Для изучения физиологии зрительного анализатора и происходящих в нём биофизических процессов, тестирования новых подходов в лечении его заболеваний, активно внедряются передовые методики, среди которых важное место занимают тканевые эквиваленты различных структур глаза, а так же микрофизиологические системы орган-на-чипе. Пример применения тканеинженерных эквивалентов в офтальмологии – тканеинженерные роговичные эквиваленты, в том числе, иннервированные, позволяющие изучать взаимодействие роговичных нервов и стромы, оценивать механические и оптические свойства тканеинженерных роговиц и перспективы их применения для кератопластики [1]. Технология орган-на-чипе позволяет с высокой точностью моделировать роговицу и переднюю поверхность глаза вместе с его вспомогательным аппаратом, что актуально при изучении патогенеза синдрома сухого глаза (в частности – биофизических процессов, зависящих от испарения слезной жидкости и ее осмолярности) и поиска эффективных методов его терапии. Также возможно моделирование сетчатки и её гематоретинальных барьеров, что позволяет воспроизводить возрастную макулярную дегенерацию, диабетический макулярный отек, диабетическую ретинопатию и глаукому для скрининга нейропротекторных и антиглаукомных препаратов [2]. В обоих случаях возможно применение био- и 3D-биопечати [3, 4].

Целью данной работы явилась разработка специализированной платформы для биопечати тканеинженерных эквивалентов структур глаза и компонентов систем орган-на-чипе для применения в экспериментальной офтальмологии.

Разработанный прототип имеет подвижный стол (перемещение по оси Y) и держатель экструдера (перемещается по осям X и Z). Держатель экструдера позволяет устанавливать экструдеры и печатающие головки различных типов. Размер поля печати (30*35*20 мм) оптимизирован для большинства структур глаза и

систем орган на чипе, что, в отличие от многих open source установок, использующих платформы от обычных 3D-принтеров, позволяет оптимизировать общие размеры самого устройства, делая удобным его размещение в ламинарном шкафу, а так же уменьшает вибрации конструкции, увеличивая точность и качество печати. Система поддерживает две концепции: 3D-печать, подразумевающую создание объёмных 3-х мерных объектов и биопечать на плоскости, например, печать клетками на поверхности адгезивного материала в один слой. В текущей версии платформы будет использоваться разработанная для нее печатающая головка с экструдером поршневого типа, позволяющая выполнять 2D- и 3D-печать различными гелями, содержащими и не содержащими клетки, а так же дозированно и с высокой точностью наносить среду с суспензией клеток различных типов на адгезивные поверхности и распределять их по камерам микрофлюидной системы орган-на-чипе.

1. Wang S., Ghezzi C.E., Gomes R. et al. In vitro 3D corneal tissue model with epithelium, stroma, and innervation // *Biomaterials*. 2017. Vol. 112. P. 1-9.
2. Haderspeck J.C., Chuchuy J., Kustermann S. et al. Organ-on-a-chip technologies that can transform ophthalmic drug discovery and disease modeling // *Expert opinion on drug discovery*. 2019. Vol. 14. No. 1. P. 47-57.
3. Zhang B., Xue Q., Li J. et al. 3D bioprinting for artificial cornea: Challenges and perspectives // *Medical engineering & physics*. 2019. Vol. 71. P. 68-78.
4. Lee H., Cho D.W. One-step fabrication of an organ-on-a-chip with spatial heterogeneity using a 3D bioprinting technology // *Lab on a Chip*. 2016. Vol. 16. No. 14. P. 2618-2625.

Рецепторная специфичность и трансмиссивность как элементы количественной оценки пандемического потенциала зоонозных вирусов гриппа

Онхонова Г.С.^{1*}, Косенко М.Н.¹, Гудымо А.С.¹, Молчанова М.Л.¹, Васильцова Н.Н.¹, Марченко В.Ю.¹, Tran T.Nhai.², Рыжиков А.Б.¹

¹*ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора;*

²*Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр;*

onhonova_gs@vector.nsc.ru

Помимо необходимости постоянного мониторинга за сезонными и зоонозными штаммами, фундаментальные исследования остаются важными для комплексного изучения и понимания механизмов возникновения новых вариантов вируса гриппа, в том числе с эпидемическим и пандемическим потенциалом. Все респираторные вирусы, в том числе вирус гриппа, отличаются способностью к воздушно-капельной передаче – трансмиссивностью. Несмотря на высокую заболеваемость и смертность, молекулярные механизмы трансмиссивности вируса гриппа недостаточно изучены. Роль рецепторного связывания в процессе жизненного цикла вируса гриппа имеет важное значение, так как является начальной стадией проникновения вирусной частицы в клетку инфицированного организма. При возникновении штаммов, способных преодолевать межвидовой барьер, а также коллективный иммунитет, сформированный к уже циркулирующим вариантам вируса гриппа, существует опасность как спорадических случаев инфицирования, так и эпидемий. В 2016 году ВОЗ представила «Инструмент ВОЗ для оценки риска пандемии гриппа» (TIPRA – Tool for Influenza Pandemic Risk Assessment). Настоящее исследование рассматривает два элемента TIPRA – способность вирусов гриппа к рецепторному связыванию и трансмиссивность вируса на животных моделях. В ходе работы были исследованы штаммы вируса гриппа птиц, циркулирующих на территории России, а также на территории Социалистической Республики Вьетнам. Изученные вирусы гриппа птиц субтипов А/Н5Nх и А/Н9N2 сохраняют специфичность к «птичьему» типу сиаловых рецепторов. Некоторые вирусы субтипа А/Н9N2 имеют рецепторную специфичность как к «птичьему», так и к «человеческому» типу рецепторов. Вирус гриппа птиц А/chicken/ Primorsky Krai/1771/2018 (Н9N2) с «двойной» специфичностью продемонстрировал трансмиссивность на хорьковой модели. Постоянная циркуляция таких вирусов среди птичьих популяций и периодическое заражение человека делают возможной эволюцию вирусов с вероятными изменениями рецепторной специфичности и трансмиссивности, что может привести к появлению нового пандемического штамма. Количественная оценка пандемического потенциала зоонозных вирусов гриппа необходима для своевременного реагирования и принятия противоэпидемических мер защиты.

Роль НАДФН-оксидазы 2 в развитии окислительного стресса и микроглиоза в гиппокампе мышей при индуцированной амилоидной токсичности

Осипов А.А.^{2,1*}, Любанская А.Д.^{1,3}, Мухина К.А.^{1,3}, Корчагина В.М.¹, Попова И.Ю.¹

¹ИТЭБ РАН;

²ИВНДуНФ РАН;

³МГУ;

aosypov@gmail.com

Разработка ранней терапии болезни Альцгеймера (БА) является актуальной проблемой современной биологии и медицины. Основные факторы риска БА связаны с окислительным стрессом, в который существенный вклад вносит 2 изоформа НАДФН-оксидазы (NOX2). Целью данного исследования было выяснение роли NOX2 в развитии окислительного стресса и микроглиоза в гиппокампе мышей на начальных этапах развития БА.

Эксперименты проводили на мышах линии BALB/c, которым предварительно имплантировали канюли для введения препаратов в желудочки мозга. Мышей разделили на три группы: контрольная с введением ACSF n = 5, группа с введением бета-амилоида (A β), n = 4, и группа с введением A β и селективного ингибитора NOX2 GSK2795039 (GSK), n = 4. Препараты вводили бодрствующим мышам с помощью шприца Гамильтона через канюлю (1 мкл, со скоростью 1 мкл/мин) ежедневно в течение 3 дней. Через 12 ч. после последней инъекции препаратов, мозг извлекали, левую половину фиксировали в 4% параформальдегиде для иммуногистохимического анализа, а правую половину анализировали биохимическими методами. Поскольку наибольшее количество NOX2 обнаружено на микроглии и активация этих клеток наблюдается при развитии болезни Альцгеймера, в работе был проведен иммуногистохимический анализ микроглии в гиппокампе. Правое полушарие мозга гомогенизировали и анализировали маркеры окислительного стресса в разных фракциях.

Результаты показали, что в группе A β существенно увеличивалась площадь микроглиальных клеток в гиппокампе (на 50% в зубчатой фасции и 58% и поле CA1 гиппокампа). Блокада NOX2 существенно уменьшала площадь микроглиальных клеток до 47-49% по сравнению с контрольными значениями. Биохимические исследования показали, что в мембранной фракции гомогената мозга мышей из группы A β было повышено количество перекисно окисленных липидов и понижено содержание восстановленных сульфгидрильных групп, что говорит о продолжительном местном действии АФК. GSK в значительной степени предотвратил эти изменения. В митохондриальной фракции не выявлены различия между группами, что свидетельствует об отсутствии митохондриальной патологии на раннем этапе развития патологии.

Анализ методом главных компонент по биохимическим параметрам (еще более - в совокупности с глиальными) позволяет четко отделить группу с амилоидом от группы контроля и GSK, которые между собой не различаются. Многокомпонентный кросс-корреляционный анализ между различными биохимическими и глиальными параметрами выявил значительное отличие между группами в паттернах распределения коррелирующих параметров, с повышением количества скоррелированных параметров в амилоидной и особенно GSK группах, что может говорить о согласованном изменении метаболизма при развитии патологии. При этом кросс-корреляционный анализ сводной группы показал меньшее чем даже в контроле количества скоррелированных параметров, говорящее о противонаправленном действии GSK на развитие патологии.

Блокатор НАДФН-оксидазы 2 предотвращает как микроглиоз в гиппокампе, так и окислительный стресс в мозге мышей при индуцированной амилоидной токсичности и, таким образом, может представлять собой фармакологическую мишень для прямой и эффективной терапии болезни Альцгеймера.

Роль арахидоновой кислоты и её производных в функционировании нейроглиоваскулярной единицы

Лукин П.О.¹, Верисокин А.Ю.¹, Вerveйко Д.В.^{1*}

¹Курский государственный университет;

allegroform@gmail.com

Нарушения кровоснабжения головного мозга приводят к потере энергетического баланса в нервных тканях и в дальнейшем к различным нейродегенеративным патологиям (в частности, болезни Альцгеймера, Паркинсона, инсульт), сопровождающимся формированием кортикальных распространяющихся деполяризационных (РКД) волн, приводящих к гибели нейронов. Современные экспериментальные

исследования показывают, что увеличение кровотока после РКД существенно зависит от синтеза арахидоновой кислоты (АК) и её производных. Так, в частности, некоторые сигнальные молекулы (EETs, PGE2) обладают сосудорасширяющим действием, с другой стороны, синтез и накопление в мембранах клеток сосудосуживающей 20-НЕТЕ приводит к нарушению нейроваскулярного сопряжения, в том числе к появлению новых очагов РКД и долговременному ишемическому повреждению нервной ткани. Понимание роли АК и её метаболитов в нормальном функционировании головного мозга появилось в последние годы в связи с накоплением большого количества экспериментальных данных [1].

При моделировании мы основываемся на локальной модели кальциевой динамики в астроците [2], которая в дальнейшем была нами расширена на пространственный случай, в котором учитывались морфологические особенности астроцита [3]. Мы дополняем глутаматовое взаимодействие между астроцитом и нейроном васкулярной динамикой. Таким образом, предлагаемая локальная модель содержит нейроглиоваскулярные связи, которые описывают комплекс взаимодействий между нейронами, астроцитами и кровеносными сосудами: кальциевая динамика в астроцитах с возможностью учёта морфологической принадлежности, синаптическая активность и васкулярная динамика. Модель дополнена уравнениями, описывающими производство АК и её производных и их влияние на активность нейроглиоваскулярной единицы в целом.

В результате серий численных экспериментов были определены эффекты, вызванные влиянием АК и её производных на васкулярный тонус, астроцитарную динамику и синаптическую активность. Установлена связь между уровнями концентраций EET и PGE2, диаметром кровеносных сосудов, уровнем кислорода в крови и кальциевой динамикой. Модель показывает, что внешнее воздействие, направленное на увеличение уровня 20-НЕТЕ, ведёт к сужению кровеносных сосудов и снижению кальциевой динамики в астроците, что согласуется с известными экспериментальными данными, при этом при условии длительного времени воздействия возможен кратковременный всплеск кальциевой активности.

Таким образом, результаты модельного исследования подтверждают, что для полноценного теоретического описания ключевых биофизических процессов, протекающих в нервных тканях коры головного мозга, необходимо включение в модель всех путей взаимодействия между ключевыми элементами нейроглиоваскулярной единицы – астроцитами, нейронами и кровеносными сосудами, – в том числе вазомодуляторных механизмов АК и её производных. Модельное исследование позволяет предположить высокую эффективность опосредованного воздействия на кровоток и нейронную активность путём контроля синтеза метаболитов АК. Такой подход представляется перспективным фармакологическим методом лечения большого числа нейродегенеративных патологий.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-74-00146.

Список литературы

1. Attwell D., Buchan A., Charpak S. et al. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* – 2010. – Vol. 468. – P. 232–243.
2. Ullah G., Jung P., Cornell-Bell A. Anti-phase calcium oscillations in astrocytes via inositol(1,4,5)-trisphosphate regeneration // *Cell Calcium*. – 2006. – V. 39(3). – P. 197–208.
3. Verisokin, A. Yu., Vervevko, D. V., Postnov, D. E., Brazhe, A. R. Modeling of Astrocyte Networks: Toward Realistic Topology and Dynamics // *Front. Cell. Neurosci.* – 2021. – V. 15. – 645068.

Роль белка теплового шока A1 при биполярном аффективном расстройстве

Серегин А.А.^{1*}, Кротенко Н.М.², Дмитриева Е.М.¹, Смирнова Л.П.¹

¹Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук;

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации;
apocalips1991@mail.ru

На сегодняшний день во всём мире набирают популярность исследования, связанные с поиском белков, специфичных для депрессии, биполярного аффективного расстройства (БАР) и других психических расстройств. Поиск таких белков, отражающих характерные изменения патогенеза этих заболеваний, является перспективным. (English J. et al., 2010; Lakhan S., 2006; Domenici E., 2010). Рассмотрение мировой литературы, показывает, что существующие на данном этапе работы с использованием протеомного анализа, главным образом, представлены работами по шизофрении; существуют единичные работы, выполненные при депрессии и БАР, но в основном, на постмортальном материале. В результате ранее проведенного сравнительного масс-спектрометрического исследования белков сыворотки крови у пациентов с депрессией и БАР, а также у здоровых доноров были выявлены белки: белок теплового шока 1A (Heat Shock 70kDa Protein1A), (HSPA1A)-

70,052, да и альфа-актин-2 (Actin, aortic smooth muscle) (АКТА2), – 42,009 Да. В настоящей работе проводилось сравнительное изучение количества данных белков в сыворотке крови больных депрессией и БАР, предположительно участвующих в патогенезе данных расстройств.

Проведено клинико-биологическое обследование сыворотки крови 74 человек. Исследуемые группы были сформированы из 30 пациентов с рекуррентным депрессивным расстройством (F33), и 28 пациентов с БАР (F31). Диагностическая оценка и клиническая верификация диагноза у пациентов проводилась врачами клиники в соответствии с МКБ-10. Средний возраст пациентов составил 40,33±14,1лет. Кровь у всех обследованных лиц забирали утром натощак до начала терапии. В качестве контрольной группы было обследовано 14 психически и соматически здоровых лиц, сопоставленных по полу и возрасту, обследуемым пациентам, (средний возраст 32,6±2,2 лет).

Для определения количества исследуемых белков были использованы коммерческие наборы для твердофазного иммунно-ферментного анализа согласно протоколу производителя. Содержание белка теплового шока 1А определяли при помощи набора SEB081Hu Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Heat Shock 70kDa Protein1A(HSPA1A) from Homo sapiens (Human) (Cloud-Clone Corp., USA), а количество альфа-актина-2 определяли при помощи набора Human α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) ELISA Kit from Homo sapiens (Human) (Cloud-Clone Corp., USA). Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью непараметрических критериев Краскела-Уоллиса и U-критерия Манна-Уитни.

В результате статистически значимых различий содержания АКТА2 между больными БАР (164,85[151,05;187,95]нг/мл), депрессией(166,875[146,535;194,775]нг/мл) и здоровых лиц (165,75[160,425;178,575]нг/мл) обгорожено небело, попарные сравнения также не выявили различий. Однако значимые различия между исследуемыми группами были обнаружены в содержании белка теплового шока 1А (HSPA1A) (Краскела-Уоллиса $p=0,0430$). При попарном сравнении обнаружено, что данные различия возникают за счет повышения уровня данного белка у больных БАР (0,8356 [0,5948;1,098]нг/мл), в сравнении со здоровыми лицами (0,6135 [0,5123;0,7722]нг/мл, критерий Манна-Уитни $p=0,016$). Белок HSPA1A входит в семейство высококонсервативных белков теплового шока, экспрессирующихся или индуцируемых в ответ на различные стрессоры. Они участвуют в синтезе, и транспорте белков, а при воздействии стрессовых факторов предотвращают неправильное сворачивание и агрегацию белков (Venatgoch 2011). Известно, данные белки участвуют эмбриональном в развитии центральной нервной системы, а также учувствуют в нейропротекции предотвращая гибель нейронов (Reed-Herbert et al. 2006). По литературным источникам при БАР обнаружены иммунные нарушения во время острых эпизодов мании или депрессии (Barbosa et al., 2014; Brietzke et al., 2009; Cunha et al., 2008; Ortiz - Domínguez et al . 2007 г. Tsai et al. 2012). Также в исследовании К. Бекинга с соавторами была обнаружена повышенная экспрессия HSPA1A, в моноцитах больных БАР во время депрессивного эпизода (Becking K, et all, 2015). Кроме того, опираясь на данные модели белок-белковых взаимодействий общих для HSPA1A и балков головного мозга (А.М. Нумуга

et all, 2022), можно с большой долей вероятности предположить участие HSPA1A в патогенезе БАР. Однако существуют работы об ассоциации белка HSPA1A с параноидной шизофренией, что может указывать на общие патогенетические процессы в данных заболеваниях и данный вопрос требует дальнейшего изучения. Таким образом белок HSPA1A может иметь непосредственное участие в патогенезе БАР и быть предложен в качестве дополнительного параклинического критерия БАР при дальнейшем изучении его роли при данной патологии.

Роль гемолитической резистентности эритроцитов в выявлении нестабильных атером

Ястребова Е.С.^{1*}, Мальцев В.П.¹, Карпенко А.А.²

¹ИХКГ СО РАН;

²ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России;

kat30cer@gmail.com

Одним из основных клинических проявлений атеросклероза является образование атеросклеротических бляшек (АБ), нестабильность которых, в свою очередь, определяет риск фатальных сердечно-сосудистых событий. В связи с этим, представляется актуальной задачей разработка новых предикторы дестабилизации атером для возможности своевременного обнаружения патологии и начала терапии. Значительную роль в формировании нестабильной АБ играют гипоксические состояния, возникающие в различных отделах сосудов, а также внутрисосудистый гемолиз. Ключевым фактором, приводящим к нарушениям в регуляции кислородного обмена, является отклонение от нормы функциональных параметров эритроцитов. Лимитирующая стадия процесса CO₂/O₂ обмена в организме связана с работой трансмембранного эритроцитарного белка полосы 3, на функциональных параметрах которого мы и сфокусировали наше внимание. Таким образом, данное исследование с применением сканирующей проточной цитометрии направлено на выявление отклонений

эритроцитарных показателей, имеющих отношение к формированию нестабильной атеромы в патогенезе атеросклероза.

Атеросклеротические бляшки брахиоцефальных артерий получали путем эндартерэктомии. Гистологическое исследование микроскопических срезов АБ проводилось с помощью AxioCam MRc5. В экспериментах использовалась донорская венозная кровь. Для предотвращения свертываемости забор крови производился в стандартный пластиковый вакутейнер с антикоагулянтом в соотношении кровь/антикоагулянт 9:1. В качестве антикоагулянта использовалась EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), так как она является стандартом в подобных исследованиях. Всего в это исследование было включено 58 пациентов и 60 доноров. Все добровольцы были разделены на три группы: пациенты со стабильными и нестабильными атеромами и условно здоровые доноры. Процедура измерения состояла в следующем: каждый образец разбавляли в 1000 раз 0,9% физиологическим раствором или раствором для инициации гемолиза. Объем, содержащий 100 мкл разведенной крови, помещали в пробирку и измеряли с помощью сканирующего проточного цитометра (СПЦ производства ООО «ЦитоНова», Новосибирск, Россия, <http://cyto.kinetics.nsc.ru>).

С использованием сканирующего проточного цитометра были измерены следующие параметры: морфология эритроцитов (диаметр, толщина, объем, площадь поверхности, индекс сферичности и спонтанная кривизна), функциональные свойства эритроцитов (эластичность, анионный обмен) и содержание гемоглобина в единичных клетках. Эти результаты мы анализировали одновременно со стандартными диагностическими параметрами, включающими оценку нарушений липидного обмена и уровня гликированного гемоглобина в крови. Оказалось, что статистически значимое различие (по критерию Манна-Уитни при p -значении = 0.029) между выборками с различными типами атером наблюдается по параметру, отвечающему за устойчивость эритроцитов к индуцированному изотоническому гемолизу. Более того, было зафиксировано, что пациенты со стабильной атеромой имеют более высокую скорость анионного обмена, чем у условно здоровых доноров и у пациентов с нестабильной атеромой.

Обнаруженное поведение эритроцитов при наличии атеросклероза брахиоцефальных артерий можно объяснить компенсаторным эффектом организма в попытке удовлетворить повышенную потребность кислорода в области АБ и устранить гипоксические состояния и, как следствие, рост и дестабилизацию АД.

Роль гравитационных и мышечных сил в сохранении костной ткани

Балтина Т.В.^{1*}, Саченков О.А.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;
tvbaltina@gmail.com

Основными регуляторами механической трансдукции костной ткани, как полагают, являются два основных источника - экзогенные гравитационные силы и эндогенные мышечные силы. Изменения костной ткани характерны для длительной иммобилизации после травм. Предполагается, что нарушения нейромоторного аппарата в этих условиях могут быть связаны с изменением механических свойств мышечной ткани и соответственно с нарушением естественной компенсации при формировании костной ткани. Однако, убедительные доказательства ведущей роли в регуляции костного метаболизма мышечных сил на сегодняшний день отсутствуют. Теория механостата Г. М. Фроста постулирует линейную зависимость между нагрузкой и прочностью кости. Согласно теории механостата, главный стимул, к воздействию которого адаптируются кости, является механическая нагрузка.

Её источниками являются мышечное напряжение и гравитация. Гравитация, в свою очередь, может воздействовать на кости напрямую, через силу реакции опоры, при условии, что конечность находится в контакте с таковой, и через ускорение свободного падения, под воздействием которого тело находится даже при отсутствии опоры (например, в условиях невесомости) [1]. Г. М. Фрост конкретизировал взаимоотношения элементов системы механостата, включив туда влияние нервной системы, мышечных сокращений и механического использования, а также разделил немеханические агенты, влияющие на моделирование и ремоделирование на системные и локальные. Если один из этих факторов (гравитация или мышечная активность) для активации механотрансдукции в кости более эффективен, чем другой, это будет иметь важное клиническое значение в плане, например назначения физической активности для сохранения прочности кости или лечения остеопороза. Например, люди с мышечной дистрофией Дюшенна и церебральным параличом демонстрируют сокращение костной массы и повышению риска переломов [2;3]. Кроме того, значительная потеря костной ткани происходит у пациентов с повреждением спинного мозга [4;5]. где быстрая и глубокая потеря мышечной массы, является вторичным эффектом потери мотонейронов, которая, по-видимому, является провоцирующим фактором. Неиспользование конечности в результате травмы, иммобилизация (постельный

режим) или космический полет, соответственно, также приводят к значительной потере костной и мышечной массы [6;7].

Нами также было показано, что после разгрузки происходит потеря костной ткани, меняются ее макромеханические параметры [8] и предложен метод оценки этих изменений [9].

Исследования в условиях микрогравитации, или на моделях, направленных на минимизацию влияния гравитации, позволяют предположить, что влияние изменения гравитационной нагрузки на различные части опорно-двигательного аппарата может вытекать из его биомеханической эволюции. Благодаря имеющимся в настоящее время результатам можно предположить, что сигнальные пути, ответственные за влияние на морфологию и функцию мышц и кости, являются совместными и последовательными [10]. Однако, большинство видов деятельности, связанные с силой гравитации, также включают мышечные силы (например, бег, прыжки). Напротив, некоторые виды деятельности стимулируют скелет почти исключительно за счет мышечной нагрузки (например, поднятие тяжестей, плавание), поэтому важна оценка эффективности относительно природы нагрузки.

Определение основного стимула для адаптивной реакции на макроскопическом уровне (мышечные силы или гравитационные нагрузки) несет в себе потенциал для разработки физических упражнений и методов лечения, направленных на более эффективное увеличение костной массы, могут быть оптимизированы существующие программы реабилитации и профилактики остеопороза.

Литература

- 1 Frost H. M. A 2003 Update of Bone Physiology and Wolff's Law for Clinicians. *Angle Orthod.* 2004. Vol.74. P.3–15.
- 2 Tsaknakis K., Jäckle K., Lüders K.A., Lorenz H.M., Braunschweig L., Hell A.K. Reduced bone mineral density in adolescents with Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) and scoliosis. *Osteoporos Int.* 2022. Vol.33. P.2011-2018.
- 3 Won J.H., Jung S.H. Bone Mineral Density in Adults with Cerebral Palsy. *Front Neurol.* 2021. Vol.12:733322. doi: 10.3389/fneur.2021.733322.
- 4 Coupaud S., McLean A.N., Purcell M., Fraser M.H., Allan D.B. Decreases in bone mineral density at cortical and trabecular sites in the tibia and femur during the first year of spinal cord injury. *Bone.* 2015. Vol.74. P.69-75.
- 5 Antoniou G., Benetos I.S., Vlamis J., Pneumaticos S.G. Bone Mineral Density Post a Spinal Cord Injury: A Review of the Current Literature Guidelines. *Cureus.* 2022. Vol.14:e23434. doi: 10.7759/cureus.23434.
- 6 Stavnichuk M., Mikolajewicz N., Corlett T., Morris M., Komarova S.V. A systematic review and metaanalysis of bone loss in space travelers. *NPJ Microgravity.* 2020. Vol.6:13. doi: 10.1038/s41526-020-0103-2.
- 7 Yang H., Xu X., Bullock W., Main R.P. Adaptive changes in micromechanical environments of cancellous and cortical bone in response to in vivo loading and disuse. *J Biomech.* 2019. Vol. 89. P. 85-94.
- 8 Baltina T.V. Ahmetov N.F., Sachenkov O.A., Fedyanin A.O., Lavrov I.A. The Influence of Hindlimb Unloading on Bone and Muscle Tissues in Rat Model. *BioNanoSci.* 2017. Vol. 7. P. 67-69.
- 9 Gerasimov O.V, Kharin N.V, Fedyanin A.O, Bolshakov P. V., Baltin M.E., Statsenko E.O., Fadeev F.O., Islamov R.R., Baltina T.V., Sachenkov O.A. Bone Stress-Strain State Evaluation Using CT Based FEM. *Frontiers in Mechanical Engineering.* 2021. Vol.7: 688474. doi: 10.3389/fmech.2021.688474.
- 10 Avin K.G., Bloomfield S.A., Gross T.S., Warden S.J. Biomechanical aspects of the muscle-bone interaction. *Curr Osteoporos Rep.* 2015. Vol.13. P. 1-8.

Роль дисфункции митохондриальных систем транспорта ионов кальция и калия в прогрессировании мышечной дистрофии Дюшенна. Пути коррекции

Дубинин М.В.^{1*}, Белослудцев К.Н.^{1,2}

¹Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия;

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

Dubin1989@gmail.com

Миодистрофия Дюшенна (МДД) – рецессивное X-сцепленное наследственное заболевание, которую вызывают мутации в гене, кодирующем белок дистрофин. Это одна из самых частых форм мышечных дистрофий – МДД диагностируют в среднем у 1 из 3500 мальчиков. Вследствие отсутствия дистрофина мышечные волокна становятся хрупкими, что вызывает разрыв сарколеммы, увеличение их проницаемости при сокращении мышц и обуславливает выход растворимых ферментов, таких как креатинкиназа, из клеток и проникновение внутрь ионов кальция и других ионов. Кроме того, дистрофин и связанный с дистрофином гликопротеиновый комплекс играют важную роль в координации работы различных сигнальных систем, в том числе ионных каналов, обеспечивающих нормальное функционирование скелетных мышц и потеря этих структур приводит к дисрегуляции ионного гомеостаза [1].

В настоящее время продолжают исследования, направленные на создание генной терапии, позволяющей восстановить нормальную экспрессию дистрофина. Однако такие подходы зачастую сталкиваются с множественными техническими проблемами, обусловленными, прежде всего, доставкой вектора, и могут быть эффективны лишь при раннем начале терапии, до необратимого замещения мышечной ткани нефункциональной соединительной тканью. В связи с этим большое внимание уделяется коррекции вторичных эффектов МДД, прежде всего нарушению Ca^{2+} гомеостаза, ассоциированного с увеличением количества активных форм кислорода (АФК), хроническим воспалением, снижением регенеративной способности и фиброзом [1].

Отдельного внимания заслуживают митохондрии, обеспечивающие мышечные клетки энергией в форме АТФ, необходимого для нормального сокращения. При развитии МДД эти органеллы демонстрируют существенное снижение интенсивности окислительного фосфорилирования и гиперпродукцию АФК, отмечается снижение биогенеза органелл и нарушение их динамики [1]. Кроме того, в ряде наших работ продемонстрировано, что митохондрии скелетных мышц дистрофин-дефицитных mdx мышей характеризуются перестройками в системах транспорта кальция и калия [2, 3]. В частности, такие изменения сопровождаются снижением эффективности унипорта кальция и чувствительности к индукции митохондриальной кальций-зависимой поры (известной как МРТ пора) [2], а также угнетением транспорта ионов калия и содержания этого иона в матриксе органелл [3]. Нами выявлено, что улучшение способности митохондрий накапливать ионы калия в матриксе путем применения неиммуносупрессивного ингибитора МРТ поры алиспоривира приводит к нормализации митохондриальной функции и ультраструктуры, а также снижению интенсивности деструктивных процессов в скелетной мускулатуре [4]. Кроме того, недавно нами выявлено, что активация транспорта ионов калия в митохондриях скелетных мышц mdx мышей с помощью уридина, предшественника активатора АТФ-зависимого калиевого канала (митокАТФ) УДФ, приводит к достоверному снижению уровня фиброза в скелетной мускулатуре [3]. Более выраженное действие было показано для активатора кальций-активируемого калиевого канала митохондрий (митокВКСа) NS1619, улучшившего транспорт и уровень калия в митохондриях скелетных мышц mdx мышей, что также способствовало снижению интенсивности окислительного стресса и увеличению кальциевой емкости органелл, а также сопровождалось улучшением ультраструктуры органелл и смягчением дегенеративных процессов в скелетных мышцах животных [5]. В докладе обсуждается роль дисфункции систем транспорта ионов кальция и калия в митохондриях скелетных в развитии дистрофии Дюшенна, а также возможность коррекции этой патологии путем улучшения функции этих структур.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-75-10006).

Литература:

1. G. Angelini, G. Mura, G. Messina. *Exp. Cell Res.* 2022, 410, 112968.
2. M.V. Dubinin, E.Y. Talanov, K.S. Tenkov, et al. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020, 1866, 165674.
3. M.V. Dubinin, V.S. Starinets, N.V. Belosludtseva, et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 10660.
4. M.V. Dubinin, V.S. Starinets, E.Y. Talanov, et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 9780.
5. M.V. Dubinin, V.S. Starinets, N.V. Belosludtseva, et al. *Pharmaceutics* 2022, 14, 2336.

Роль кальций-проницаемых AMPA и каинатных рецепторов в пластичности

Долгачева Л.П.^{1*}, Зинченко В.П.¹
¹Институт биофизики клетки РАН;
 dolgacheva@mail.ru

Глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером мозга млекопитающих и действует через ионотропные (NMDA, AMPA, KA) и метаботропные (mGlu) рецепторы. Ионотропные глутаматные рецепторы играют центральную роль в развитии клеток и регуляции синаптической пластичности - способности синапсов быстро изменять интенсивность передачи в зависимости от активности нейронов. Синаптическая пластичность считается основой процессов обучения и памяти. Кальций-проводящие NMDA-рецепторы играют важную роль в этом процессе. Однако для активации эти рецепторы требуют предварительной деполяризации постсинаптической мембраны с помощью AMPA-рецепторов (AMPA-Rs). AMPARs представляют собой лиганд-управляемые каналы, проницаемые для Na^{+} и K^{+} . Однако определенные подтипы этих рецепторов проницаемы и для Ca^{2+} (CP-AMPA-Rs). Быстрые интернейроны, экспрессирующие CP-AMPA-Rs практически не содержат NMDA рецепторов. Активация CP-AMPA-Rs в этих интернейронах обеспечивает быстрый постсинаптический вход Ca^{2+} , который индуцирует процесс синаптической пластичности (Hainmuller и др., 2014; Lalanne и др., 2016). Вход Ca^{2+} в клетку через CP-AMPA-Rs играет важную роль в синаптогенезе и формировании нейронных сетей во время раннего развития мозга (McDonald and Johnston, 1990; Stubblefield and Benke, 2010). Во взрослом мозге CP-AMPA-Rs в основном локализованы в постсинаптической мембране тормозных нейронов. Во многих работах показано, что модуляторы CP-AMPA-Rs потенцируют пластичность, улучшают память и процесс

обучения, участвуют в генезе нейродегенеративных заболеваний, таких как ишемия, инсульт, судороги. Селективные блокаторы CP-AMPA-рецепторов оказывают нейропротекторное действие и предотвращают гибель нейронов при ишемии. С помощью антагонистов CP-AMPA-рецепторов показано, что в индукции долговременной потенциации (LTP) в гиппокампе участвуют не только NMDA рецепторы, но и CP-AMPA-рецепторы (Yu и др., 2021) в основном за счет изменения состава рецепторов в синапсах. Количество рецепторов в синапсах регулируется посредством эндоцитоза, экзоцитоза и эндосомальной сортировки. Соотношение транспортируемых Ca²⁺-проницаемых и Ca²⁺-непроницаемых AMPA-рецепторов зависит от синаптической активности. При уменьшении эффективности синаптической передачи при длительной депрессии (LTD) происходит уменьшение количества AMPARs в синапсе за счет транспорта AMPARs в лизосомы и последующей деградациии, тогда как при LTP происходит возврат и увеличение количества AMPARs в синапсах. Перемещение и встраивание CP-AMPA-рецепторов в синаптическую область регулируется фосфорилированием субъединицы GluA1 протеинкиназой PKA и дефосфорилированием фосфатазой PP2B (Guire и др., 2008, Wang и др., 2020). Предполагается, что при гипервозбуждении и во время процессов обучения CP-AMPA-рецепторы транспортируются в синапсы и модифицируют синаптическую пластичность в направлении образования нейронных связей. Показано, что CP-AMPA-рецепторы оказывают более сильное влияние на пластичность, чем NMDARs, благодаря своей способности потенциально независимо повышать концентрацию внутриклеточного Ca²⁺. Тот факт, что в мозге взрослых особей CP-AMPA-рецепторы локализованы в основном в ГАМК-ергических нейронах, которые, как недавно было показано, могут иннервировать другие ГАМК-ергические нейроны, содержащие кальций-проводящие каинатные рецепторы (Zinchenko и др., 2020.), указывает на особую роль этих рецепторов в пластичности ГАМКергических нейронов. Активация CP-AMPA-рецепторов, локализованных в ГАМКергических нейронах, может усиливать Ca²⁺-зависимую секрецию ГАМК и подавлять активность других ГАМКергических нейронов и, таким образом, участвовать в растормаживании нейрональной сети.

Каинатные тетрамерные рецепторы (KARs) образованы двумя различными семействами субъединиц: субъединицами с низким сродством к агонистам (GluK1-GluK3) и субъединицами с высоким сродством к агонистам (GluK4-GluK5). KARs присутствуют как в пре-, так и в постсинаптических мембранах нейронов и играют роль модуляторов нейротрансмиссии и развития нейронов (Chittajallu и др., 1996; MacDermott и др., 1999). KARs играют более сложную роль в синаптической пластичности по сравнению с AMPA-рецепторами, что связано с их локализацией как в пост-, так и в пресинаптических мембранах, где они быстро активируют секрецию ГАМК и других нейромедиаторов на длительный период. Активация пресинаптических CP-KARs приводит к увеличению высвобождения нейротрансмиттера, за счет изменения пресинаптической концентрации Ca²⁺. Таким образом, активация CP-KARs вызывает высвобождение ГАМК из интернейронов, инициируя подавление активности нейронной сети (Sakha и др., 2016).

Столь существенная роль CP-AMPA-рецепторов и CP-KARs ГАМКергических нейронов в модуляции синаптической передачи обусловлена не только кальциевой проводимостью рецепторов, но и их способностью реагировать на возбуждение раньше и быстрее возбуждающих нейронов, что приводит к подавлению гипервозбуждения других нейронов за счет опережающей секреции ГАМК (Zinchenko et al., 2021). Эффект обусловлен повышенной возбудимостью и ослабленным ГАМК(А)-зависимым торможением в ГАМКергических нейронах, содержащих CP-KARs и CP-AMPA-рецепторы (Gaidin et al., 2022). Таким образом, глутаматные CP-KARs и CP-AMPA-рецепторы играют ключевую роль в регуляции высвобождения нейротрансмиттеров и синаптической пластичности ГАМКергических нейронов.

Роль микроРНК в механизмах пластичности ЦНС и перспективы их использования для протекции когнитивных нарушений

Гринкевич Л.Н.^{1*}

¹ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

larisa_gr_spb@mail.ru

Основные трудности изучения молекулярных основ формирования долговременной памяти связаны как с множеством сигнальных систем, интеграция которых необходима для успешного обучения, так и многообразием регуляторных процессов, взаимодействующих на уровне генома. К последним относится регуляция экспрессии генов посредством ДНК-связывающих транскрипционных факторов, а также эпигенетические модификации, регулирующие структуру хроматина, или биогенез матричных РНК (мРНК) посредством микроРНК. МикроРНК привлекают повышенное внимание исследователей в связи с их важным значением для развития нервной системы, формирования синаптической пластичности и долговременной памяти, а также высоким потенциалом для терапии заболеваний связанных с когнитивными нарушениями [1]. Кроме того, микроРНК выходя во внеклеточное пространство могут служить межклеточными коммуникаторами и потенциально биомаркерами

для диагностики болезней. МикроРНК это высоко консервативные, небольшие эндогенные РНК, способные подавлять до 70% мРНК, кодирующих белки. При этом одна микроРНК способна регулировать экспрессию целой сети генов (часто несколько десятков) и соответственно ее дисфункция может вызывать большой полигенный эффект. Наибольшее количество микроРНК экспрессируется в ЦНС, причем спектр экспрессии различается в разных структурах и клеточных элементах мозга, а биогенез регулируется нейронной активностью. В связи с вышесказанным, а также учитывая значительную сложность устройства ЦНС, функции микроРНК изучены еще очень фрагментарно.

Важную роль в исследовании эпигенетических процессов в механизмах пластичности играют животные с относительно простым устройством ЦНС, в частности моллюски. Мы используем выработку условного рефлекса пищевой аверзии у моллюска *Helix* в основе которого лежит изменение эффективности синаптической передачи между нейронами, лежащими в сети данного рефлекса. Нами показано, что в формирование данного рефлекса вовлекаются как микроРНК потенциально необходимые для блокады мРНК, негативно влияющих на механизмы пластичности, так и микроРНК вовлекаемые в деблокаду генов необходимых для пластических перестроек. Дальнейшие исследования, проведенные совместно с сотрудниками ИЦИГ и НЦИиВТ СО РАН, показали, что при обучении *Helix* дифференциально экспрессируется несколько десятков различных консервативных микроРНК причем у половин микроРНК экспрессия растет, а у другой подавляется [2]. Среди зарегистрированных нами микроРНК имеется несколько гомологов участвующих в формировании ДП у позвоночных и человека. Кроме того, мы осуществили сравнительный анализ экспрессии микроРНК у хорошо обучающихся и плохо обучающихся животных с дисфункцией серотонинергической системы подвергнутых процедуре обучения. Эти исследования позволили подтвердить важную роль в формировании ДП нескольких семейств микроРНК, в том числе семейства MIR-10 наиболее представленного в ЦНС *Helix*, семейств MIR-33, MIR-133, MIR-153, а также показать важную роль серотонинергической системы в регуляции экспрессии микроРНК [2]. Изменение метаболизма ряда микроРНК у животных с дисфункцией серотонинергической системы наряду с эпигенетическими изменениями в структуре хроматина и модификацией транскрипционных факторов, через нарушение экспрессии нижележащих генов могут лежать в основе нарушения долговременной памяти, связанной с оборонительным поведением у *Helix*. Наши данные о вовлечении в формирование долговременной памяти у *Helix* ряда консервативных микроРНК играющих важную роль в механизмах пластичности разных видов животных, в том числе позвоночных, подтверждают и расширяют идею о том, что молекулярный механизм, участвующий в формировании долговременной памяти, включая эпигенетическую маркировку, является консервативным явлением в ходе эволюции. Разработка различных моделей обучения в том числе с когнитивными нарушениями на разных видах животных, применение новейших технологий редактирования генома и эпигенома позволяет надеяться на прогресс в этой сложнейшей области исследований. Последние достижения в этой области, а также перспективы применения микроРНК в качестве целевых мишеней для улучшения когнитивных нарушений связанных с дисфункцией микроРНК при нейродегенеративных, неврологических и возрастных дисфункциях будут обсуждены в докладе. Оптимизм в данной области связан с появлением технологий редактирования геномов CRISPR/Cas направленных на РНК [3].

Работа поддержана Государственной программой ГП-47 «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019-2030 гг.), тема 0134-2019-0004.

1. Л.Н. Гринкевич. Роль микроРНК в обучении и долговременной памяти. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020. Т. 24. №8. Стр. 885-896. DOI 10.18699/VJ20.687.

2. Ovchinnikov, V.Y.; Lisachev, P.D.; Bondar, N.P.; Grinkevich, L.N. The Expression of miRNAs Involved in Long-Term Memory Formation in the CNS of the Mollusk *Helix lucorum*. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 301. <https://doi.org/10.3390/ijms24010301>

3. Л.Н. Гринкевич. 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.

Роль микробиоты при нейродегенерации

Соболь К.В.^{1*}
¹ИЭФБ РАН;
peep9@yandex.ru

Функциональное взаимодействие желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и центральной нервной системы (ЦНС) включает в себя вегетативную нервную систему (ВНС), энтеральную нервную систему (ЭНС), иммунную и нейроэндокринную системы [1-4]. Одну из центральных ролей в этом взаимодействии играет микробиота ЖКТ. Причем, микробиота помимо полезных веществ, может синтезировать амилоидные белки, липополисахариды, эндотоксины и другие активные вещества, которые могут стимулировать амилоидоз в ЦНС,

а также воспалительные реакции, способствующие развитию и/или прогрессированию нейродегенеративных заболеваний [4-8].

Большое количество молекул амилоида, синтезированных микробиотой, с возрастом увеличивает доступность амилоида в центральной нервной системе [9]. Причем, амилоиды микробиоты (курли, A β 2 и др.) способны активировать Толл рецепторы (TLR2/TLR1) и участвовать в провоспалительных реакциях [10]. Микробные амилоиды и липополисахариды являются значительными активаторами воспалительных реакций, индуцируя высвобождение соответствующих цитокинов и активируя белки комплемента. В результате меняется проницаемость сосудов и генерируются свободные радикалы, тем самым, стимулируя процессы амилоидообразования. Эти патологические процессы являются характерными для болезни Альцгеймера. Остаётся выяснить, какой процент микробных молекул амилоида содержится в сенильных бляшка пациентов с болезнью Альцгеймера. Какова эволюция амилоидообразования, связанная с микробиотой, и как она видоизменяется с возрастом.

Существуют данные, что цианобактерии микробиоты кишечника могут продуцировать избыток нейротоксина бета-метиламино-L-аланина (BMAA) [11], повышенные концентрации которого были обнаружены в головном мозге пациентов с боковым амиотрофическим склерозом, болезнью Паркинсона и Альцгеймера [9, 13].

В настоящее время всё большее признание находит точка зрения, что патогенные микробы вносят потенциальный вклад в старение организма и, возможно, в развитие нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезнь Альцгеймера [14, 15]. Следует отметить, что большинство изменений, наблюдаемых при болезни Альцгеймера, таких как воспалительные реакции, атрофия клеток головного мозга, амилоидоз, когнитивные нарушения и т.п. могут быть также следствием микробной инфекции.

Недавно на стерильных генетически модифицированных мышах, с искусственно воспроизведенной болезнью Паркинсона (с повышенной экспрессией альфа-синуклеина) было продемонстрировано, что микробиота может стимулировать синуклеопатию, нейровоспаление и характерную двигательную дисфункцию [16]. Были также идентифицированы микробные метаболиты, которые могут участвовать в развитии болезни Паркинсона [16].

В настоящее время идут исследования в отношении применения пробиотиков и питательных продуктов для профилактики и возможного лечения заболеваний ЦНС, которые могут активировать нейроэндокринные, нейроиммунные и гуморальные механизмы [9]. Например, существуют данные о влиянии пробиотиков и различных пищевых ингредиентов на развитие заболевания рассеянного склероза [17], на когнитивные процессы [18], а также на психические расстройства, включая беспокойство, аутизм, депрессию и шизофрению [9, 19].

ЛИТЕРАТУРА

1. Heijtz R.D., et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011. Vol. 108. P. 3047–52.
2. Aziz Q., et al. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. // *Neurogastroenterol Motil*. 2013. Vol. 25. P. 4–15.
3. Forsythe P., et al. On communication between gut microbes and the brain. // *Curr Opin Gastroenterol*. 2012. Vol. 28. P. 557–62.
4. Schwartz K., Boles B.R. Microbial amyloids-functions and interactions within the host. // *Curr Opin Microbiol*. 2013. Vol. 16. P. 93–9.
5. Douglas-Escobar M., et al. Effect of intestinal microbial ecology on the developing brain. // *JAMA Pediatr*. 2013. Vol. 167. P. 374–9.
6. Ball M.J., et al. Intracerebral propagation of Alzheimer's disease: strengthening evidence of a herpes simplex virus etiology. // *Alzheimers Dement*. 2013. Vol. 9. P. 169–75.
7. Derkinderen P., et al. Parkinson disease: the enteric nervous system spills its guts. // *Neurology*. 2011. Vol. 77. P. 1761–7.
8. Hill J.M., et al. The gastrointestinal tract microbiome and potential link to Alzheimer's disease. // *Front Neurol*. 2014. Vol. 5. P. 43.
9. Bhattacharjee S., Lukiw W. J. Alzheimer's disease and the microbiome. // *Front. Cell. Neurosci*. 2013. Vol. 7. P. 153.
10. Hill J.M., Lukiw W.J. Microbial-generated amyloids and Alzheimer's disease (AD). // *Front Aging Neurosci*. 2015. Vol. 7. P. 9.
11. Brenner S.R. Blue-green algae or cyanobacteria in the intestinal micro-flora may produce neurotoxins such as Beta-N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) which may be related to development of amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease and Parkinson-Dementia-Complex in humans and Equine Motor Neuron Disease in horses. // *Med Hypotheses*. 2013 Vol. 80(1). P. 103.
13. Lobner D., et al. Beta-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol Dis*. 2007. V. 25(2). P. 360-6.
14. Miklossy J. Emerging roles of pathogens in AD. // *Expert Rev. Mol. Med*. 2011. Vol. 13:e30.

15. Cho I., Blaser M.J. The human microbiome: at the interface of health and disease. // Nat. Rev. Genet. 2012. Vol. 13, 260–270.
 16. Sampson T.R., et al. Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. // Cell. 2016. Vol. 167(6). P. 1469-1480.
 17. von Geldern G., Mowry E.M. The influence of nutritional factors on the prognosis of multiple sclerosis. // Nat. Rev. Neurol. 2012. Vol. 8. P. 678–689.
 18. Camfield D.A., et al. Dairy constituents and neurocognitive health in ageing. Br. J. Nutr. 2011. Vol. 106. P. 159–174.
 19. Bravo J.A., et al. Communication between gastrointestinal bacteria and the nervous system. Curr. Opin. Pharmacol. 2012. Vol.12. P. 667–672.
- Работа выполнена по госзаданию No. 075-00967-23-00

Роль микровязкости цитоплазматической мембраны опухолевых клеток при химиотерапевтическом воздействии

Шимолина Л.Е.^{1*}, Хлынова А.Э.¹, Дружкова И.Н.¹, Игнатова Н.И.¹, Загайнова Е.В.², Куимова М.К.³, Ширманова М.В.¹

¹НИИ ЭО и БМТ ПИМУ Минздрава России;

²Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия;

³Имперский колледж Лондона, Великобритания;

shimolina.l@mail.ru

Микровязкость мембран играет важную роль в клеточной биофизике, контролируя скорость диффузии и транспорта, активность многих ферментов и рецепторов. Изменение значения микровязкости и/или липидного состава в живой клетке может сигнализировать о серьёзных нарушениях, в том числе превращении нормальной клетки в раковую. Понимание роли микровязкости мембраны в ответе опухолевых клеток на химиотерапию важно, так как клеточная мембрана активно участвует в транспорте лекарственных средств. Недавние исследования позволяют предположить, что ответ опухоли на химиотерапию определяется не только взаимодействием препарата с первичной мишенью (например, ДНК), но может включать в себя множественные физиологические и физико-химические изменения. Особый интерес представляет изучение свойств цитоплазматических мембран опухолевых клеток и изменений, которые развиваются при проведении противоопухолевой терапии. Изучение влияния химиотерапевтических препаратов на вязкость живых клеток важно для лучшего понимания механизмов действия препаратов и оценки эффективности терапии.

Настоящая работа направлена на изучение микровязкости плазматической мембраны раковых клеток с использованием флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 и флуоресцентной микроскопии времени жизни FLIM при химиотерапии препаратами платины.

Исследование проведено на культивируемых раковых клетках СТ26 (колоректальный рак мыши), НСТ116 (колоректальный рак человека) и устойчивой к оксалиплатину клеточной линии - НСТ116-OXAR. Исследования на животных проводили на мышцах линий Balb/c и nu/nu с подкожно трансплантированными опухолями. Время жизни флуоресценции молекулярного ротора регистрировали с помощью конфокального микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного модулем FLIM на основе TCSPC (Becker&Hickl Inc., Германия). Микровязкость измеряли в плазматических мембранах отдельных клеток с использованием флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY2 (возб. 850 нм, рег. 500–550 нм). На клетки воздействовали цисплатином (Teva, Израиль) в дозе 2,6 мкМ (IC50) для СТ26 и оксалиплатином (Teva, Израиль) в дозе 4,0 мкМ (IC50) для НСТ116. Для исследования химического состава липидов использовали времяпролетную масс-спектрометрию вторичных ионов на приборе ToF-SIMS 5 (ION-TOF GmbH, Германия). Для каждого образца было получено 12 масс-спектров в режиме как положительных и отрицательных ионов. Выход вторичных ионов липидов рассчитывали как интенсивность соответствующего липидного пика, нормированную на общее количество ионов.

Были разработаны методики оценки микровязкости мембран живых опухолевых клеток для моделей с различной организацией: монослойных клеточных культур, сфероидов и подкожных опухолей мышечей. Впервые нами было продемонстрировано, что микровязкость мембран можно измерить в подкожных опухолях *in vivo* с субклеточным разрешением, используя FLIM с чувствительным к вязкости водорастворимым молекулярным ротором BODIPY2.

В ходе работы зарегистрировано значительное увеличение микровязкости мембран жизнеспособных клеток СТ26 через 24 ч после инкубации с цисплатином с 322 ± 21 сП до 400 ± 27 сП. Инкубация клеток НСТ116 с оксалиплатином так же приводила к повышению микровязкости мембран с 437 ± 77 сП до 593 ± 139 сП после

24 ч инкубации с химиопрепаратом. Данные хорошо согласуются между собой на разных моделях, дозозависимого эффекта не выявлено. С помощью метода масс-спектрометрии ToF-SIMS обнаружено увеличение количества холестерина и снижением содержания ненасыщенных жирных кислот в мембранах через 24 ч.

Для проверки полученных эффектов на вязкость мембраны был проведен анализ изменения микровязкости в химиорезистентных клетках НСТ116-OXAR под действием оксалиплатина. Инкубация с оксалиплатином не повлияла на микровязкость мембран, значения составили ~450 сП. Мы предполагаем, что зарегистрированное повышение микровязкости мембран на поздних сроках инкубации с платиносодержащими препаратами (24 ч) является частью ответа опухолевой клетки на воздействие и не связано с непосредственным взаимодействием препарата с мембраной.

Проведенное исследование расширяет понимание механизмов ответа опухоли на лечение и действия химиопрепаратов, что важно для поиска новых противоопухолевых мишеней и способов мониторинга эффективности терапии. Полученные данные могут быть полезны при разработке новых видов противоопухолевого лечения и усовершенствования уже существующих. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда в рамках гранта № 23-74-00045.

Роль монооксида углерода в регуляции ноцицептивной активности периферического отдела тройничного нерва

Королева К.С.^{1*}, Свитко С.О.¹, Ананьев А.С.¹, Верхотурова Т.М.¹, Буглинина А.Д.¹, Ситдикова Г.Ф.¹
¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;
k.s.koroleva@yandex.ru

Мигрень является широко распространённым нервно-сосудистым заболеванием, характеризующимся сложным патогенезом и трудно поддающимся лечению. В связи с этим актуальным является исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе возникновения боли, для поиска новых методов профилактики и лечения мигрени. Тригеминально-сосудистая система (система тройничного нерва) рассматривается как источник болевого сигнала при мигрени. Клинические и доклинические исследования демонстрируют повышенную возбудимость тригеминально-сосудистой системы во время приступов мигрени. Согласно тригемино-васкулярной теории патогенеза мигрени, в которой объединены нейрональные и сосудистые механизмы развития мигрени, нарушение взаимодействия между черепными сосудами, тройничным нервом и ЦНС приводит к развитию асептического нейрогенного воспаления оболочек головного мозга, провоцирующего ноцицептивную активность. Важную роль в этом процессе отводят тройничному нерву, как инициатору нейрогенного воспаления, с одной стороны, и проводнику ноцицептивной информации в ЦНС, с другой. Нейроны и афференты тройничного ганглия, а также тучные клетки, экспрессируют различные рецепторы и каналы, участвующие в восприятии повреждающего стимула и проведении ноцицептивной информации в ЦНС.

Недавно, в результате генетического анализа пациентов с мигренью была показана значимая роль мутации фермента синтеза СО гемоксигеназы в патогенезе данного заболевания. Монооксид углерода (СО) — это эндогенно продуцируемый сигнальный газотрансмиттер, участвующий в ноцицепции, нейротрансмиссии и церебральной гемодинамике. Однако, нейрональные механизмы участия СО в развитии мигрени практически не изучены. В связи с этим, целью нашей работы являлось выявление роли монооксида углерода (СО) в ноцицептивной активности афферентов тройничного нерва крысы.

Эксперименты проводились на самцах (4–8 нед.) крыс линии Wistar. В работе использовали электрофизиологический метод регистрации потенциалов действия (ПД) тройничного нерва, иннервирующего твердую мозговую оболочку в препарате полуживотной крысы.

В нашем исследовании мы применяли донор СО, CORM-2 в концентрации 30 мкМ, блокатор СО, цинк протопорферин (ZnPP) в концентрации 10 мкМ, а также физиологический раствор, насыщенный СО.

Замена физиологического раствора, насыщенного O₂, обычно используемого нами при проведении экспериментов, на физиологический раствор, насыщенный СО с инкубацией препарата в течение 30 мин привела к достоверному увеличению частоты ПД в два раза (в контроле частота составила 213.1±37.9 ПД за 5 мин; после добавления частота составила – 494.3±64.6 ПД за 5 мин; n=9; p = 0.009).

Использование химического донора СО, CORM-2 (30 мкМ), также приводило к увеличению частоты ПД. В контроле частота составила 126.3±35.5 ПД за 5 мин; после аппликации CORM-2 на пятой минуте частота составила – 280.3±36.5 ПД за 5 мин; на 10 минуте – 251.2±28.5 ПД за 5 мин; на 15 минуте – 217.6±28.5 ПД за 5 мин (n=4; p = 0.04).

Блокатор синтеза эндогенного СО, цинк протопорферин, ZnPP (10 мкМ), не влияет на частоту ПД в афферентах тройничного нерва. В контроле частота составила 141.25±43.9 ПД за 5 мин; после аппликации ZnPP

на пятой минуте частота составила – 195.6 ± 72.5 ПД за 5 мин; на 10 минуте – 201.6 ± 66.6 ПД за 5 мин; на 15 минуте – 125.6 ± 40.9 ПД за 5 мин ($n=5$). Полученные данные свидетельствует о том, что ферментные системы синтеза эндогенного СО не вносят вклад в базовую электрическую активность в афферентах тройничного нерва. Кроме того, нами было показано, что донор СО увеличивает ноцицептивную активность афферентов тройничного нерва, а для дальнейшего исследования рецепторных механизмов формирования ноцицептивной активности целесообразно использовать донор СО CORM-2.

Согласно литературным данным, механизмы действия СО могут быть связаны с активацией растворимой гуанилатциклазы (рГЦ). Действительно, нами было показано, что использование ингибитора рГЦ ODQ в концентрации 10 мкМ приводит к снижению про-ноцицептивного эффекта СО. Инкубация препарата в ODQ в течение 20 мин не приводила к изменениям частоты ПД ($n=4$; $p = 0.87$). Базовая частота ПД в тройничном нерве составила 187.5 ± 86.2 ПД за 5 мин и 172.5 ± 30.1 ПД за 5 мин после 20 минутной инкубации в ODQ (10 мкМ) ($n=4$; $p = 0.87$). Последующее добавление CORM-2 (30 мкМ) не вызывало достоверного изменения частоты ПД и к 10 мин аппликации частота ПД составила 145.2 ± 47.3 ПД за 5 мин и к 15 мин 129.7 ± 50.8 ПД за 5 мин ($p = 0.62$); 20 мин 127.1 ± 40.3 ПД за 5 мин ($n=4$; $p = 0.12$).

Полученные нами данные свидетельствуют о ведущей роли гуанилатциклазы в эффектах СО. Активация гуанилатциклазы приводит к синтезу цГМФ и активации протеинкиназы G, которая через процессы фосфорилирования может влиять на активность ионных каналов, рецепторов и играет важную роль в гомеостазе Ca^{2+} . Кроме того, стимуляция растворимой гуанилатциклазы с помощью VL-102 непосредственно может повышать экспрессию и высвобождение CGRP из нейронов тройничного ганглия. Участие гуанилатциклазы в про-ноцицептивных эффектах подтверждается также исследованиями, в которых ODQ оказывал антиноцицептивные эффекты после интратекальной инъекции в моделях воспалительной и нейропатической боли.

Полученные нами данные вносят вклад в понимание нейрональных механизмов участия СО в патогенезе мигрени, что в дальнейшем может играть роль для разработки специфических лекарственных средств, направленных на терапию мигрени.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ МК-4584.2022.1.4.

Роль нитроергической системы в механизмах повреждения мозга, вызванного длительным воздействием пестицида ротенона

Башкатова В.Г.^{1*}

¹*Институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина;*
v.bashkatova@nphys.ru

В современных условиях организм человека испытывает значительные нагрузки, связанные с быстро увеличивающимся количеством неблагоприятных факторов окружающей среды. Последние включают растущее использование генетически модифицированных (ГМ) продуктов. Известно, что ГМ-растения теряют чувствительность к пестицидам, поэтому значительное количество пестицидов, накопленных ГМ-растениями, может поступать в организм человека с пищей. В последнее время появились публикации, связывающих повышенное распространение болезни Паркинсона (БП) у работников сельского хозяйства с постоянным контактом с пестицидами. Ротенон (ингибитор митохондриального комплекса I) является одним из наиболее часто применяемых пестицидов широкого спектра действия. Обнаружено, что ротенон обладает способностью избирательно повреждать дофаминергические нейроны мозга [1]. В недавних сообщениях показано, что оксид азота (NO) принимает участие в формировании дофаминергической нейротоксичности [2;3]. Вместе с тем несмотря на значительное количество исследований, возможное участие NO в механизмах развития нейродегенеративных процессов подтверждается главным образом работами, в которых используются вещества - анализаторы (метаболические предшественники/доноры NO или ингибиторы NO-синтазы), а также косвенные методы определения NO (содержание нитратов/нитритов и др.). В нашей работе для определения NO мы использовали метод прямого электронного парамагнитного резонанса, разработанный проф. А.Ф. Ваниным [4;5]. Целью данной работы явилось изучение роли нитроергической системы мозга при многократном длительном введении низкой дозы пестицида ротенона.

В результате работы установлено, что при остром введении ротенона в широком диапазоне доз (дозах 1 мг/кг, 2 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг) не отмечалось нарушений в поведении животных, которое регистрировали в тесте каталепсия. Однократное воздействие указанных доз пестицида не приводило и к изменению содержания NO в структурах мозга крыс. Только через 20 дней после ежедневного введения ротенона в дозе 2 мг/кг было обнаружено достоверное увеличение образования NO в стриатуме мозга крыс. При этом признаков каталепсии у этих животных не наблюдалось. На 30-й день введения пестицида у крыс появились признаки акинезии в тесте каталепсии. Наряду с этим в стриатуме и коре мозга крыс также наблюдалось заметное увеличение образования

NO. После 60 инъекций ротенона в дозе 2 мг/кг максимальные значения NO были обнаружены в стриатуме, который принято рассматривать как одну из главных дофаминергических структур мозга. В этот же срок у крыс были отмечены выраженные признаки устойчивой каталепсии. Предварительное введение селективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы аминогуанидина в значительной степени предупреждало вызванное ротеноном повышение уровня NO в структурах мозга крыс на 50-й и 60-й дни введения препарата. В эти сроки аминогуанидин также уменьшал интенсивность каталепсии, обусловленной длительным введением пестицида.

Таким образом, в результате работы показано, что длительное воздействие низкой дозы пестицида ротенона приводит к развитию паркинсонизма и усилению генерации NO в стриатуме и коре мозга крыс. В результате наших исследований установлено, что подъем уровня NO в стриатуме предшествовал появлению первых признаков каталепсии. Эти данные свидетельствуют о прогностическом значении определения параметров нитроергической системы мозга при развитии нейродегенеративных процессов. Полученные данные свидетельствуют о том, что нитроергическая система мозга является одной из важнейших функциональных систем организма, обеспечивающей регуляторные процессы организма и поддержание гомеостаза в условиях воздействия экологически неблагоприятных факторов окружающей среды.

Литература

1. Alam M., Schmidt W.J. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res.* 2002, V.136, №1, P.317-324.
2. Fricks-Gleason A.N., Keefe K.A. Evaluating the role of neuronal nitric oxide synthase-containing striatal interneurons in methamphetamine-induced dopamine neurotoxicity. *Neurotox Res.* 2013, V.24, P.288-297.
3. Bashkatova V. Metabotropic glutamate receptors and nitric oxide in dopaminergic neurotoxicity *World J Psychiatry.* 2021, V.11, №10, P. 830-840.
4. Vanin A.F., Huisman A., van Faassen E.E. Iron dithiocarbamate as spin trap for nitric oxide detection: pitfalls and successes. *Methods Enzymol.* 2002, V.359, P.27-42.
5. Bashkatova V., Kraus M.M., Vanin A., et al. 7-nitroindazole, nNOS inhibitor, attenuates amphetamine-induced amino acid release and nitric oxide generation but not lipid peroxidation in the rat brain. *J Neural Transm (Vienna).* 2005, V.112, №6, P.779-788.

Свободные радикалы и трансдукция сигналов в клетках

Мартинович Г.Г.^{1*}, Мартинович И.В.¹, Войнаровский В.В.¹

¹Белорусский государственный университет;

martinovichgg@mail.ru

Образование свободных радикалов в клетках индуцируется при действии многих физических и химических факторов, включая ионизирующие и неионизирующие излучения, механические растяжения, изменения температуры, наноматериалы и др. Первоначально образование свободных радикалов в организме связывалось с развитием хронических и дегенеративных заболеваний. В настоящее время показано участие свободно-радикальных продуктов метаболизма кислорода в регуляции широкого спектра биохимических и физиологических процессов, включая регенеративные и адаптационные процессы, дифференцировку клеток и апоптоз [1]. При трансдукции сигналов в клетках с участием свободных радикалов (редокс-сигнализации) в серии электрон-транспортных процессов происходит направленный перенос электронов от белков к кислороду, что изменяет конформацию и активность биологических молекулярных «машин». Однако принципы записи и считывания информации в клетках, реализующиеся с участием свободных радикалов, еще до конца не изучены. Во многом это обусловлено грандиозной сложностью информационных процессов, в которые вовлечены внутриклеточные окислители и восстановители.

Трансдукция регуляторного редокс-сигнала осуществляется не отдельной молекулой-мессенджером, а группой взаимодействующих окислителей и восстановителей, образующих электрон-транспортные цепи [2,3]. Увеличение содержания окислителей в результате нарушения редокс-сигнальных процессов вызывает целый комплекс патологических процессов и ответных реакций клетки, ведущих к развитию окислительного стресса и патологии. С другой стороны, нарушение редокс-сигнализации в результате повышения внутриклеточной концентрации восстановителей обуславливает развитие такого патофизиологического состояния как восстановительный стресс.

Регуляция необходимого баланса между окислителями и восстановителями (редокс-гомеостаза) в клетках млекопитающих осуществляется фактором транскрипции Nrf2, активность которого контролируется с участием редокс-зависимого белка Keap1 [4]. В нормальных условиях Keap1 нековалентно связывает Nrf2, что обуславливает направленный транспорт и деградацию белка в протеасоме 26S. Умеренный окислительный стресс и электрофильные агенты нарушают взаимодействие Nrf2-Keap1, в результате Nrf2 активирует транскрипцию сотен генов, участвующих в защите клеток и адаптации к окислительному стрессу. Ключевая

роль системы Keap1-Nrf2 в адаптации клеток при стрессовых воздействиях позволяет рассматривать ее в качестве потенциальной мишени для терапии широкого спектра заболеваний [5,6]. Однако при превышении определенного порога активации Nrf2 запускается экспрессия генов, продукты которых способствуют развитию окислительного стресса и последующей гибели клеток [7]. Таким образом, регуляция свободнорадикальных процессов в клетках осуществляется сложной сетью взаимодействий между окислителями и восстановителями, определяющей специфичность ответа биологической системы.

Количественная характеристика уникальной сети взаимодействий, определяющей видо- и индивидуальные особенности редокс-гомеостаза, является необходимым этапом для создания подходов дифференциации физиологических и патофизиологических процессов с участием свободных радикалов. Задача состоит в выработке новых понятий и физических моделей, которые в законченном виде в настоящее время не существуют. Одной из ключевых проблем является установление фундаментальных физико-химических механизмов, определяющих взаимодействие структурных компонентов в сетевых процессах регуляции редокс-гомеостаза.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант №Б22-045 и №Б23РНФ-093) и Российского научного фонда (грант №23-45-10026).

1. Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation // *Cell. Physiol. Biochem.* 2001. Vol. 11. P. 173–186.

2. Jones D.P. Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signaling // *J. Intern. Med.* 2010. Vol. 268. P. 432–448.

3. Martinovich G.G., Martinovich I.V., Cherenkevich S.N. Redox regulation of cellular processes: A biophysical model and experiment // *Biophysics.* 2011. Vol. 56, No. 3, P. 444–451.

4. Zenkov N.K., Chechushkov A.V., Kozhin P.M., Kandalintseva N.V., Martinovich G.G., Menshchikova E.B. Mazes of Nrf2 Regulation // *Biochemistry (Moscow)*, 2017. Vol. 82, No. 5, P. 556–564.

5. Martinovich G.G., Martinovich I.V., Vcherashniaya A.V., Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Cherenkevich S.N. Chemosensitization of Tumor Cells by Phenolic Antioxidants: The Role of the Nrf2 Transcription Factor. // *Biophysics.* 2020. Vol. 65, N. 6. pp. 920–930.

6. Ulasov A.V., Rosenkranz, A.A., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation // *Life Sciences.* 2021. Vol. 291. P. 120111.

7. Zucker S.N., Fink E.E., Bagati A., Mannava S., Bianchi-Smiraglia A., Bogner P.N., Nikiforov M.A. Nrf2 amplifies oxidative stress via induction of Klf9 // *Mol. Cell.* 2014. Vol. 53. P. 916–928.

Синтез и применение наночастиц карбоната кальция для комбинированной терапии онкологических заболеваний

Якубова А.А.^{1,2*}, Дарвиш А.¹, Митусова К.А.¹, Ахметова Д.Р.¹, Тимин А.С.¹

¹Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого;

²Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет РАН;
yakubova.nastya@bk.ru

Оптимизация существующих протоколов лечения, а также использование персонализированного подхода к назначению терапии пациентам с злокачественными новообразованиями являются одними из приоритетных направлений в здравоохранении. Разработка новых лекарственных форм направленной доставки химиопрепаратов и фотосенсибилизаторов для комбинированной терапии позволит существенно повысить эффективность лечения и улучшить качество жизни пациентов, страдающих онкологическими заболеваниями.

Таким образом, в области лечения раковых заболеваний существует потребность в разработке инновационных подходов создания лекарственных форм для повышения эффективности терапии. Так, развитие нанотехнологий позволило расширить возможности терапии онкологических заболеваний путем воздействия на организм на клеточном и субклеточном уровнях. Основными агентами в данной области являются наночастицы, имеющие высокий потенциал в области диагностики и терапии широкого спектра заболеваний за счет размеров, благодаря которым они могут циркулировать по организму и возможности инкапсуляции в них различных лекарственных препаратов или их комбинаций.

Таким образом, необходимо создать наноносители для системного введения, позволяющие инкапсулировать и комбинировать лекарственные препараты, защищать их от внешнего воздействия, а пролонгированное высвобождение лекарственного препарата из наночастиц позволяет циркулирующим наносистемам скапливаться в очагах заболевания и, следовательно, достигать необходимой терапевтической дозы при меньших исходных дозировках. Для этого они должны обладать рядом важных свойств: устойчивость,

нетоксичность, биодоступность. При этом размер этих частиц не должен превышать 100 нм, чтобы свободно распространяться по организму и накапливаться в необходимых точках.

Таким образом, были созданы кальций карбонатные частицы, стабилизированные органическим агентом полиакриловой кислотой, диапазон размеров которых составляет от 80 до 110 нм. Далее анализировалась стабильность частиц в трех разных средах с различными рН (4.1, 6.2, 10.1) в течение 24 часов на оборудовании DLS Malvern. Форма и структура частиц изучалась на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) и просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ). Частицы являются стабильными в широком диапазоне рН, незначительно изменяя свой размер в сильно кислой и сильно щелочной среде.

В качестве препаратов для комбинированной терапии использовались фотодинамический препарат «Радохлорин», при облучении лазером выделяющий синглетный кислород, губительный для раковых клеток, а также цитостатик «Доксорубин». Лекарственные препараты инкапсулировались адсорбцией по-отдельности в наночастицы, и изучалось количество высвобожденного терапевтического агента во времени. Для этого строились градуировочные графики зависимости оптической плотности от концентрации лекарственного вещества в линейном диапазоне. Затем вещества инкапсулировались в наночастицы адсорбцией, после чего через некоторое время частицы осаждали и брали надосадочную жидкость, которую анализировали на количество вещества. И так повторяли в течение определенных промежутков времени. Таким образом, удалось изучить время полного высвобождения доксорубина и радаохлорина из наночастиц карбоната кальция, а также рассчитать адсорбционную емкость частиц, которая составила 16.7% по формуле

(общее количество добавленного препарата(мг)-количество несвязанного препарата над осадком(мг)*100)/(масса частиц(мг) + количество общего препарата(мг) – количество несвязанного препарата(мг))

При этом эффективность инкапсуляции препарата, рассчитанная по нижеследующей формуле, составила более 90%.

(общее количество добавленного препарата(мг) – количество несвязанного препарата над осадком(мг))/(общее количество добавленного препарата(мг))

Таким образом, полученная информация позволяет планировать дальнейшую терапию: количество, необходимое для инкапсуляции для создания терапевтической дозы, а также благодаря кривым высвобождения, расчет времени, за которое концентрация лекарственных препаратов в организме будет максимальна.

ЛИТЕРАТУРА

Biodegradable Nanoparticles of Polyacrylic Acid–Stabilized Amorphous CaCO₃ for Tunable pH-Responsive Drug Delivery and Enhanced Tumor Inhibition / C. Xu, Y. Yan, J. Tan [et al.] // *Advanced Functional Materials*. — 2019. — V. 29. – 24. P. 1808146

Multifunctional microcapsules: A theranostic agent for US/MR/PAT multi-modality imaging and synergistic chemo-photothermal osteosarcoma therapy / H. Wang, S. Xu, D.Fan [et al.] // *Bioactive Materials* — 2022 — V. 7. – P. 453-465

Благодарность: работа была выполнена при поддержке государственного задания (FSEG-2022-0012)

Сопоставление свойств нейронов стволовых и корковых отделов слухового пути

Бибиков Н.Г.^{1,2*}

¹АО Акустический институт имени Н.Н.Андреева;

²N.N. Andreyev Acoustcal Institute Moscow, Russia;

nbibikov1@yandex.ru

В течение многих лет мною осуществлялись электрофизиологические исследования нейронов стволовых отделов слухового пути различных позвоночных животных, а в последние годы, благодаря использованию уникальной установки, разработанной И.Н. Пигаревым, мне совместно с этим, трагически погибшим исследователем удалось провести изучение свойств нейронов слуховой коры бодрствующей и спящей кошки. Это позволяет на основе собственного опыта осуществить сопоставление некоторых свойств нейронов, расположенных в стволовых и в корковых отделах слухового пути.

Нейроны, локализованные в ядрах прямого слухового пути ствола мозга, могут резко отличаться между собой по своим внутренним свойствам. Для многих из них характерно длительное и резкое снижение возбудимости после генерации спайка, которое обусловлено функционированием специфических ионных каналов, и которое феноменологически проявляется как обобщенная рефрактерность. У некоторых других специализированных нейронов (к примеру, клетки-октопусы вентрального кохлеарного ядра) чрезвычайно низкий входной импеданс обуславливает эффективное дифференцирование входного воздействия. В то же время у других нейронов (например, у многих клеток дорсального кохлеарного ядра и заднего двухолмия) постоянная

времени мембраны оказывается настолько большой, что при действии фиксированного синаптического входа ответ нарастает во времени в течение десятков миллисекунд. Столь же разнообразна и сама архитектура синаптических входов на каждый конкретный нейрон. Наблюдаются целые структуры, в которых значительное большинство клеток получают один или только несколько мощных входов из нижележащих отделов слухового пути (сферические клетки антериорного кохлеарного ядра, практически все нейроны ядра трапецевидного тела). У других, нередко близко расположенных клеток присутствует весьма разветвлённая дендритная структура с множеством синапсов. Естественно предположить, что все эти особенности строения отдельных этапов слухового пути обеспечивают осуществление специализированных операций, служащих для подробного описания всех особенностей одномерной временной функции, описывающей изменения давления на входе во внутреннее ухо и прошедшей предварительную частотную и амплитудную фильтрацию во внутреннем ухе. В результате, подробный анализ высокочастотного звукового стимула удастся осуществить с использованием сравнительно инерционных элементов, которыми являются нейроны головного мозга. Представляется, что основная функция этих этапов обработки звука является выявление временных особенностей воспринимаемого сигнала, которые и будут далее использоваться для идентификации сигналов и принятия соответствующих решений. Заметим, что в нейронных сетях слухового пути частотные особенности сигнала представлены также в виде временных взаимоотношений частоты импульсации в разных каналах. При этом, обычно удастся смоделировать реакцию нейрона стволовых отделов слухового пути на новый сигнал, зная его ответы на простые тональные стимулы.

С другой стороны клетки корковых отделов слухового анализатора удивляют однородностью своих внутренних свойств. Среди сотен исследованных клеток я никогда не наблюдал длительного снижения возбудимости, вызванного генерацией спайка. Многие модели корковых клеток просто игнорируют понятие рефрактерности, ограничиваясь кратким сбросом мембранного потенциала на нулевой уровень. Практически у всех нейронов после постспайковой паузы, длящейся всего 1-2 мс, наблюдается участок резко повышенной возбудимости, обуславливающий появление пачковой активности и частично фрактальные свойства точечного импульсного процесса импульсации. По этим параметрам сходными между собой оказываются не только клетки слуховой коры, но и нейроны, располагающиеся в совершенно разных корковых зонах. Однако, если по своим внутренним свойствам корковые нейроны представляются довольно простыми и однородными, этого никак нельзя сказать про их реакции на звуковые стимулы. Последние работы, осуществленные на бодрствующих объектах в отсутствие какой-либо анестезии, убедительно показали крайнюю сложность поведения корковых клеток при действии реальных звуков. Фактически некоторые авторы пришли к заключению о трудности или даже невозможности предсказания реакции исследуемого нейрона на новый сигнал, даже если подробно исследованы его ответы на звуки различных частот. Ясно, что это определяется сложностью архитектуры громадного числа входных синаптических структур.

Такие особенности поведения нейронов коры заставляют пересмотреть принципиальный подход к пониманию работы слухового анализатора. Можно предположить, что корковые клетки, изначально однородные по своим внутренним свойствам, подвергаются обучению в процессе онтогенеза и дальнейшего развития с использованием некоторых алгоритмов обратной связи, которые сами по себе могут быть достаточно простыми. Учитывая, что каждый нейрон коры имеет несколько тысяч синаптических входов, значительное число которых являются пластичными, такая многослойная нейронная сеть может осуществлять эффективный анализ звуковых сигналов в реальном масштабе времени. При этом напрашивается аналогия с глубокими нейронными сетями, которые к настоящему времени блестяще проявили себя в задачах распознавания даже слитной речи. Не исключено, что высказанные соображения относятся и к другим сенсорным системам, имеющим представительство в коре головного мозга.

Способно ли увеличение содержания дейтерия в организме влиять на функционирование щитовидной железы?

Яглова Н.В.^{1*}, Обернихин С.С.¹, Тимохина Е.П.¹, Яглов В.В.¹, Назимова С.В.¹

¹НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского;
yaglova@mail.ru

Дейтерий – стабильный изотоп водорода, содержащийся в организмах в значительных количествах. Исследования показывают, что в организме дейтерий играет важную роль, поскольку обладает способностью регулировать процессы пролиферации, апоптоза и сенесцентности клеток [1-3]. Роль дейтерия в функционировании клеток и органов, и в частности, эндокринных желез мало изучена. В наших предыдущих исследованиях мы установили, что понижение поступления дейтерия в организм уже через сутки вызывает выраженную ответную реакцию щитовидной железы [4].

Целью исследования было выявление изменений в продукции тиреоидных гормонов и гипофизарного контроля тиреоидной функции при выраженном длительном увеличении содержания дейтерия в организме. Эксперимент выполнен на половозрелых самцах крыс Вистар массой 200-220гг (n=20). Животные содержались в виварии при комнатной температуре и получали стандартный лабораторный корм. Изменение содержания дейтерия в организме крыс опытной группы (n=10) достигалось путем потребления вместо водопроводной воды с повышенным содержанием дейтерия [D]=500000 ppm (ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ "Курчатовский институт") в течение 21 сут. Контрольная группа (n=10) потребляла дистиллированную воду с содержанием дейтерия [D]=146ppm, что соответствует его содержанию в водопроводной воде. Содержание общих и свободных фракций тиреоидных гормонов определяли в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа.

У крыс контрольной группы отмечалось увеличение массы тела к 21-м суткам эксперимента. У крыс, потреблявших воду с повышенным содержанием дейтерия, отмечался меньший прирост массы, которая на 21-е сутки была статистически значимо меньшей, чем у крыс контрольной группы. Через сутки у крыс отмечалось усиление продукции тироксина и закономерное снижение секреции тиреотропного гормона. В дальнейшем продукция тиреоидных гормонов продолжала усиливаться, и к 7-м суткам наступила ее нормализация. Однако уровень тиреотропного гормона сохранялся пониженным. На 14-е сутки выявлено значительное уменьшение концентрации всех тиреоидных гормонов и тиреотропного гормона. К 21-м суткам продукция гормонов щитовидной железой нормализовалась, а также восстановилась работа принципа обратной связи, что проявлялось снижением секреции тиреотропного гормона в ответ на повышение продукции тиреоидных гормонов. Наблюдаемые изменения указывали на чувствительность клеток щитовидной железы к содержанию дейтерия. Она была более высокой, чем гипоталамо-гипофизарного комплекса. Увеличение содержания дейтерия в системном кровотоке оказывало стимулирующее воздействие на секреторные процессы в щитовидной железе, а затем приводило к снижению секреции тиреотропного гормона гипофизом и развитию транзиторного гипотиреоза. Нормализация продукции гормонов и гипофизарного контроля активности щитовидной железы свидетельствовала о том, что дейтерирование не ингибирует синтез гормонов в ней. Определение свободных фракций тиреоидных гормонов показало, что в процессе повышения содержания дейтерия в организме их концентрации становятся менее вариabельными по сравнению с контролем. Это свидетельствует о сохранении, как уровня продукции, так и связывающей способности белков, осуществляющих транспорт тиреоидных гормонов в системном кровотоке, при сдвиге баланса дейтерия/протия в организме.

Таким образом, клетки щитовидной железы демонстрируют высокую чувствительность к повышению содержания дейтерия и увеличивают интенсивность гормоногенеза в отличие от тиротропоцитов гипофиза, которые реагируют позже и снижают свою секреторную активность в процессе дейтерирования организма. Следовательно, интенсивность секреторных процессов в щитовидной железе демонстрирует некоторую зависимость от градиента дейтерия в крови и клетках и в цитозоле и органеллах.

Работа выполнена по госзаданию № FGFZ-2022-0035.

Литература

1. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Назимова С.В., Яглов В.В. Реактивные изменения лимфоцитопоза в тимусе при кратковременном уменьшении содержания дейтерия в организме // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2022. Т. 173. № 4. С. 508-511. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-173-4-508-511
2. Kravtsov A., Kozin S., Basov A., Butina E., Baryshev M., Malyshko V., Moiseev A., Elkina A., Dzhimak S. 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. N. 1. 243. doi: 10.3390/molecules27010243.
3. Shchepinov M.S. Do "heavy" eaters live longer? *Bioessays*. 2007, 29, 1247-1256. DOI: 10.1002/bies.20681
4. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Реакция гипофизарно-тиреоидной оси на кратковременное изменение содержания дейтерия в организме // Бюл. exper. биол. 2021. Т.171. № 2. С. 232-234. doi: 10.47056/0365-9615-2021-171-2-232-234

Структура коммуникационных сигналов доменной мыши (*Mus musculus*): анализ параметров и выявление фундаментальных характеристик

Лупанова А.С.^{1*}, Егорова М.А.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН;
sozdanie21@gmail.com

Акустическая коммуникация животных относится к сложному типу поведения, где смысловая нагрузка сигнала определяется свойствами составляющих его структурных элементов (Пинкер, 2004; Hauser et al., 2002).

Все структурные элементы сигнала можно разделить на две группы. К основным, так называемым спектрально-временным характеристикам, относят длительность, интервалы между звуками, частоту следования звуков, значения основной частоты в начале и конце сигнала, ее максимальное и минимальное значения, частотную модуляцию. Вторая группа характеристик включает нелинейные феномены, среди которых выделяют бифонации, субгармоники, детерминированный хаос, сайдебанды и частотные скачки (Wilden et al., 1998).

В ранних исследованиях криков животных при описании их акустической структуры внимание уделялось преимущественно длительности, основной частоте, количеству гармоник и числу криков в серии (Константинов, Мовчан, 1985). Позднее была установлена роль нелинейных феноменов в кодировании информации о виде, половой принадлежности, индивидуальных особенностях и текущем эмоциональном состоянии животного (Володин, 2007; Ehret, 2006).

Распознавание коммуникационного сигнала и адекватный поведенческий ответ на него имеет большое значение для социальных видов животных (Kanwal, Rauschecker, 2007). Традиционным объектом лабораторных исследований акустического поведения и нейрофизиологических механизмов кодирования звуковых сигналов слуховыми центрами мозга является домовая мышь, ведущая социальный образ жизни и обладающая хорошо развитой системой акустической коммуникации. Несмотря на многочисленные исследования вокализаций этих животных, данные об их вокализационном репертуаре весьма отрывочны (Portfors, 2007; Hammerschmidt et al, 2009) и не дают полного представления об акустических характеристиках криков и роли акустического поведения в выживании особей. Недостаточная изученность акустической структуры криков и их смысловой нагрузки, а также практически полное отсутствие сведений о становлении вокализаций в онтогенезе мышей определили цель нашего исследования.

В работе произведена аудио-видео регистрация акустического поведения мышей при имитации элементов различных типов поведения. Эксперименты выполнены на 33 половозрелых мышах - гибридах линий СВА и С57BL/6 (19 самцах и 14 самках) и 92 мышатах.

Зарегистрированные вокализации отражали весь спектр поведенческой активности мышей – их социальное, репродуктивное и индивидуальное поведение. Выполнен спектрально-временной анализ криков раннего онтогенеза мышей (ультразвукового крика «покинутого» мышонка и гнездового крика дискомфорта), крика подчиненного самца при агонистическом поведении, оборонительного крика самки и ультразвуковых вокализаций самца при половом поведении, ультразвуковых криков самок при социальных контактах и поиске детенышей.

Все исследованные крики охватывали частоты от 1 до 90 кГц и занимали два практически неперекрывающихся частотных диапазона – звуковой и ультразвуковой. Ультразвуковые вокализации были представлены в основном сериями тональных сигналов с малым количеством нелинейных феноменов. Так, наличие широкополостного шума отмечалось в 18% криков «покинутого» мышонка, 16% ультразвуковых криков самцов при половом поведении и в 4% ультразвуковых вокализаций, излучаемых самками при поиске детенышей. Низкочастотные вокализации, напротив, отличались хорошо выраженным шумовым компонентом. Включения шума наблюдались в 60% криков подчиненного самца и 75% криков дискомфорта мышат и оборонительного крика самки. Аналогичная картина была получена и для таких нелинейных феноменов, как разрывы в спектре (в 14% криков «покинутого», 16% низкочастотных криков самцов) и субгармоники. Последние в структуре ультразвуковых вокализаций не встречались вовсе. А сигналы звукового диапазона имели хорошо выраженную частотную модуляцию и субгармоники, как минимум, в 40% криков.

Анализ онтогенетических изменений структуры криков мышат (от 2 до 14 дня жизни) также показал отличия ультразвуковых и звуковых вокализаций по наличию и степени выраженности нелинейных феноменов. Ультразвуковой крик «покинутого» у 14-ти дневных мышат характеризовался меньшим количеством включений шума и частотных скачков, чем у детенышей на второй день жизни. А у низкочастотного крика дискомфорта, напротив, со взрослением мышат отмечалось больше разрывов спектра и субгармоник.

Таким образом, исследование акустической структуры вокализаций позволило выделить их фундаментальные характеристики. Наиболее стабильными из них для всех зарегистрированных сигналов были частотный диапазон крика, его длительность, частота основного тона, количество гармоник, а в структуре низкочастотных вокализаций также наличие субгармоник и частотной модуляции. Вероятно, именно низкочастотные крики, с большим количеством стабильных параметров, играют особую роль в кодировании информации об индивидууме и его эмоциональном состоянии.

Проведенный анализ онтогенетических изменений в структуре криков мышат показал изменение характеристик сигналов со взрослением животных за счет физиологического становления голосового аппарата и увеличения социальных взаимодействий.

Литература

- Пинкер С. Язык как инстинкт. М.: Едиториал УРСС, 2004. 456 с.
 Hauser, M.D., Chomsky, N., Fitch, W.T. Science 298, 2002. P. 1569–1570.
 Константинов А.И., Мовчан В.Н. Звуки в жизни зверей. Л.: «Изд-во Ленинградского университета». 1985. 304 с.
 Володин И.А., Володина Е.В., Филатова О.А. Журн. общей биол., т. 66, № 4, 2007. с. 346-362.

Ehret G. Behavior and Neurodynamics for Auditory Communication. Cambridge University Press, Cambridge 2006. P. 85–114.

Wilden I., Herzog H., Peters G., Tembrock G. Bioacoustics, V. 9. 1998. P. 171–196.

Kanwal J.S., Rauschecker J.P. Front. Biosci.: J. Virtual Lib. 12, 2007. P. 4621–4640.

Portfors C. V. J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. V. 46. №1. 2007. P. 28–34.

Hammerschmidt K., Radyushkin K., Ehrenreich H., Fischer J. Biol Lett 5. 2009. P. 589–592.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00967-23-00

Технология SERPA в диагностике аденокарциномы предстательной железы

Гудков Г.В.¹, Тарасов Я.В.², Золотавина М.Л.^{2*}, Федоренко Т.В.¹, Филиппов Е.Ф.³, Демченко Л.С.¹,
Фаниев М.В.¹, Крутенко Д.В.¹

¹Детская городская больница г. Краснодар, Краснодар, Россия;

²Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия;

³Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия;

zolotavina_m@mail.ru

Рак предстательной железы является одним из наиболее распространенных новообразований [1]. Измененная иммунореактивность больных раком предстательной железы становится причиной появления аутоантител к антигенам ассоциированных с опухолью (ААО), определение которых имеет решающее значение в диагностике и прогнозе заболевания. Эффективный поиск индивидуального профиля наиболее иммуногенных ААО позволяет реализовать современная технология SERPA (Serological Proteome Analysis) [2], включающая сочетание методов 2D электрофореза, иммуноблотинга и масс-спектрометрии (секвенирование пептидов).

Цель исследования. Использование технологии SERPA в определении иммунореактивных мишеней в опухолевой ткани пациентов с аденокарциномой предстательной железы (АПЖ), как дополнительный метод диагностической стратегии.

Материал и методы. Исследование проводилось в лаборатории клеточных технологий центра репродуктивной и клеточной медицины ГБУЗ «ДГКБ г. Краснодар», было обследовано 10 пациентов: из них у троих была подтверждена высокодифференцированная ацинарная АПЖ, у остальных – очаги хронического воспаления с признаками доброкачественной гиперплазии. Материалом исследования служили образцы тканей простаты, полученных в ходе тонкоигольной биопсии, а также аутосыворотка пациентов. Промытые биоптаты гомогенизировали в регидратационном буфере (7М мочевины, 2М тиомочевина, 4% CHAP, 30mM Tris/HCl pH 9.0, апротинин) с последующим центрифугированием клеточного лизата при 14000×g (30 минут при 4°C). Белки супернатанта осаждали ацетоном (при – 20°C) с дальнейшей вакуумной сушкой осадка и растворением в регидратационном буфере (ReadyPrep™ 2D Rehydration/Sample Duffer, Bio-Rad). Для каждого образца готовили два идентичных 2D геля, один из которых использовали для переноса на ПВДФ мембрану (Trans-Blot® Turbo LF PVDF, Bio-Rad) и выявления иммуногенных мишеней, а другой – для их вырезания и масс-спектрометрической идентификации. После пассивной регидратации двух IPG-стрипов (IPG-стрипы ReadyStrip pH 3-10, 11 см., Bio-Rad), на каждый из которых наносили 185 мкл образца, проводили изофокусирование (PROTEAN® i12™ IEF System, Bio-Rad) с последующим электрофорезом стрипов в полиакриламидных гелях (AnykD™ Criterion™ TGX Stain-Free™ Protein Gel 11 cm IPG, Bio-Rad). 2D гели окрашивали (Bio-Safe™ Coomassie Stain, Bio-Rad) и один из них использовали для переноса (Trans-Blot® Turbo™, Bio-Rad) на мембрану, которую подвергали иммуноблотингу, где в качестве первичных антител применяли аутосыворотку пациента (1:200), а местоположения иммунореактивных мишеней определяли колориметрической детекцией (Goat Anti-Humane IgG (H + L)-HRP Conjugate). Целевые пятна-мишени на мембране тщательно сопоставляли с соответствующими пятнами на втором окрашенном 2D геле, после чего их вырезали из геля, проводили трипсинолиз (Bruker Daltonics, Германия) с последующей идентификацией на MALDI-TOF масс-спектрометре Autoflex Speed (Bruker), в рефлекторном режиме и диапазоне масс 800-4000 Да. Наиболее выраженные пики TOF-спектра подвергали MALDI-TOF-MS/MS анализу (секвенирование). Поиск проводили с использованием программного обеспечения Biotoools v3.2 (Bruker) в базе данных измерений MS и MS/MS и обращением к поисковой системе MASCOT (Matrix Science Ltd) при пороговом score более 56 баллов (p<0,05) по шкале MOWSE для SwissProt.

Результаты и обсуждение. Технология SERPA позволила установить высокую аутоиммунореактивность против белковых мишеней АПЖ, среди которых выделялись изменения активности α-енолазы (ENO1), альдолазы (ALDO), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), концентрации аннексина A2 (ANXA2). Возможным объяснением аутоиммунного ответа против выраженной активности гликолитических ферментов (ENO1, ALDO, GAPDH) является высокая экспрессия в опухолевых клетках, связанная с кардинальной перестройкой энергетического метаболизма в пользу "аэробного" гликолиза (эффект Варбурга) [3] для нужд

интенсивной пролиферации и роста. Помимо этого, ENO1, GAPDH и ANXA2 участвуют в рецептор-опосредованной конверсии пламиногена в плазмин [4], который обеспечивает ремоделирование межклеточного матрикса и создание оптимальных условий для активной миграции и метастазирования клеток опухоли. У пациентов с признаками хронического воспаления и гиперплазии иммунореактивность по отношению к данным маркерам была незначительной. Таким образом, применение технологии SERPA позволяет проводить эффективный поиск индивидуального профиля наиболее иммуногенных ААО.

Выводы. Технология SERPA позволяет специфически идентифицировать иммунореактивные мишени клеток АПЖ, что открывает дополнительные возможности для новых диагностических и терапевтических стратегий.

1. Сомов А. Н., Суслин С. А. Рак предстательной железы. Эпидемиология, факторы риска и раннее выявление //Profilakticheskaya Meditsina. – 2020. – Т. 23. – №. 3.

2. Deutsch E. W. et al. Advances and utility of the human plasma proteome //Journal of proteome research. – 2021. – Т. 20. – №. 12. – С. 5241-5263.

3. Zhivotovsky B. The Warburg Effect returns to the cancer stage //Semin Cancer Biol. – 2009. – Т. 19. – С. 1-3.

4. Ceruti P. et al. Three are better than one: plasminogen receptors as cancer theranostic targets //Experimental hematology & oncology. – 2013. – Т. 2. – №. 1. – С. 1-11.

Тканевая инженерия как средство для исследования фундаментальных процессов в кардиологии и биофизических особенностей формирования сердечной ткани

Цвеляя В.А.^{1,2*}, Слотвицкий М.М.^{1,2}, Бережной А.К.^{1,2}, Щербина С.А.¹, Аитова А.А.¹, Низамиева А.А.¹, Коваленко С.Г.^{1,2}

¹МФТИ;

²ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского;

vts93@yandex.ru

На данный момент существует множество споров о зависимости сердечно-сосудистых заболеваний от фенотипа сердечных клеток, получаемых в стадии формирования сердца и при его развитии всю жизнь пациента. Есть примеры сердечных аритмий, приобретенных от приема лекарственных препаратов, от стресс-факторов, в следствие других заболеваний [1,2,3]. В данном случае внешние факторы могут повлиять на сердечную ткань и необратимо, поменяв их фенотип и функциональность. Одной из задач современной медицины, таким образом, можно считать сопоставление факторов, приводящих к патологическому фенотипу в зависимости от генотипа и вне зависимости от него. Данная работа представляет собой изучение формирования сердечной ткани и электрофизиологических свойств кардиомиоцитов при различных условиях, которые задают фенотипические проявления функциональных различий кардиомиоцитов в процессе созревания сердечной ткани *in vitro*. Самыми главными результатами представляемого исследования можно считать:

1) Выявление этапов и корреляций с эмбриогенезом сердца в развитии, созревании и функциональности кардиомиоцитов пациента, полученных *in vitro* в процессе дифференцировки [4].

2) Создание тестирования, выявляющего риск возникновения аритмий как под воздействием как внешних факторов, так и врожденных пациент-специфичных патологий [5,6]

1. Jabri, A., Kalra, A., Kumar, A., Alameh, A., Adroja, S., Bashir, H., ... & Hedrick, D. P. (2020). Incidence of stress cardiomyopathy during the coronavirus disease 2019 pandemic. *JAMA network open*, 3(7), e2014780-e2014780.

2. Gerdes A. M., Iervasi G. Thyroid replacement therapy and heart failure //Circulation. – 2010. – Т. 122. – №. 4. – С. 385-393.

3. Sattar Y. et al. COVID-19 presenting as takotsubo cardiomyopathy complicated with atrial fibrillation //International Journal of Cardiology. Heart & Vasculature. – 2020. – Т. 29. – С. 100580.

4. Slotvitsky M. M. et al. Formation of an electrical coupling between differentiating cardiomyocytes //Scientific reports. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 1-11.

5. Slotvitsky M. et al. Arrhythmogenicity test based on a human-induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocyte layer //Toxicological Sciences. – 2019. – Т. 168. – №. 1. – С. 70-77.

6. Podgurskaya A. D. et al. Cyclophosphamide arrhythmogenicity testing using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes //Scientific reports. – 2021. – Т. 11. – №. 1. – С. 1-13.

Транскраниальная нейроморфная стимуляция (tNMS) мозга как наиболее универсальный способ активации нейропластичности головного мозга и приборы для её проведения

Пономаренко А.А.^{1*}

¹Энерготекс;

alex.ponomarenko@mail.ru

Методы транскраниальной стимуляции головного мозга разрабатываются уже более 100 лет. При этом происходит постоянное расширение параметров применяемых электрических сигналов. До 70-х годов прошлого столетия в основном применялось электрическое воздействие оглушающего характера: электронаркоз, электросон, электрошоковая терапия.

Предложенный Н.П.Бехтеревой способ микрополяризации (в дальнейшем tDCS) положил начало серии методик транскраниальной стимуляции, отличающихся формой и частотой электрического воздействия. При этом неизменным остается принцип слабого воздействия, такого, который не вызывает эффектов от органов чувств. Для транскраниальной стимуляции стало нормой ограничения в токе 2мА в среднем, и 5мА в амплитуде импульса.

Задачей разработки стало нахождение оптимальных параметров воздействия. Для целей теоретического поиска оптимальной формы была создана упрощенная модель электрической цепи при транскраниальной стимуляции. В нее вошли следующие элементы: электрод, кожа, костная ткань, твердые мозговые оболочки, серое вещество, белое вещество, желудочки мозга. В модели использованы более 200 ячеек соединенных с соседними ячейками. Для моделирования применялся программный пакет TINA V12 компании DesignSoft.

Через условную цепь "лоб" - "затылок" модели пропускался ток в формах наиболее известных методов транскраниальной стимуляции (tPCS, tACS, tVNS, tRNS). При этом анализировались форма и амплитуда сигналов на ячейках модели.

Наибольшее искажение формы сигнала ожидаемо зафиксировано в самой распространенной группе методов - tPCS (ТЭС, мезодиэнцевальная модуляция, tVNS и т.д.). Все эти методы объединяет прямоугольная форма импульса, характеризующаяся высокой скоростью нарастания и спада сигнала. Униполярные и биполярные сигналы импульсной формы получают одинаковый уровень искажений.

Искажение формы приводит к возникновению критических значений токов и напряжений в некоторых тканях. Так наибольшее напряжение формируется в коже, а наибольший ток в желудочках мозга. Именно этими искажениями можно объяснить побочные эффекты используемых сигналов.

В результате экспериментов на модели подобран электрический импульс оптимальной формы. Основой импульса является гармоническое колебание с экспоненциальным затуханием. Такой импульс практически не искажается на моделях живой ткани. Форма сигнала оказалась очень похожей на единичный нервный импульс. Предложено название для группы методов использующих такую форму сигнала - транскраниальная нейроморфная стимуляция (tNMS).

Для проверки результатов создан электронный генератор способный формировать все известные формы сигналов транскраниальной стимуляции, включая постоянную составляющую. Выходной каскад полностью согласован для непосредственного подключения электродов. В целях безопасности применено батарейное питание и конструктивно обеспечивается ограничение тока в импульсе на уровне 5мА.

Первая версия генератора "ЗыбьБио" имела размеры 20х30х6мм, последняя версия полнофункционального генератора "Neuravin" занимает 2 кв.см. и питается от элемента 1,5В.

Проведены сравнительные эксперименты с импульсами известной формы и вновь разработанными, которые показали, что воздействие предложенными импульсами в широком диапазоне частот повторения (от 7Гц до 500Гц) при максимальном воздействии (5мА в амплитуде) не вызывает побочных эффектов в виде раздражения под электродами, оглушения и других.

Прибор был успешно применен в следующих случаях.

1. Ж, 35лет, Полная потеря обоняния в течение 7 месяцев (после Covid19). Проведен курс терапии 10 сеансов по 30 минут ежедневно. Частота повторения импульсов 60 - 100Гц. Появление факта восприятия запаха без классификации - после первого сеанса. Частичное восстановление в течение 14 дней.

2. М, 37лет. Искаженное восприятие обоняния (более 3 месяцев). Улучшение корректности восприятия в в процессе курса 10 дней по 30 минут ежедневно. Частота повторения импульсов 60 - 90Гц. Восстановление полной классификации запахов в течение месяца.

3. Ж, 82года. Перелом шейки бедра 7 лет назад, неустойчивая походка, спонтанные падения. Иннервация ног не нарушена. Проведено 2 курса терапии с интервалом 1 месяц. Частоты повторения импульсов 1Гц и 60 - 90Гц. Спонтанные падения прекратились, исправилась форма стопы, походка стала устойчивой. Средство поддержки (трость) стала применяться крайне редко.

Разработанные схемные решения и программное обеспечение позволяют создавать приборы для широкого спектра применения от научных исследований (включая мелких животных) до приборов медицинского назначения, а также для людей, желающих познать возможности мозга или улучшить спортивные достижения.

1. Пойдашева А.Г., Бакулин И.С., Супонева Н.А., Трошина Е.А., Танащян М.М., Дедов И.И., Пирадов М.А. Новые Горизонты неинвазивной стимуляции мозга в клинической медицине. // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*, 2018; 12 (Специальный выпуск): с. 25–31.

2. А.С.Липатова, П.П.Поляков, А.Х.Каде, А.И.Трофименко, С.В.Кравченко Влияние транскраниальной электростимуляции на выносливость крыс с разной устойчивостью к стрессу. // *Биомедицина*, №1, 2018, с.84-91

3. С.В. Токарева Оценка эффективности транскраниальной электростимуляции в реабилитации пациентов, перенесших COVID-19 // *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание* – 2022 – N 3

Транскраниальная электротерапия импульсным током нормализует концентрацию фруктозамина у крыс на фоне диеты обогащенной фруктозой и жиром

Чабанец Е.А.¹, Занин С.А.¹, Каде А.Х.¹, Трофименко А.И.^{1,2,3*}

¹*Кубанский государственный медицинский университет;*

²*Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница №1 им. проф. С.В. Очаповского;*

³*Кубанский государственный технологический университет;*
artemtrofimenko@mail.ru

Рацион современного человека включает в себя большое количество доступных высококалорийных продуктов питания, которые обогащены насыщенными животными жирами, сахаром и фруктозой. Проблема усугубляется тем, что потребление данной категории продуктов вызывает «пищевую зависимость». Такая диета значительно повышает риск развития инсулинорезистентности, нарушения толерантности к глюкозе и сахарного диабета II типа. В настоящее время активно исследуются методы неинвазивной модуляции электрическим током областей головного мозга, ответственных за принятие решений и механизмами пищевого вознаграждения. Особый интерес среди них представляют методики транскраниальной электростимуляции импульсным током, в частности ТЭС-терапия при которой идет селективное воздействие биполярным импульсным током на структуры антиноцицептивной, стресс-лимбической системы ствола головного мозга.

Цель: изучить в динамике влияние ТЭС-терапии на сывороточную концентрацию фруктозамина в эксперименте у крыс на фоне рациона обогащенного фруктозой и животным жиром.

Материалы и методы: Протокол исследования одобрен на заседании независимого этического комитета. Все болезненные вмешательства проводили под золетил-ксилазиновым наркозом. За две недели до начала исследования всем животным проводили вживление подкожных электродов для электростимуляции (на лоб и затылок), с магнитной системой для бесконтактного подключения выходов электростимулятора.

Характеристика групп животных: группа 1 (n = 60, контрольная) – стандартный рацион (3000 ккал/кг); группа 2 (n = 60, сравнения) – рацион обогащенный фруктозой и животным жиром (4400 ккал/кг); группа 3 (n = 60, основная) – рацион обогащенный фруктозой и животным жиром (4400 ккал/кг) и проведение ТЭС-терапии.

Рацион крыс модифицировали за счет добавления к стандартному корму фруктозы и топленого свиного жира в пропорции (66:17:17), в питьевую воду добавляли 10% фруктозы (по массе).

В контрольные точки исследования: на 30-е, 60-е и 90-е сутки проводили эвтаназию по 20 животных из каждой группы. Определение в сыворотке крови фруктозамина проводили набором, на основе восстановления нитросинего тетразолия.

Транскраниальную электростимуляцию проводили у животных группы №3 с использованием аппарата «ТРАНСАИР-03» (ООО «Центр транскраниальной электростимуляции», Россия) при следующих параметрах: импульсный биполярный режим, импульсы длительностью $3,75 \pm 0,25$ мс, сила тока 0,6 мА, частота тока 70 ± 2 Гц, продолжительность сеанса 30 мин., частота 1 раз в сутки, на протяжении всего периода исследования. Таким образом, в основной группе: 20 крыс получили 30 сеансов, 20 крыс получили 60 сеансов и 20 крыс получили 90 сеансов.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью «GraphPadPrism 7» (GraphPad Company, США). Проверка нормальности распределения количественных признаков в исследуемых группах проводилась с использованием критериев Шапиро-Уилка и гистограмм распределения. Для описания данных использовали медиану (Me) и интерквартильный интервал (Q1-Q3). Динамику изучаемых показателей выражали в виде процентного изменения, межгрупповые различия в виде процентного отношения. При сравнении трех групп

применяли критерий Краскелла-Уоллиса, дальнейшие парные сравнения выполняли с помощью post-hoc теста Данна.

Результаты: На 30-е сутки от начала исследования различий в сывороточной концентрации фруктозамина между исследуемыми группами не выявлено ($p_{kw} = 0,86$). На 60-е сутки отмечены межгрупповые различия ($p_{kw} = 0,0010$), при последующем post-hoc анализе в группе №2 vs №1 содержание фруктозамина было на 15,3% выше ($p_d = 0,0006$). При сравнении группы №1 vs №3 ($p_d = 0,27$) и группы №2 vs №3 ($p_d = 0,14$) статистически значимых различий не было. На 90-е сутки также отмечены межгрупповые различия ($p_{kw} < 0,0001$), при последующем post-hoc анализе выявлено, что содержание фруктозамина в группе №2 vs №1 было на 31,2% выше ($p_d < 0,0001$) и в группе №2 vs №3 на 17,1% выше ($p_d = 0,0089$). При сравнении группы №1 vs №3, статистически значимых различий не было ($p_d = 0,18$). При внутrigрупповом анализе концентрации фруктозамина в динамике по контрольным точкам исследования: в группе №1 выявлено снижение показателя на 18,1% ($p_{kw} = 0,0051$), в группе №2 рост на 9,1% ($p_{kw} = 0,0278$) и в группе №3 без статистически значимых различий ($p_{kw} = 0,38$).

Заключение: Показано, что у крыс с рационом обогащенным фруктозой и животным жиром на 60-е и 90-е сутки исследования повышается сывороточная концентрация фруктозамина, что свидетельствует о развитии у них нарушения углеводного обмена. Сопутствующее применение ТЭС-терапии сопровождалось статистически значимой нормализацией концентрации фруктозамина, что наиболее явно проявилось к 90-м суткам исследования.

Транскриптомный анализ путей репарации ДНК в радиорезистентных сублиниях немелкоклеточного рака лёгкого человека

Пустовалова М.В.^{1*}, Гурьянова А.А.¹, Сорокин М.И.^{1,3}, Сунцова М.В.³, Алхаддад Л.¹, Буздин А.А.^{1,3}, Осипов А.Н.², Леонов С.В.¹

¹ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет);

²ФГБУ ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И.Бурназяна ФМБА России;

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);
pu.margo@mail.ru

Рак лёгкого является ведущей причиной смертности от онкозаболеваний во всем мире, при этом 85% диагностированных случаев приходится на немелкоклеточный рак лёгкого (НМРЛ). Лучевая терапия — один из основных методов лечения НМРЛ. Однако в ходе терапии опухолевые клетки могут подвергаться селективному отбору клонов, обладающих преимуществом в выживании в данном микроокружении или терапевтическом контексте, приобретать таким образом радиорезистентность и в последствии приводить к рецидивированию и метастазам. Лечебный потенциал лучевой терапии зависит от ее способности вызывать репродуктивную гибель опухолевых клеток путем накопления невосстанавливаемых повреждений ДНК, тем самым удаляя раковые клетки из клоногенного пула. Следовательно, выявление ключевых компонентов сигнальных путей репарации ДНК радиорезистентных опухолевых клеток с последующим нацеливанием на них представляет собой привлекательную стратегию лечения.

Целью данной работы являлся транскриптомный анализ путей репарации ДНК клеток НМРЛ, выживших после фракционированного воздействия ионизирующего излучения.

В ходе работы были получены радиорезистентные сублинии клеток НМРЛ, различающиеся по статусу p53 — A549 (p53 дикого типа) и H1299 (p53-дефицитные). Воздействие ионизирующего излучения осуществлялось с применением стандартного протокола, включающего облучение в дозе 2 Гр один раз в день, 5 дней в неделю до достижения тотальной дозы 60 Гр. Выжившие после облучения A549HR и H1299HR клетки продемонстрировали снижение радиочувствительности и увеличение способности давать свободный от поверхности "безъякорный" рост. Транскриптомный анализ выявил 322 дифференциально-экспрессируемых гена ($\log_{10}(\text{контроль}) > 1$, $|\log_2 \text{FC}| > 1$) между выжившими после облучения и контрольными клетками A549 и 1628 дифференциально-экспрессируемых гена облучённых и контрольных клеток H1299. A549HR и H1299HR клетки продемонстрировали активацию сигнальных путей выживания и G2/M прогрессию клеточного цикла, вовлекающих киназу АТМ. В клетках A549HR обнаружена активация пути BRCA1, которая вызывает крупномасштабную деконденсацию хроматина. Активации киназы АТМ для репарации спонтанных ДР ДНК путём гомологической рекомбинации также была обнаружена в этих клетках. В H1299HR клетках гомологическая рекомбинация активируется через путь Fanconi anemia, включающий рекомбиназу RAD51, а также опухолевые супрессоры BRCA1 и BRCA2. Полученные данные чрезвычайно важны для разработки противоопухолевой терапии, поскольку одновременное ингибирование АТМ и компонентов гомологической

рекомбинации и негомологичного соединения концов путей репарации ДНК может способствовать успешной терапии пациентов с НМРЛ.

Уровень тревожности и проницаемость гематоэнцефалического барьера у мышей при моделировании синдрома раздраженного кишечника

Сорокина Д.М.^{1*}, Яковлева О.В.¹, Яковлев А.В.¹, Митрухина О.Б.¹, Ситдикова Г.Ф.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;
dinagabita@mail.ru

Синдром раздраженного кишечника (СРК) представляет собой распространенное желудочно-кишечное расстройство, характеризующееся не только висцеральными болями, изменениями в работе кишечника и кишечной микрофлоры, переваривания пищи, но и когнитивными нарушениями, аллодинией, депрессией, повышенной тревожностью. В большинстве случаев симптомы СРК не связаны с органическими причинами и в значительной степени зависят от стресса и тревожности, что позволяет предположить участие в этом заболевании связи между мозгом и кишечником. Одним из критериев при диагностике СРК является развитие висцеральной гиперчувствительности (Агафонова и др., 2018). Но точный патогенез висцеральной гиперчувствительности еще полностью не изучен. В нашей работе с помощью поведенческих тестов мы проанализировали тревожно-фобическое состояние, развитие висцеральной гиперчувствительности у мышей с хронической пост-воспалительной моделью СРК, а также оценили содержание малонового диальдегида в мозге и проницаемость гематоэнцефалического барьера. Методика. Хроническая модель пост-воспалительного СРК представляет собой экспериментальную модель неонатальной сенсibilизации у мышей, индуцированной введением разбавленного раствора уксусной кислоты, которая предположительно вызывает нетрансмуральное воспаление, характеризующееся повышенной инфильтрацией нейтрофилов в ткани кишечника, массивным некрозом слизистого и подслизистого слоев. Животные в возрасте P10 (P – день после рождения) были случайным образом разделены на две группы: контрольную (n = 25) и экспериментальную (n = 25) с моделью СРК. Мышам контрольной группы вводили NaCl 0.9% (0.5 мл ежедневно для P10-P15 и 1 мл ежедневно для P16-P21). Для создания экспериментальной модели СРК мышам на P10 вводили раствор уксусной кислоты в течение 10 дней (по 0.5 мл ежедневно для P10-P15 и по 1 мл ежедневно для P16-P21). Массу тела мышей во всех группах измеряли одновременно в возрасте P11, P21, P26 и P40. Тревожность оценивали с помощью классических поведенческих тестов «Открытое поле», «Темно-световая камера», «Интегральный показатель тревожности (ИПТ)». Висцеральную гиперчувствительность толстой кишки оценивали путем измерения пороговой интенсивности брюшного сгибательного рефлекса, необходимого для индукции поведенческого ответа во время колоректального растяжения с характерным подъемом задней части тела животного и четко видимым сокращением брюшной полости. Уровень оксидативного стресса определяли по содержанию малонового диальдегида в тканях мозга спектрофотометрически по Ohkawa et al., 1979. Проницаемость гематоэнцефалического барьера у мышей смотрели с помощью красителя Эванс Блу (Evans Blue) по стандартной методике (в модификации Wick et al., 2018) в гиппокампе и мозжечке. Статистическую оценку различий сравниваемых выборок оценивали для 5% уровня значимости. Нормальность выборочного распределения определяли с помощью F-теста Фишера и критерия Шапиро-Уилка с использованием программы OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, США). Достоверность различий рассчитали с помощью критерия Манна-Уитни для непараметрических выборок. Результаты и обсуждение. При формировании модели СРК наблюдалась смертность животных, которая составила 8%. В то время как в контрольной группе выживаемость составила 100%. Ректальное введение уксусной кислоты мышам также сопровождалось низким приростом массы тела мышей этой группы по сравнению с контролем. Исследование тревожности показало увеличение ИПТ у мышей обеих групп сразу после окончания моделирования СРК (1.23±0.28 балл). Но через 2 недели после моделирования в контрольной группе ИПТ снизился до 0.47±0.08 баллов, в экспериментальной группе - остался на высоком уровне 1.38±0.21 (n=25; p <0.05). Анализ тревожно-фобического состояния по времени нахождения в световой камере, времени выхода из центра открытого поля, количеству актов груминга и дефекации показал достоверное повышение тревожности у мышей экспериментальной группы (n=25; p<0.05). Мы выявили, что в ответ на растяжение толстой кишки объемами 0.35 и 0.5 мл значения брюшного сгибательного рефлекса в экспериментальной группе были достоверно выше (2.26±0.14 и 3.38±0.18), чем в контрольной группе (1.83±0.18 и 2.9±0.14) соответственно, (n=15; p <0.05), что свидетельствует о появлении висцеральной гиперчувствительности в модели пост-воспалительного СРК. Нами обнаружено увеличение содержания малонового диальдегида до 0.23±0.01 мг/г в тканях головного мозга мышей экспериментальной группы по отношению к контролю 0.20±0.01 мг/г (n=20; p <0,05). Анализ проницаемости гематоэнцефалического барьера не выявил выделения красителя за пределы сосудов головного мозга в контрольных условиях. В модели хронического пост-воспалительного СРК наблюдалось 3-кратное увеличение концентрации Эванс Блу в тканях

мозжечка и гиппокампа ($n=7$; $p<0.05$), что свидетельствовало о значительном нарушении проницаемости гематоэнцефалического барьера у экспериментальных животных. Заключение. Таким образом, в данной работе мы показали повышение уровня тревожности мышей в хронической модели пост-воспалительного СРК, что может быть связано с появлением висцеральной гиперчувствительности, усилением проницаемости гематоэнцефалического барьера и оксидативного стресса в тканях мозга. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 22-25-20045.

Список литературы

1. Агафонова, Н.А. Абдоминальная боль и висцеральная гиперчувствительность-две грани одной реальности для пациентов с СРК / Н.А. Агафонова, Э.П. Яковенко, А.Н. Иванов, А.В. Яковенко // Эффективная фармакотерапия – 2018. – №. 32. – С. 26-33.

2. Arslanova A, Tarasova A, Alexandrova A, Novoselova V, Shaidullov I, Khusnutdinova D, Grigoryeva T, Yarullina D, Yakovleva O, Sitdikova G. Protective effects of probiotics on cognitive and motor functions, anxiety level, visceral sensitivity, oxidative stress and microbiota in mice with antibiotic-induced dysbiosis // Life (Basel). 2021;11(8):764.

Участие мускариновых рецепторов M1 подтипа в регуляции нейросекреции в моторных синапсах мышцы при изменении уровня внутриклеточных АФК

Ковязина И.В.^{1,2*}

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН;

²Казанский Государственный медицинский университет;

irina.kovyazina@list.ru

Одной из наиболее эффективных форм поддержания стабильности синаптической передачи является модуляция вызванного освобождения медиатора, в том числе и путем ауторегуляции секреторного процесса. В нервно-мышечном синапсе позвоночных в ауторегуляции освобождения ацетилхолина задействованы разные типы холинорецепторов, никотиновых и мускариновых, что предполагает возможность модуляции нейросекреции посредством целого ряда сигнальных путей.

Известно, что никотиновые и мускариновые холинорецепторы являются мишенями для свободных радикалов, которые могут образовываться в нервных и мышечных клетках при повышенной активности и воздействовать на различные мишени в области синаптического контакта. Хотя внутриклеточные АФК традиционно связывают с оксидативным стрессом, в нормальных физиологических условиях они необходимы и играют роль сигнальных мессенджеров в широком спектре клеточных процессов, например, участвуя в поддержании гомеостатической пластичности нейронов для сопряжения клеточного метаболизма с активностью синапсов (Accardi et al., 2014; Diebold and Chandel, 2016).

В работе исследовали эффекты блокады мускариновых рецепторов M1 подтипа на амплитудно-временные параметры потенциалов концевой пластинки (ПКП) при низкой и высокой частоте стимуляции двигательного нерва. Исследования проводились на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы линии BALB/c. ПКП регистрировали внутриклеточно с использованием стандартной микроэлектродной техники. Мышечные сокращения блокировали μ -конотоксином GVIB (Peptide Institute Inc., Japan).

В присутствии селективного блокатора рецепторов M1 подтипа VU-0255035 (0.1 мкМ, Tocris) при стимуляции нерва с частотой 50 и 70 Гц наблюдалась более выраженная депрессия амплитуд ПКП по сравнению с контролем. Так, при стимуляции с частотой 70 Гц снижение составило $43.0 \pm 3.6\%$ уже к 15 стимулу в пачке по сравнению с $26.0 \pm 2.1\%$ в контроле. Однако к 40 стимулу разница в выраженности депрессии становилась незначительной. Интересно отметить, что снижение амплитуд ПКП при высокочастотной стимуляции сопровождалось увеличением длительности переднего фронта ПКП в интактных препаратах, а после инактивации M1 рецепторов это увеличение времени роста ПКП отсутствовало, а для первых десяти ПКП в пачке импульсов наблюдалось даже небольшое укорочение времени роста ПКП. Стимуляция нерва с частотой 10 и 20 Гц приводила к одинаковой депрессии амплитуд ПКП в контрольных препаратах и при инактивации M1 рецепторов, а также к одинаковому изменению длительности переднего фронта ПКП.

Для повышения уровня внутриклеточных АФК, в частности, супероксида, использовали антимицин А – антибиотик, селективно блокирующий цитохром-*bc1*-комплекс — центральный фермент в дыхательной цепи переноса электронов (Accardi et al., 2014). Инкубирование нервно-мышечного препарата в течение 15 мин в растворе, содержащем антимицин А (5 мкМ) не вызывало изменений параметров ПКП при низкочастотной стимуляции нерва. При кратковременной ритмической стимуляции с частотой 10 Гц (в течении 1 с) синаптическая депрессия после инкубации с антимицином А была менее выражена, чем в контроле (к 40му ПКП: $79.1 \pm 2.3\%$ от амплитуды 1-го ПКП по сравнению с $73.9 \pm 0.9\%$). При частоте стимуляции нерва 70 Гц

достоверных различий в развитии синаптической депрессии между интактными препаратами и препаратами, инкубированными с антимицином А, отмечено не было.

После предварительной инкубации препарата в антимицине А блокада М1 рецепторов приводила к менее выраженным изменениям амплитуды ПКП в ходе пачки импульсов. Время роста ПКП в ходе пачки импульсов при этом изменялось так же, как в контрольных препаратах. Таким образом, повышение продукции внутриклеточных АФК препятствовало развитию эффектов блокады М1 рецепторов на амплитуду и длительность переднего фронта ПКП при высокочастотной активности. Возможным объяснением этого феномена может быть как прямое действие внутриклеточных АФК на холинорецептор, так и то, что активация М1 рецепторов может регулировать нейросекрецию через изменение редокс-статуса нервного окончания. Выяснение этого механизма является предметом дальнейших исследований.

Исследование выполнено при поддержке государственного бюджета в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

Участие мускариновых холинорецепторов М5 подтипа в регуляции секреции медиатора в моторных синапсах мышцы в норме и в условиях окислительного стресса

Хамидуллина А.А.^{1,2*}, Ковязина И.В.², Теплов А.Ю.¹

¹*Казанский государственный медицинский университет, Кафедра общей патологии;*

²*Казанский государственный медицинский университет, Кафедра медицинской и биологической физики с информатикой и медицинской аппаратурой;*

aliyakham21@gmail.com

Мускариновые холинорецепторы (мХР) — это подтип рецепторов, восприимчивых к мускарину и ацетилхолину. Выделяют пять подтипов мХР (М1-М5), которые являются надсемействами рецепторов, связанных с G-белком. Исследования, проведенные ранее показывают, что все известные на данные подтипы мХР играют существенную роль в регуляции функций сердечно-сосудистых, желудочно-кишечных, двигательных, а также вовлечены в процессы обучения, запоминания и формирования поведенческих реакций. Более подробное изучение функций мХР затруднено малым количеством специфичных к каждому типу фармакологических агентов, с помощью которых можно воздействовать на молекулярные механизмы, сопряженные с этими рецепторами.

Особый интерес вызывает М5 подтип мХР. Так, имеются данные, что дисфункция М5 подтипа сопряжена с шизофренией, болезнью Альцгеймера и особенностями течения наркомании и алкоголизма. Так же было показано наличие этого подтипа мХР на мышечных волокнах, но их роль в регуляции синаптических функций в нервно-мышечных синапсах ещё только предстоит изучить. Новые разработки фармакологических агентов привели к созданию соединения VU-0238429 - первого селективного положительного аллостерического модулятора (ПАМ) мХР М5 подтипа.

Известно, что холинорецепторы являются мишенью для свободных радикалов, в том числе - активных форм кислорода (АФК), которые образуются как при нормальном функционировании скелетной мышцы, так и при ряде патологических ситуаций (воспалительные процессы, длительное отсутствие мышечной активности, отравление тяжелыми металлами). В свою очередь, активация некоторых подтипов мХР также приводит к повышению продукции оксида азота и АФК.

Целью данного исследования было проанализировать эффекты положительной модуляции М5 мХР в норме и в условиях повышенной продукции АФК в синапсах скелетных мышц.

Материалы и методы. Исследования проводились на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы линии BALB/c с помощью экстраклеточного отведения потенциалов концевой пластинки (ПКП). Регистрировали ПКП, вызванные стимуляцией двигательного нерва парными импульсами с периодом 14 мс и последующим периодом покоя длительностью 2 с и спонтанно возникающие «миниатюрные» ПКП (МПКП). Для перфузии препарата использовался физиологический раствор с близким к физиологическому (2 мМ) содержанием Ca²⁺. Для положительной модуляции М5 мХР использовали соединение VU-0238429 в концентрации 1 мкМ. Для повышения уровня АФК нервно-мышечный препарат инкубировали 20 мин в растворе железа (Fe₂O₃·3xH₂O, 0.1 мМ). Оценивали амплитудно-временные параметры ПКП и МПКП, а также квантовый состав ПКП (соотношением амплитуд вызванных и спонтанных сигналов) для первого и второго стимулов.

Результаты. Параметры спонтанно возникающих МПКП, а именно частота сигналов, их амплитуда, а также время роста и постоянная времени спада (на уровне 10-90% амплитуды) сигналов в присутствии прооксиданта - железа достоверно не изменялись. Квантовый состав ПКП на первый и второй стимулы и временные параметры сигналов также не изменялись после инкубации в растворе с прооксидантом - железом.

Установлено, что квантовый состав вызванных ПКП в присутствии ПАМ - соединения VU-0238429, увеличивался на 22%. Однако после инкубации препарата в растворе, содержащем железо, добавление соединения VU-0238429 уже не приводило к изменению квантового состава постсинаптических ответов ни на первый, ни на второй импульсы при парной стимуляции. Параметры МПКП после добавления ПАМ также не менялись.

Выводы. Эффекты положительной модуляции М5 холинорецепторов на параметры ПКП в синапсах мышцы позволяют предположить, что эти рецепторы присутствуют на мембране двигательных нервных окончаний и участвуют в регуляции нейросекреции. Имитация условий оксидативного стресса для изолированного нервно-мышечного препарата, вызванная инкубацией скелетной мышцы в растворе с прооксидантом - железом, не оказывает влияние на амплитудно-временные параметры ПКП и МПКП, однако предотвращает эффекты модулятора М5 мХР на квантовый состав ПКП. Таким образом, М5 мХР могут быть мишенью для активных форм кислорода, что необходимо учитывать при разработке лекарственных препаратов на основе мускариновых агентов.

Факторы, обуславливающие эффективность физиологического воздействия оксида азота

Титов В.Ю.^{1,2}, Осипов А.Н.^{1*}

¹*Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова"*
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва;

²*Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К. И. Скрабина, Москва. ;*
vtitov43@yandex.ru

Есть два вопроса, ответы на которые необходимы для выяснения механизма физиологического воздействия NO. Это вопросы о специфичности физиологического воздействия NO и о предотвращении его окисления до токсического нитрита. Живые ткани богаты SH- группами, и если NO будет высвобождаться спонтанно, то его взаимодействие с физиологически значимой мишенью маловероятно. Также, поскольку NO – короткоживущее соединение, быстро окисляющееся до нитрита, необходим механизм, предохраняющий NO от окисления кислородом.

Считается, что есть соединения – доноры NO: S-нитрозотиолы (RSNO), динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), которые продлевают физиологическое время жизни NO [1]. Но как осуществляется специфичность взаимодействия, а также защита высвободившегося NO от окисления до нитрита, неясно. Одна из причин — отсутствие метода, позволяющего оперативно контролировать состав метаболитов NO в живых тканях [2, 3].

Разработанный нами в соавторстве с ИХФ РАН ферментный сенсор дает такую возможность. Он основан на обратимом ингибировании фермента каталазы всеми нитрозосоединениями и нитритом с примерно равной эффективностью, которая на два порядка возрастает в присутствии хлорида в плазменной концентрации, а также бромида и тиоцианата. ДНКЖ теряют ингибирующую способность в среде, содержащей хелатор железа (о-фенантролин, ЭДТА) и ловушку NO (гемоглобин), перехватывающую высвобождающийся из комплекса оксид азота. RSNO трансформируются в ДНКЖ под воздействием закисного железа и приобретают его свойства. Нитрит (NO₂-) и нитрозоамины, практически, не продуцируют ДНКЖ в нейтральной среде и сохраняют ингибирующие способности при последовательном добавлении закисного железа, глутатиона, ловушки NO и хелатора железа. Активность каталазы измерялась калориметрически — по кинетике теплопродукции, сопровождающей этот высокоэнтальпийный процесс (23,6 ккал/МН₂O₂). Такая регистрация не требует предварительной очистки образца. Чувствительность метода – 40 нМ, что превышает чувствительность ЭПР и фотометрических методов [3]. То есть мы можем оперативно контролировать состав основных метаболитов NO.

Согласно данным ферментного сенсора, большинство живых тканей содержит нитрит в концентрации менее 50 нМ, несмотря на то, что, согласно данным теста Грисса, в них содержался нитрит в концентрации до нескольких сотен нМ [3]. Нитрит, экзогенно добавленный к исследуемым образцам, определялся сенсором как нитрит. Следовательно, исходно в образцах присутствовал не нитрит, но какие-то соединения, имеющие NO-группы. Показано, что соединения — доноры NO: RSNO, ДНКЖ способны давать окрашенный продукт при взаимодействии с реактивом Грисса в кислой среде. По-видимому, в кислой среде происходит их распад с высвобождением NO и окислением до нитрита. Концентрация соединений-доноров NO в живых тканях варьирует от единиц до десятков и сотен мкМ [3]. Интенсификация синтеза NO после ввода аргинина не приводила к появлению нитрита [4]. Следовательно, ткани имеют механизм предотвращения окисления NO до нитрита. Можно предположить, что синтезированная молекула NO сразу включается в состав соединений —

доноров. Последние считаются короткоживущими соединениями [1,2]. Но сопоставление данных ферментного сенсора и данных ЭПР, относительно концентрации ДНКЖ, а также спектральных методов, относительно ДНКЖ, RSNO показывает, что эти соединения могут модифицироваться, терять свои спектральные и ЭПР — свойства, но, практически, не распадаются спонтанно с высвобождением NO так как не теряют свои специфические ингибирующие свойства [3].

Но каким образом происходит переход NO с молекулы — донора на мишень. Доноры NO не теряют своих ингибирующих свойств при инкубации с гемоглобином — ловушкой NO. ДНКЖ полностью теряет свойство ингибировать каталазу в системе, содержащей ловушку NO и хелатор железа, превосходящий по эффективности лиганды, входящие в состав комплекса. Например, в случае если в состав комплекса входит глутатион (ДНКЖ/GSH), то комплекс теряет ингибирующие свойства в системе цистеин- гемоглобин. ДНКЖ/GSH окисляется в эмбрионах птиц до нитрата, а комплекс, имеющий цистеин (ДНКЖ/Cys) – не окисляется так как не усваивается тканями [4]. Следовательно, переход NO с молекулы донора на мишень происходит при наличии этой мишени и деструкции комплекса. Мы предполагаем, что деструкция может осуществляться под действием каких-то групп, входящих в состав самой мишени. Эндогенно синтезируемые ДНКЖ имеют ингибирующие свойства ДНКЖ/GSH. RSNO, предположительно, осуществляют функцию доноров NO, трансформируясь до ДНКЖ [3].

Нами показано, что в эмбрионах сельскохозяйственных птиц одного вида, но разных пород оксид азота синтезируется с, примерно, равной интенсивностью, но интенсивность окисления до нитрата у пород мясного направления продуктивности многократно выше, чем у пород яичного направления. У последних NO накапливается в эмбрионе в составе соединений — доноров [4].

Таким образом, физиологическая эффективность NO определяется наличием мишени, имеющей химическое сродство к NO и индуцирующей распад доноров NO, но не спонтанным распадом последних. По-видимому, при переходе с донора на мишень NO минимально пребывает в свободном состоянии и не успевает окислиться.

Литература.

1. Vanin A. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: Physico-chemistry, biochemistry and physiology. // Nitric Oxide, 2009, v. 21, p.1–13.
2. Tarpey M., Wink D., Grisham M. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2004, v. 286, p. R 431-R444.
3. Titov V., Osipov A. Nitrite and Nitroso Compounds can serve as Specific Catalase Inhibitors // Redox Rep, 2017, Vol. 22, N 2, p. 91-97.
4. Titov V.Yu., Dolgorukova A.M., Fisinin V.I., Borkhunova Ye.N., Kondratov G.V., Slesarenko N.A., Kochish I.I. The role of nitric oxide (NO) in the body growth rate of birds.// World Poultry Science Journal, 2018, v.74, N 4, p. 675-686.

Физиологическое значение гена white, кодирующего субъединицу ABC-транспортера у *Drosophila melanogaster*: контроль продолжительности жизни, влияние на ЦНС и другие эффекты мутации в изогеотном генетическом окружении

Былино О.В.^{1*}, Добровольская К.Э.², Бикеев А.И.³, Бекбулатов Д.А.², Прокофьев Д.Ю.^{3,4}, Джелад С.С.⁵, Алексеев А.А.⁶, Великанова А.В.³, Шидловский Ю.В.^{7,8}, Батин М.А.³

¹Отдел регуляции генетических процессов, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Российская Федерация;

²Биологический Факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация;

³Компания Open Longevity, Лос-Анджелес, США;

⁴АНО ДПО «Образовательные технологии Яндекса», Москва, Российская Федерация;

⁵Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация;

⁶Физический факультет, Лаборатория инженерной физики, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация;

⁷Лаборатория регуляции экспрессии генов в развитии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Российская Федерация;

⁸Кафедра биологии и общей генетики, Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Российская Федерация;
bylino@gmail.com

Ген white является первым геном, обнаруженным у дрозофилы, однако несмотря на более чем 100 летнюю историю его изучения, его физиологическое значение по-прежнему остается не до конца понятным. white кодирует полуканал, относящийся к подсемейству ABCG суперсемейства ABC-транспортеров, осуществляющих АТФ-зависимый активный транспорт (экспорт/импорт) веществ через мембрану клетки против градиента их концентрации. Сверхэкспрессия ABCG белков является причиной множественной лекарственной устойчивости, а их мутации приводят к возникновению наследственных синдромов и широкого спектра заболеваний пролиферативного и непролиферативного характера у человека. Это определяет важность изучения функциональных свойств генов и белков ABCG.

Наиболее близкими гомологами White дрозофилы являются – ABCG4/White2 (81% сходства аминокислотной последовательности с White) и ABCG1/ABC8/White (51% сходства). Как и ABCG4 человека white экспрессируется преимущественно в мозге и в глазах. В последние годы открылась важная роль этого гена для целого ряда процессов в организме дрозофилы, таких как поддержание стволовых клеток, глюкозотолерантность, обучение и т.д. Более того, имеются некоторые данные относительно возможного участия white и похожих генов в контроле продолжительности жизни (ПЖ). Исходя из этого, представляет большой интерес на модели дрозофилы прояснить роль гена white в контроле ПЖ, а также изучить механизм влияния мутации white на ПЖ.

Недостатком работ, в которых ранее изучалось влияние white на ПЖ дрозофилы, является отсутствие выравнивания генетического фона между опытной (w1118, протяженная делеция локуса white с некартированными границами) и контрольной линиями. При изучении таких количественных признаков, как ПЖ, плодовитость и т.д. исследования следует выполнять с использованием максимально близкого генетического фона. В данной работе при помощи рекомбинации X-хромосомы y1w67c23 с X-хромосомами дикого типа линий Oregon RC и Canton S мы отделили мутацию w67c23 (короткая делеция промотора и первого экзона) от мутации y1. Далее с линией w67c23 были проведены 10 возвратных скрещиваний на исходные линии. Таким образом, были получены изогеотные контрольные линии, несущие мутацией w67c23 на генетическом фоне Canton S и Oregon RC.

В серии тестов мы проанализировали влияние мутации white на ПЖ, состояние центральной нервной системы (ЦНС) и общебиологические функции организма дрозофил. В тестах на ЦНС и общебиологические функции различия между группами выявляли при помощи дисперсионного анализа (ANOVA). Для изучения влияния на ПЖ строили кривые выживаемости Каплана-Мейера и кривые смертности для самцов (M) и самок (F). Анализ кривых выживания проводили с использованием двухвыборочного теста Колмогорова-Смирнова. Скорость старения оценивали по кривым смертности используя критерия MRDT (удвоение скорости смертности с возрастом).

Обнаружили, что контрольные линии отличались по максимальной ПЖ (макс.ПЖ) (возраст 90% смертности Canton S: M=65 дней, F=73 дня; Oregon RC: M=61, F=60), а также демонстрировали достоверные различия по средней и медианной ПЖ (МПЖ) между M и F (Canton S МПЖ: M=51, F=59,5, $p < 0,0001$; Oregon RC МПЖ: M=48, F=36,5, $p < 0,0001$), что хорошо соотносится с различиями в кривых смертности и скорости старения у M и F. Таким образом, в изогенных лабораторных линиях ПЖ между M и F отличается. Можно предполагать, что набор аллелей генов, контролирующих ПЖ, в этих линиях различен.

Введение в генотипы Canton S и Oregon RC мутации white практически не изменяло макс.ПЖ мух (возраст 90% смертности Canton S: M=65, F=73; wCanton S M=66, F=70; Oregon RC: M=61, F=60; wOregon RC: M=61, F=60). Однако, совершенно неожиданно оказалось, что половой диморфизм по МПЖ на фоне мутации white совершенно исчезает; ПЖ у M и F оказалась сопоставима и достоверно не различалась (wCanton S: M=54,5, F=55,5, $p=0,558$; wOregon RC: M=42, F=41, $p=0,275$). Итоговый эффект мутации white был характерен для обоих генетических фонов, но его направленность зависела от генотипа линии: на генетическом фоне Canton S мутация достоверно увеличивала МПЖ у M (Canton S: M=51, wCanton S M=54,5, $p=0,001$), но достоверно снижала МПЖ у F (Canton S F=59,5, wCanton S F=55,5, $p=0,01$), а на фоне Oregon RC – наоборот – достоверно снижала МПЖ у M (Oregon RC M=48, wOregon RC M=41, $p=0,001$), но достоверно увеличивала МПЖ у F (Oregon RC F=36,5, wOregon RC F=41, $p=0,05$). Таким образом, i) введение в генотип мутации гена, сцепленного с полом, уравнивает ПЖ у M и F, ii) направленность эффекта мутации white зависит от генов-модификаторов, влияющих на признак ПЖ, между которыми, очевидно, наблюдаются эпистатические взаимодействия.

Для оценки влияния мутации white на ЦНС изучали локомоторную активность (регистрировали движение мух) и половое поведение (оценивали успешность наступления копуляции). Различия были выявлены на обоих генетических фонах. При мутации происходило сглаживание двугорбого циркадного ритма активности мух и достоверное снижение общей двигательной активности ($P < 0,05$). Копуляция у таких мух происходила отсрочено, причем не только у самцов, но и у самок (нарушен механизм восприятия ухаживания) ($P < 0,05$). Таким образом, изменения в функционировании ЦНС на фоне мутации white, по-видимому, могут являться причиной пониженной активности мух.

Для оценки общебиологических эффектов мутации white изучали скорость развития, плодовитость и выживаемость зигот. Эти показатели были достоверно понижены на фоне мутации для обоих генетических фонов, по сравнению с контролем ($P < 0,05$). Индекс конкуренции, являющийся характеристикой общей приспособленности линии (оценивается как число потомков в опытной линии, по отношению к тестерной и контрольной линиям), показал, что мутанты white демонстрируют очень низкую приспособленность – ниже, чем у контрольной и тестерной линий (использовали линию со сцепленными вторыми хромосомами) ($P < 0,05$).

Полученные данные демонстрируют роль ЦНС и группы генов ABCG в контроле ПЖ. Работа выполнена при поддержке РФФИ 18-74-10051.

Фотобиомодуляция в терапии миофасциального синдрома

Щелчкова Н.А.^{1,2*}, Баврина А.П.¹, Белоусова И.И.¹, Васягина Т.И.¹, Пчелин П.В.^{1,2}, Лапшин Р.Д.¹

¹ПИМУ Минздрава России;

²Нижегородский Государственный университет им. Н.И. Лобачевского;

n.shchelchkova@mail.ru

Сегодня фотобиомодуляция рассматривается, как один из перспективных неинвазивных терапевтических подходов к лечению миофасциального синдрома (МФС). В основе МФС лежит формирование миофасциальных триггерных точек (МФТТ) - мышечных волокон с дискретными пересокращёнными группами саркомеров. [1,2] Увеличение количества внутриклеточного кальция и нарушение оксигенации миоцитов приводит к деструкции митохондрий и усилению тканевой гипоксии. Эффекты фотобиомодуляции преимущественно связаны с использованием красного света (600-700 нм), мишенями для которого являются белки, содержащие металлы переменной валентности.

Целью настоящего исследования было изучение влияния низкоинтенсивного красного света на морфо-функциональные характеристики митохондрий на модели миофасциального болевого синдрома.

Исследование проводили на аутбредных крысах самцах Wistar (возраст 18 месяца). Животные были разделены на 3 группы. Контроль (1 группа) - интактные животные аналогичного возраста. Группа с моделированием МФТТ (группа 2) и группа с моделированием МФТТ и последующей фотобиомодуляцией (группа 3). Моделирование МФТТ проводили согласно протоколу [3]. Фотобиомодуляцию осуществляли ежедневно для части животных после моделирования в течение четырех дней с помощью аппарата Спектр ЛЦ-02 (Россия) при длине волны 650 ± 30 нм. Анализ ультраструктуры саркомера мышцы бедра в зоне травмы проводили методом электронной микроскопии. Функциональность мембраны митохондрий оценивали методом респирометрии высокого разрешения. Статистический анализ проводили с использованием пакета программ

SPSS Statistics (v.27). Сравнение выборок проводили с использованием критерия Манна-Уитни для независимых выборок.

После моделирования МФТТ на месте хронического ушиба было обнаружено наличие тугого мышечного тяжа. В миоцитах МФТТ преобладали митохондрии с просветлённым матриксом и фрагментированными кристами, но попадались и конденсированные формы митохондрий. Фотобиомодуляция МФТТ приводила к увеличению гетерогенности популяции митохондрий в мышечных волокнах с преобладанием органелл с нормальной структурой по сравнению с группой без облучения на 17%.

Наличие МФТТ вызывало значимое снижение окислительного фосфорилирования при участии НАДН-дегидрогеназы (ОКСФОС КI), и комплекса IV (цитохромоксидазы). Многократная фотомодуляция активировала базального дыхания в 2 раза, даже относительно интактной группы (669,5±111,1 и 326,0±64,16 пмоль O₂/с*мг, соответственно), а также дыхание во время окислительного фосфорилирования при участии КI+КII. Активность комплекса IV после фотомодуляции повышалась в 1,9 раз относительно интактной группы (7791,0±1298,0 и 4107±607,0 пмоль O₂/с*мг, соответственно). Также отмечена нормализация показателя мембранного потенциала митохондрий до уровня интактных животных.

Полученные результаты показали, что курсовое низкоинтенсивное светодиодное облучение МФТТ красным светом нормализует структуру популяции митохондрий скелетных мышц при моделировании МФС и значительно стимулирует активность ферментов дыхательной цепи, что может свидетельствовать об увеличении выработки АТФ и купировании гипоксических процессов в мышце. Таким образом, результаты исследования обосновывают возможность терапевтического применения фотобиостимуляции при МФС.

Работа выполнена в рамках Государственного задания 121030100281-9 в ЕГИСУ НИОКТР.

Литература:

1. Jafri M.S. Mechanisms of Myofascial Pain. // Int. Sch. Res. Notices. 2014. 2014:523924. doi: 10.1155/2014/523924.
2. Ye L., Li M., Wang Z., Yang Z., Zhang J., Fang H., He Z., Wang X. Depression of Mitochondrial Function in the Rat Skeletal Muscle Model of Myofascial Pain Syndrome Is Through Down-Regulation of the AMPK-PGC-1 α -SIRT3 Axis. // J. Pain Res. 2020. Vol.13, № 13. P. 1747-1756. doi: 10.2147/JPR.S233583.
3. 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, № 1. P. 65-73. doi: 10.1136/acupmed-2012-010129.

Фотобиомодуляция микробиоты кишечника человека *in vitro* с помощью красного и ближнего инфракрасного светодиодного излучения

Храмов Р.Н.^{2*}, Заломова Л.В.¹, Фесенко (мл.) Е.Е.¹

¹ИБК РАН;

²ИТЭБ РАН;

khramov30@mail.ru

Предпосылки и цели. Совокупность молекул метаболитов (метаболом) в крови не случайно образно называют молекулярным «зеркалом» нашего здоровья. Новейшие данные показали, что 69% ассоциаций метаболитов были обусловлены исключительно микробиомом, 15% — исключительно генетикой и 16% находились под гибридным контролем генома и микро-биома (Diener et al., 2022). Микробиом человека является отличным предиктором изменений в фенотипе хозяина и, в более общем плане, в феноме, объясняя до 20% адаптации хозяина и связанных с ней клеточных / молекулярных явлений, в то время как геном может объяснить до менее 2% модификаций, связанных с хозяином (Puce et al., 2022). Эти выводы признаны многообещающими, потому что дают ключи к успешной разработке коррекции нарушений метаболизма, если сможем управлять микробиомом, поскольку большим количеством метаболитов можно манипулировать с помощью диеты и пробиотиков. В то же время метаболиты, находящиеся под строгим генетическим контролем, не будут реагировать на изменения образа жизни, а потому их надо рассматривать как мишени для фармакологических и нелекарственных вмешательств, к которым, в частности, относится фотобиомодуляция (ФБМ) человека. ФБМ применяется достаточно широко для облегчения боли, заживления ран и многого другого. Достаточно молодым направлением ФБМ является внешнее (через поверхность тела) облучение микробиоты кишечника (МК), которой даже отводят роль как важнейшему органу организма (Bicknell et al., 2022.), а МК определяют как ключевой компонент здоровья и снижение микробного разнообразия и изменением микробного состава, признаны одними из основных факторов многих заболеваний и расстройств. Дизайн исследования, материалы и методы. Для экзогенного значимого воздействия на экосистему МК через поверхность живота целесообразно использовать свет в окне прозрачности биологических тканей (600–1500 нм), что было обосновано теоретически (Храмов, 2021). Мы впервые попытались оценить эффективность прямой ФБМ в насколько возможно

выделенной полной экосистеме микроорганизмов МК *in vitro*, полученной из образцов стула человека. При этом пытаются сравнить эффективность ФБМ для светодиодного излучения в двух диапазонах длин волн: в красном (К) и ближнем инфракрасном (БИК) с максимумами 660 нм и 940 нм соответственно. Мы стремились получить больше информации об интегральных параметрах всей выделенной экосистемы МК, а также одного из важнейших МК штаммов – бифидобактерий (*Bifidobacterium breve*), по показателям выживаемости клеток после повреждающей крионагрузки в жидком азоте и по влиянию на кривые роста микроорганизмов при предварительной ФБМ в этих диапазонах при разных дозах облучения. Кривые роста были измерены по оптической плотности культивируемых клеток МК в анаэробных условиях, подвергнутых предварительному воздействию светом с максимумами 660 или 940 от светодиодных источников. Устойчивость к повреждениям от нагрузочного теста криоконсервации микроорганизмов оценивали с помощью анализа соотношения количества живых и мертвых клеток.

Результаты. Микроорганизмы МК по разному реагировали на воздействие при 660 нм и 940 нм. Максимальный достоверный прирост выживаемости МК после нагрузочного теста криоконсервации был более чем в три раза больше при 940 нм по сравнению с 660 нм (до 40% по отношению к контролю) в диапазоне доз от 10 до 600 J/m². Аналогичная картина наблюдалась и для микроорганизмов *Bifidobacterium breve*: при 940 нм прирост выживаемости достигал 14%, а при 660 нм не наблюдалось достоверных изменений в диапазоне 10–160 J/m². ФБМ 660 нм не оказывала достоверного влияния на кривые роста *Bifidobacterium breve*, в то время как ФБМ 940 нм вызывала на 4 и 6 часе культивации достоверные изменения кривых роста: как подавление на 3,5%, так и увеличение на 9% по сравнению с контрольными, но только лишь на культурах клеток после нагрузочной процедуры криоконсервации. Также только на культуре МК после криоконсервации излучение с 940 нм вызывало достоверные изменения в широком диапазоне доз как при очень низкой дозе 1 J/m² так и при достаточно больших дозах до 67800 J/m², на которых эффекты были позитивными и носили нетепловой характер. Показано, что при добавлении криопротектора ДМСО защитные эффекты ФБМ нивелируются.

Заключение. Насколько нам известно, это первая демонстрация различной чувствительности бактерий МК *in vitro* в ответ на ФБМ с помощью красного и ближнего инфракрасного светодиодного излучения. Оказалось, что тестирование на выживаемость является более чувствительным методом чем анализ кривых роста микроорганизмов в ответ на ФБМ. Мы также обнаружили специфические для клеточного типа различия в ответе на ФБМ воздействие *in vitro* с помощью красного и ближнего инфракрасного светодиодного излучения. Эти результаты подтверждают, что различные пути ответа задействованы после воздействия светодиодного излучения 660 и 940 нм и, что ближний инфракрасный свет 940 нм может вызывать более значимое в сравнении с красным светом позитивное воздействие на микроорганизмы МК. Эффекты ФБМ с большой вероятностью носят стабилизирующий характер действия на мембрану клеток. То, что эффекты ФБМ больше выявляются либо при повреждениях или при культивировании после повреждений, вызываемых неинвазивной процедурой криоконсервации, можно предполагать, что ФБМ может быть особенно эффективна при различных заболеваниях или стрессорных воздействиях, приводящих к дисбиозу с повреждениями и гибелью полезной МК человека.

Фотодинамически-индуцируемая иммуногенная клеточная смерть как основа эффективной дендритноклеточной вакцинации против глиомы мышей

Турубанова В.Д.^{1,2*}, Савюк М.О.^{1,2}, Слепцова Е.Е.¹, Редькин Т.С.¹, Мищенко Т.А.¹, Балалаева И.В.¹,
Лермонтова С.А.^{1,3}, Клапшина Л.Г.³, Ведунова М.В.¹, Крысько Д.В.^{1,2}

¹ННГУ им. Н.И. Лобачевского;

²Гентский университет;

³Институт биоорганической химии РАН;

vikaturu@mail.ru

Начальным этапом лечения глиом является хирургическая резекция, обеспечивающая уменьшение объема опухоли и получение образца для гистологического анализа и генотипирования опухоли. Возникают трудности с полным удалением опухолевого очага во время операции из-за инвазивности глиом в окружающие ткани, кроме того, особенности их микроокружения являются причиной частых рецидивов.

В клинических исследованиях показано, что дендритноклеточные (DC) вакцины ослабляют иммунное подавление и активируют CD8⁺ Т-клетки. По отношению к глиомам применение дендритноклеточных вакцин является перспективным вариантом лечения, учитывая не лояльное микроокружение и склонность к метастазированию.

В настоящее время исследования дендритноклеточных вакцин сосредоточены на повышении иммуногенного потенциала вакцинации с помощью различных стратегий. Один из путей - это индукция

иммуногенной клеточной гибели (ICD) опухолевых клеток, которая сопровождается испусканием молекул опасности DAMPs и запуску процесса антиген-презентации.

Одним из способов индукции ICD является фотодинамическое воздействие. Фотоактивация красителя приводит к стрессу и активирует каскад реакций, приводящих к регулируемой форме гибели клеток опухоли. Различные фотоагенты обладают разным механизмом запуска иммуногенной гибели в связи первичной мишенью действия фотосенсибилизатора.

Нами были исследованы ряд соединений тетра(арил)тетраианопорфиразинов с разными арильными заместителями, а также коммерчески-доступный фотосенсибилизатор Фотосенс (Ниопик, Россия). Все они являются индукторами иммуногенной клеточной гибели и умирающие фотоиндуцированные клетки с применением этих агентов эффективно защищают мышей в сингенных моделях опухолей.

Иммунизированные мыши C57BL/6 были хорошо защищены от роста глиомы головного мозга и продемонстрировали высокую общую выживаемость при применении всех фотоагентов по сравнению с контрольными животными. Помимо этого при анализе МРТ-томограмм показано, что опухолевых очагов иммунизированных животных значительно меньше, чем контрольных групп мышей.

Таким образом, все эти данные свидетельствуют о том, что тетра(арил)тетраианопорфиразины и фотосенс могут выступать в качестве эффективных индукторов ICD, что потенциально расширяет перспективы разработки эффективных иммунотерапевтических стратегий лечения опухолей головного мозга.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00716, <https://rscf.ru/project/22-25-00716/>

Фотоинактивация *Mycobacterium smegmatis* с использованием фотосенсибилизаторов на основе трикарбоцианина

Козобкова Н.В.^{1*}, Самцов М.П.², Луговский А.П.², Тарасов Д.С.², Белько Н.В.², Савицкий А.П.¹, Шлеева М.О.¹

¹*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Россия;*

²*Научно-исследовательское учреждение «Институт прикладных физических проблем имени А. Н. Севченко» Белорусского государственного университета;*
natalia.cosolapowa@gmail.com

Возбудитель туберкулеза (ТБ) - *Mycobacterium tuberculosis* обладает способностью в неблагоприятных условиях образовывать покоящиеся формы, которые не только приобретают устойчивость ко всем известным антибактериальным препаратам, но способны десятилетиями сохранять жизнеспособность в организме человека и переходить в активное состояние и вызывать возобновление болезни. Распространение штаммов микобактерий с широкой и множественной лекарственной устойчивостью, диктует необходимость разработки новых подходов к борьбе с этими заболеваниями. Одним из возможных подходов является метод фотодинамической инактивации (ФДИ), неспецифичность повреждающего воздействия которого препятствует появлению резистентности. В значительной мере применение этого метода ограничивается неглубоким проникновением используемого на практике света для возбуждения порфиринов, хлоринов, метиленовой сини. Длина волны необходимого для их активации излучения ограничивается 690 нм, что соответствует видимому диапазону. Эксперименты с применением фотосенсибилизаторов, активируемых ближним инфракрасным диапазоном (740 нм), в отношении микобактерий ранее не проводились.

Целью данной работы являлось разработка новой стратегии борьбы с микобактериями путем метода ФДИ с применением фотосенсибилизаторов (ФС) на основе трикарбоцианиновых красителей, способных вызывать фотодинамический эффект с использованием света с более глубоким проникновением в ткани животных и человека.

В качестве объекта исследования был использован непатогенный и быстрорастущий близкий генетический родственник возбудителя туберкулеза - *Mycobacterium (basonym: Mycobacterium) smegmatis*. В качестве основы фотосенсибилизаторов применяли гидрофильную (ПК220) и гидрофобную (ПК154) формы индотрикарбоцианиновых красителей. Максимум полосы поглощения фотосенсибилизаторов расположен на 742 нм и полуширина составляет 70 нм, максимум спектра флуоресценции расположен на 758 нм, полуширина 41 нм.

Суточную культуру клеток *M. smegmatis*, для которой оптическая плотность составляла OD590 >1, разбавляли средой NB до оптической плотности OD590 = 0,2 и инкубировали с красителями в течение 2 ч при температуре 37°C в темноте при постоянном перемешивании. Облучение производилось излучением светодиода 740 нм (SOLIS-740C, Thorlabs, США) при плотности мощности 260 мВт/см². Экспозиционная доза для образцов

составляла 78, 234, 468 Дж/см², что соответствовало времени облучения 5, 15 и 30 минут. Оценка жизнеспособности бактерий проводили путем посева на агаризованную среду NB методом разведений.

В результате выявлено, что при концентрации 40 мкМ красителя ПК220 и световой дозе 468 Дж/см² наблюдается значительная гибель клеток *M. smegmatis* (89%). При световой дозе 78 Дж/см² погибало 50 % бактериальных клеток. Использование гидрофобной формы этого фотосенсибилизатора демонстрировало более выраженный фотодинамический эффект. При концентрации 40 мкМ красителя ПК154 и световой дозе 468 Дж/см² количество погибших клеток *M. smegmatis* составило 97 %, вероятно вследствие лучшего связывания ФС с гидрофобной стенкой микобактерий.

Таким образом, проведенное исследование впервые демонстрирует возможность *in vitro* фотоинактивации микобактерий на примере быстрорастущего родственника возбудителя туберкулеза – *M. smegmatis* с использованием фотосенсибилизаторов, активируемых излучением в ближнем инфракрасном диапазоне. Данное направление является перспективным для разработки методов борьбы с туберкулезом наряду с антибиотикотерапией.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-15-00324.

Фунги- и цитостатические свойства наноразмерных потенциально мембранно-активных 1,10-фенантроцианинов (би-1,10-фенантролиленов) редокс-инертных Zn(II) и Cd(II)

Демидов В.Н.^{1*}, Богомолова Е.В.², Шаройко В.В.^{3,4}, Рочев Р.Д.¹, Бадалян А.Г.⁵

¹Институт химии силикатов им. И.В. Гребенщикова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

³Санкт-Петербургский государственный университет, Петергоф, Россия;

⁴Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

⁵Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия;

vndemidov@mail.ru

Поскольку проблемы лечения грибковых и онкологических заболеваний еще далеки от своего окончательного решения, продолжается поиск новых эффективных лекарственных фунги- и цитостатических агентов [1]. Среди цитостатиков обращают на себя внимание соединений класса дигидропиридинов [2]. Биядерные 1,10-фенантроцианиновые (би-1,10-фенантролиленовые) комплексы (РС) d-элементов содержат в качестве фармакофорных мостиковых лигандов их производные – дигидро-би-1,10-фенантролины [3].

В работе исследована фунги- и цитостатическая активность диамагнитных (с лигандами сильного поля) наноразмерных биядерных комплексов электронных аналогов Zn²⁺ [Ar]3d10 и Cd²⁺ [Kr]4d10 (phen)_nM²⁺(μ-σН,πН-РСН)_nM²⁺(phen)_n(-OAc)₄ с фармакофорными N,N'-N'',N'''-бис-хелатными 1,10-фенантроцианиновыми (би-1,10-фенантролиленовыми) мостиковыми лигандами μ-σН,πН-РСН (phen-1,10-фенантролин, -OAc – ацетатные анионы, n=0-2), их исходных пурпурно-фиолетовых (а также производных желто-коричневых хромофорных форм μ-σН,πН-РСН'), мягких цветных коллоидных стекол. Синтез РС осуществлен с помощью термического металл-ассистированного негидрогеноативного C(sp²)H-сочетания 1,10-фенантролина [3] в предшественниках M(phen)_n(OAc)₂ (n=1-3). Одной из центральных его стадий является нуклеофильное гетероароматическое замещение водорода SNH. РС охарактеризованы методами ИК-спектроскопии, спектроскопии ЯМР, ЭПР, данными элементного анализа.

Предварительные данные о фунгистатических свойствах желто-коричневых форм (phen)_nM(μ-РСН')M(phen)_n(OAc)₄ (M=Zn²⁺, n=1; Cd²⁺, n=2) по отношению к грибам из родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Trichoderma* показывают, что активность РС Cd(II) намного выше, чем для соединения Zn(II). Поскольку РС Cd(II) представляет собой термодинамически устойчивое координационно насыщенное соединение, биодоступность ионов Cd²⁺ минимальна. Напротив, в РС Zn(II) биодоступность ионов Zn²⁺ весьма высока, вследствие легкого замещения координированных ацетатных анионов на молекулы воды. С другой стороны, желто-коричневая форма РС Cd(II) (как и Zn(II)) содержит редокс-чувствительную форму мостикового лиганда μ-РСН', которая может провоцировать в биологической среде значимые редокс-процессы. Редокс-инертные ионы Zn²⁺ и Cd²⁺ в составе РС, в отличие от исследованных совместно с ними комплексов редокс-активных Mn(II) и Co(II), не могут быть инициаторами биологически значимых редокс-процессов. Фунгистатическая активность соединений прогрессивно и неожиданно усиливается в ряду Co(II) < Zn(II) < Mn(II) < Cd(II). РС редокс-чувствительного Mn(II) по своей активности приближается к соединению редокс-инертного Cd(II). Как следует из исследования цитотоксичности (phen)_nZn(μ-РСН')Zn(phen)_n(OAc)₄ (n=0, 1) на клеточных линиях человека MCF-7 (карциномы молочной железы), активность комплекса с n=0 на порядок выше, чем для n=1. Это

согласуется с меньшей координационной насыщенностью и большей биодоступностью катионов Zn^{2+} для первого вещества.

Изучение комплексообразования ДНК с $Zn(phen)_2(OAc)_2$ и $(phen)_2Zn(\mu-PCN')_2 Zn(phen)(OAc)_4$ показало, что в обоих случаях имеет место интеркаляция [4]. Склонность более сложных ассоциатов PC $Zn(II)$ и $Cd(II)$, как объемных хромофоров, к ММВ дисперсионного типа [5], должна приводить к их сродству с мембранами клеток и клеточных органелл. Определенную роль в цитостатических свойствах соединений могут играть входящие в состав их мостиковых лигандов дигидропиридиновые фрагменты. Для PC $Zn(II)$ [6] и $Cd(II)$ методом ЭПР исследованы температурно- и фото-достижимые электронные бирадикальные триплетные состояния, поскольку нельзя исключить, что подобные реакционноспособные формы могут быть причиной термо- и фото-активирования фунги- и цитостатического действия соединений.

Исследование ЭПР комплексов выполнено в Лаб. микроволновой спектроскопии кристаллов отд. физики твердого тела ФТИ РАН и РЦ МРМИ СПб ГУ, ЯМР – в РЦ МРМИ СПб ГУ и в СПб ГТИ (ТУ), фунгистатических свойств – в БИН РАН, в рамках темы «Биоразнообразие, экология и структурно-функциональные особенности грибов и грибообразных протистов» (AAAA-A19-119020890079-6).

1. Kellert A., O'Connor M., McCann M., et al. *Med. Chem. Commun.* 2011. V. 2. P. 579-584.

2. Viradiya D., Mirza S., Shaikh F., et al. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 2017. V. 17 (7). P. 1003-1013.

3. Демидов В.Н. Автореф. дисс. д.х.н. СПб, 2010. – 40 с.

4. Акуленкова Е.В., Демидов В.Н., А.О. Мартынова А.О., Пастон С.В. *Биофизика.* 2021. Т. 66. № 1. С. 23–30.

5. Дерягин Б.В., Чураев Н.В., Муллер В.М. *Поверхностные силы.* М.: Наука, 1985. 398 с.

6. Демидов В.Н., Сухаржевский С.М., Пастон С.В. и др. *Вестник СПбГУ. Физика, химия.* 2017. Т. 4 (62). Вып. 2. С. 138-145.

Функциональное состояние двигательных систем при моделируемой гипогравитации и в реадaptационный период. Эффекты стимуляции спинного мозга

Федянин А.О.^{1,2*}, Балтин М.Э.^{1,2}, Зайцева Т.Н.¹, Шульман А.А.¹, Балтина Т.В.¹, Еремеев А.А.¹

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет;*

²*Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма ;
artishock23@gmail.com*

Основными факторами, определяющими характеристики моторных систем, предполагаются экзогенные гравитационные силы и эндогенные мышечные силы. Однако конкретные пути и механизмы их действия остаются не ясными. Широкая распространенность патологий, сопровождающихся изменением двигательных качеств, и интенсивное освоение космического пространства делает необходимым получение новых знаний о механизмах реорганизации моторики, детализации роли и долевого вклада в эти процессы как периферических, так и центральных структур нейромоторных систем. Не менее важным представляется понимание процессов восстановительной реадaptации двигательного аппарата после нормализации условий функционирования. Терапевтические приемы, предлагаемые для увеличения скорости и эффективности восстановления двигательной функции, в частности, активация спинальных нейронных сетей, широко исследуется.

Целью работы являлась оценка влияния электрической и неинвазивной магнитной стимуляции спинного мозга на функциональное состояние нейромоторного аппарата камбаловидной (КМ) и передней большеберцовой мышц (ПБМ) голени крысы при гравитационной разгрузке и в период постгипогравитационной реадaptации.

Проводили модельные эксперименты на лабораторных крысах-самцах весом 190-210 г в строгом соответствии с принятыми биоэтическими нормами. Животные были разделены на следующие экспериментальные группы: «АОВ» – животные с моделируемой гравитационной разгрузкой задних конечностей (7, 35 сут; n=11); «АОВ+МС» - животные с моделируемой гравитационной разгрузкой задних конечностей, комбинируемой с магнитной стимуляцией спинного мозга (7, 35 сут; n=10); «АОВ+ЭС» – животные с моделируемой гравитационной разгрузкой задних конечностей, комбинируемой с электростимуляцией спинного мозга (7, 35 сут; n=9); «РД» - животные в условиях реадaptации к действию силы реакции опоры и осевым нагрузкам после моделируемой гравитационной разгрузки (1, 3, 7, 14 сут; n=18); «РД+МС» - животные в условиях реадaptации, комбинируемой с магнитной стимуляцией спинного мозга (1, 3, 7, 14 сут; n=16); «РД+ЭС» - животные в условиях реадaptации, комбинируемой с электростимуляцией спинного мозга (1, 3, 7, 14 сут; n=14).

Моделирование гравитационной разгрузки осуществляли общепринятым методом антиортостатического вывешивания крысы за хвост. Для исследования эффектов реадaptации к действию силы реакции опоры и осевым нагрузкам у животных моделировали гравитационную разгрузку задних конечностей. Стимуляцию спинного мозга проводили в области локализации двигательных центров исследуемых мышц (L4-S1 сегменты).

Магнитную стимуляцию (группы «АОВ+МС», «РД+МС»), осуществляли магнитным стимулятором «Нейро-МВП-4» (Нейрософт, Россия), 8-образным индуктором. Электрическую стимуляцию (группы «АОВ+ЭС», «РД+ЭС») проводили через предварительно имплантированные электроды. Параметры стимуляции: ежедневно в течение 90 минут сериями по 10 мин с интервалом 10 мин; амплитуда стимулов - пороговая для сокращения мышц голени; частота – 3 Гц.

После завершения сроков воздействия экспериментальных условий регистрировали рефлекторный (Н) и моторный (М) ответ КМ и ПБМ. Определяли порог возникновения, максимальную амплитуду, латентность и длительность вызванных потенциалов. Вычисляли отношение максимальных амплитуд рефлекторного и моторного ответов.

Проведенный анализ параметров Н ответа указывал на повышение рефлекторной возбудимости мотонейронов мышц голени крысы как при 7-суточной (для КМ), так и при 35-суточной (для КМ и ПБМ) моделируемой микрогравитации. Регистрируемое снижение максимальной амплитуды М-ответа КМ после длительной разгрузки свидетельствовало о снижении общего количества двигательных единиц, развитии атрофических процессов. Активация спинальных структур в условиях краткосрочной (7 сут) моделируемой разгрузки предотвращала изменение рефлекторной возбудимости спинальных двигательных центров, однако, не исключала гипогравитационнодетерминированных преобразований при длительной разгрузке (35 сут).

В условиях постгипогравитационной реадaptации после 7-суточной разгрузки рефлекторная возбудимость соответствующих двигательных центров уже на 1 сут приближались к уровню контроля. Через 35 сут моделируемой микрогравитации при реадaptации на 1 сут наблюдали снижение рефлекторной возбудимости мотонейронов КМ и ПБМ, затем возбудимость повышалась. Отмечали увеличение латентности и длительности регистрируемых потенциалов. Восстановление морфофункционального состояния мышцы после разгрузки, очевидно, сопровождается резким усилением периферической афферентации, в том числе от мышц антагонистов, мотонейронные пулы которых, связаны реципрокными отношениями; процессами реиннервации и, как следствие, рассинхронизацией рекрутирования двигательных единиц. В условиях применения стимуляции спинного мозга вовремя реадaptационного периода не наблюдали резкого изменения рефлекторной возбудимости двигательных центров. На 1 сутки реадaptации сохранялся повышенный уровень активности мотонейронных пулов, однако, уже к 3 суткам реадaptационного периода отмечали приближение данных показателей к уровню контроля и на следующих исследуемых этапах реадaptации существенных изменений не регистрировали. Также, в условиях реадaptации, комбинируемой с стимуляцией спинного мозга, не регистрировали изменений порога, латентности и длительности М-ответа, а амплитуда моторного потенциала восстанавливалась до контрольных значений уже 3 суткам.

Мы заключаем, что стимуляция спинного мозга может активировать процессы нейрональной пластичности, способствовать реактивации существующих и, возможно, образованию новых внутриспинальных локомоторных схем. Данные об эффективности стимуляции спинного мозга могут быть приняты за основу для разработки терапевтического протокола нейрореабилитации пациентов после нарушения/ограничения двигательной функции.

Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета» (ПРИОРИТЕТ-2030).

Характеристики и интерпретация сигналов ЭМР в ткани СМ через 7 дней после его травматического повреждения

Юртаева С.В.^{1*}, Яфарова Г.Г.^{1,2}, Яцык И.В.¹, Гайнутдинов Х.Л.^{1,2}

¹Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского ФИЦ КазНЦ РАН;

²Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет;

svetlana.vish@rambler.ru

В последнее время изучение молекулярных механизмов повреждения нервных тканей и поиск путей восстановления возникающих нарушений после него ведутся очень интенсивно. Тяжелая травма позвоночника, осложненная повреждением спинного мозга (СМ) остается одной из актуальных медико-социальных проблем, т.к. ведет к глубокой инвалидизации пострадавших. Отсутствие в настоящее время эффективных методов лечения и реабилитации при данной патологии способствует интенсивному изучению молекулярных механизмов травмы нервных тканей. Одним из метаболитов, активно участвующих в развитии посттравматических состояний при повреждении нервной ткани является железо.

Известно, что поражение СМ сопровождается гибелью клеток и кровотечением, что вызывает увеличение пула свободного железа. Считается, что избыточное количество ионов железа может инициировать вторичное повреждение тканей путем усиления свободно-радикальных процессов. В этом случае возможно усиление

процессов биоминерализации железа в тканях, результатом которых является образование кристаллических оксидов железа. Метод ЭПР позволяет зарегистрировать такие кристаллы.

К настоящему моменту известно о наблюдении сигналов электронного магнитного резонанса (ЭМР), зависящих от ориентации магнитного поля, в травмированных нервных тканях. Данные сигналы были зарегистрированы в травмированном седалищном нерве лягушки [1] и травмированном СМ кошки [2]. Уже в первой работе, обнаружившей анизотропный сигнал в нервной ткани, высказывалось предположение о его ферромагнитном происхождении, однако источники этого типа сигналов и их характеристики не были установлены. Определение природы данных сигналов ЭМР может дать дополнительную информацию о молекулярных процессах, развивающихся после травмы нервной ткани, что может способствовать разработке новых методов коррекции возникающих метаболических сдвигов.

В данной работе методом ЭПР-спектроскопии было проведено изучение биоминерализации железа в тканях спинного мозга в условиях его травмирования. Исследована природа возникающих сигналов ЭМР в ткани травмированного СМ крысы через 7 дней после травмы. Проведено количественное сопоставление сигналов в травмированных и здоровых тканях.

Были изучены ткани СМ: контрольные (n=3) и с экспериментальной моделью травмы спинного мозга (ТСМ) (n=6). Моделирование ТСМ осуществляли по методике Аллен [3]. В тканях СМ обнаружены два типа сигналов ЭМР, соответствующих кристаллическим оксидам железа, образующимся в результате биоминерализации. Изучены их температурные и угловые характеристики. Первый тип, характеризующийся зависимостью Нрез от ориентации в магнитном поле, отнесен нанокристаллическому магнетиту. Второй тип, характеризующийся суперпарамагнитным температурным поведением, отнесен кристаллическому ядру ферритина, ферригидриту. Первый тип сигналов преобладал в травмированных тканях, второй – в контрольных и примыкающих к травме участках СМ. Были оценены интегральные интенсивности сигналов ЭМР в тканях. Обнаружено заметное увеличение сигнала ЭМР непосредственно в области травмы по сравнению с соседними областями СМ, а также по сравнению с аналогичными нетравмированными тканями СМ контрольных крыс, в среднем более чем в 2 раза, свидетельствующее о накоплении кристаллического железа в травмированной ткани. У крысы, с максимальным эффектом, сигнал в области травмы возрастал в 10 раз. Установленное увеличение количества кристаллических оксидов железа в травмированном СМ может быть связано с явлением «железо гомеостатического отклика» [4].

Обнаруженные в данной работе сигналы в тканях травмированного СМ и прилегающих отделах (выше и ниже травмы) обусловлены оксидами железа, в основном магнетитом и ферритином. Обнаружены разные виды угловой анизотропии Нрез, что свидетельствует о различной геометрии распределения накапливающихся кристаллических образований (в виде пленок, 3-х мерных структур, дисперсных наноразмерных зерен).

Следует отметить, что по данным литературы [5] период 7 дней после травмы характеризуется интенсивными процессами демиелинизации аксонов и увеличением количества макрофагов, которые способны утилизировать железо посредством ферритина и защищать клетки от гибели [6].

Изучение таких сигналов может быть важно, поскольку их амплитуда может отражать интенсивность патологического процесса демиелинизации нервных волокон, а оценка интенсивности сигналов в крови позволит контролировать интенсивность этих процессов в ходе лечения спинальных травм. Обнаруженный нами эффект согласуется с имеющимся в литературе предполагаемым механизмом развития тканевых молекулярных процессов. При этом применение метода ЭПР-спектроскопии позволит перейти к полуквантитативной оценке наблюдаемого явления.

Исследования методом ЭПР-спектроскопии проводили в КФТИ ФИЦ КазНЦ РАН в рамках выполнения госзадания.

1. Commoner B., Woolum J.C., Larsson E. Science 165, 703-704 (1969)
2. Milvy P., Kakari S. et al. Ann. of the New York Acad. of Sci. 222, 1102-1111 (1973)
3. Allen A.: JAMA (The Journal of The American Medical Association) 57, 878-80 (1911)
4. Rathore K. I., Kerr B.J. et al. Journal of Neuroscience, 28 (48) 12736-12747 (2008)
5. Plemel J. R., Keough M.B. et al. Progress in Neurobiology 117, 54-72 (2014)
6. Mesquita G., Silva T., Gomes A.C. et al. Scientific Reports. 10, 3061 (2020)

Хемилюминесцентный анализ антиоксидантной способности водных экстрактов йерба мате (*Plex paraguayensis*)

Теселкин Ю.О.^{1*}, Бабенкова И.В.¹, Осипов А.Н.¹
¹РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России;
teselkin-box@mail.ru

Известно, что водные экстракты из листьев и стеблей падуба парагвайского (*Plex paraguayensis*), обработанных по традиционной технологии и получивших название «йерба мате» (или «мате»), обладают широким спектром биологической активности: антидислипидемическими, антидиабетическими, противовоспалительными, кардиопротекторными, антибактериальными, противоопухолевыми, антиоксидантными и другими свойствами. Это послужило обоснованием для применения йерба мате в фармацевтической, пищевой промышленности, косметологии в ряде стран [1]. Полагают, что антиоксидантная способность (АОС) водных экстрактов мате обусловлена биологически активными веществами (БАВ) полифенольной природы, такими как кофеиновая кислота, хлорогеновая кислота, рутин, кверцетин, кемпферол. Всестороннее изучение АОС водных экстрактов мате с помощью различных радикалгенерирующих модельных систем позволит понять механизмы антиоксидантного действия мате *in vivo*. Большие возможности для изучения антиоксидантных свойств БАВ растительного происхождения предоставляет метод хемилюминесценции (ХЛ), который обладает высокой чувствительностью и позволяет проводить кинетические измерения.

Цель работы – исследовать АОС водных экстрактов мате с использованием метода кинетической ХЛ.

В качестве объекта исследования использовали мате торговой марки Amanda категории Desplada (La Cachuera S.A., Аргентина). Водные экстракты мате готовили на бидистиллированной воде, как описано в работе [2]. Однослойные липосомы формировали из яичных фосфолипидов (Fluka, Швейцария) в 50 мМ трис-НСl-буфере, содержащем 100 мМ КСl, рН 7,4.

При изучении АОС водных экстрактов мате регистрировали кинетику ХЛ в двух модельных системах: 1) окисление люминола, индуцированное 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлоридом (система АБАП-люминол) [3]; 2) липидная пероксидация суспензии липосом, индуцированная ионами Fe(II) [4].

АОС плазмы крови добровольцев определяли с помощью системы АБАП-люминол [2, 3]. Восемь практически здоровых добровольцев мужского пола в возрасте 34–50 лет были разделены на две группы по 4 человека в каждой. Первая группа натоцак принимала чайный напиток, приготовленный из 4 г мате, вторая – из 8 г мате.

Обнаружено, что введение в систему АБАП-люминол водного экстракта мате сопровождалось появлением латентного периода ХЛ, продолжительность которого была прямо пропорциональна количеству добавленного образца. Возникновение латентного периода вызвано тем, что БАВ мате перехватывают образующиеся в системе водорастворимые радикалы-инициаторы окисления люминола. Значение АОС водного экстракта мате, представленное в виде тролокс-эквивалента, составило в среднем 1,31 ммоль/г сухого растительного сырья. Нами исследована в тех же условиях АОС кверцетина, рутина, хлорогеновой и кофеиновой кислот, выявленных в водных экстрактах мате. Добавление этих веществ в систему АБАП-люминол также приводило к возникновению латентного периода ХЛ. АОС кверцетина (в тролокс-эквиваленте) не отличалась от АОС рутина и была в 1,2–1,3 раза выше, чем у хлорогеновой и кофеиновой кислот ($p < 0,05$).

При добавлении водного экстракта мате к суспензии липосом наблюдалось дозозависимое увеличение времени достижения максимума «медленной вспышки» ХЛ и понижение ее интенсивности. Это свидетельствует соответственно об уменьшении скорости окисления ионов Fe(II) и снижении скорости образования липидных радикалов. Аналогичный результат был получен при добавлении к липосомам классических радикальных ингибиторов – бутилгидрокситолуола и тролокса. Однако в отличие от радикальных ингибиторов при дальнейшем увеличении концентрации водного экстракта мате в суспензии липосом (более 2,5 мкг сухого растительного сырья/мл) имело место постепенное уменьшение времени достижения максимума «медленной вспышки» ХЛ, что характерно для действия железохелатирующих веществ (ЭДТА и дефероксамина) и обусловлено сокращением времени окисления ионов Fe(II) до «критической концентрации» [4]. Можно предположить, что БАВ, входящие в состав водного экстракта мате, обладают способностью перехватывать липидные радикалы и связывать ионы Fe(II). Было изучено влияние на Fe(II)-индуцированное свечение липосом кверцетина, рутина, кофеиновой и хлорогеновой кислот. Установлено, что в липосомальной модельной системе кверцетин действовал как радикальный ингибитор. Смешанный тип действия – радикалперехватывающий и железохелатирующий – наблюдался у рутина, кофеиновой и хлорогеновой кислот.

После однократного употребления чая мате у добровольцев первой группы (4 г мате) через 1 ч наблюдалась тенденция к повышению АОС плазмы крови по отношению к ее исходному значению – прирост АОС составил 7,4%. У добровольцев второй группы (8 г мате) через 1 ч АОС плазмы крови увеличилась на 14,5% ($p < 0,05$), через 2 ч увеличение составило 8,9% ($p < 0,05$).

Таким образом, АОС водных экстрактов йерба мате обусловлена радикалперехватывающими и железохелатирующими свойствами, которые, вероятно, определяют основные механизмы антиоксидантного действия йерба мате *in vivo*.

1. Gawron-Gzella A., Chanaj-Kaczmarek J., Cielecka-Piontek J. Yerba mate – a long but current history // *Nutrients*. 2021. Vol. 13, N 11. P. 3706.

2. 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 (*Ilex paraguariensis*) // *Biophysics*. 2021. Vol. 66, N 1. P. 125-132.

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, N 5. P. 708-716.

4. Teselkin Yu.O., Babenkova I.V., Kochetova A.A., Osipov A.N. Inhibitory effect of aqueous extract from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on the process of lipid peroxidation of liposomal membranes // *Biophysics*. 2022. Vol. 67, N 4. P. 541-548.

Хлораминовые производные аналогов аденозина – ковалентные ингибиторы функций тромбоцитов

Мурина М.А.^{1*}, Рощупкин Д.И.², Сергиенко В.И.¹

¹*Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия;*

²*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;*

marina_murina@mail.ru

В настоящее время доказана высокая эффективность ковалентных (необратимых) ингибиторов тромбоцитов (антиагрегантов) в предупреждении артериальных тромбозов. Ковалентные антиагреганты угнетают функции тромбоцитов посредством химической модификации молекулярных мишеней. Широкое применение в клинике находят ацетилсалициловая кислота (аспирин), реагирующая с простагландин H2-синтазой, и тиенопиридины, продукт метаболизма которых вступает в реакцию с сульфгидрильной группой рецептора АДФ. Нами обнаружено [1], что хлорамины таурина и аминокислот обладают способностью необратимо подавлять активность тромбоцитов. Были разработаны N-ацильные и N-алкильные производные хлорамина таурина, обладающие двумя важными свойствами: повышенной устойчивостью и хемоизбирательностью [2,3].

Настоящая работа направлена на разработку антитромботической субстанции из числа хлораминовых производных аналогов аденозина (ХПА). Мы полагали, что эффективность антиагрегантного действия хлораминового соединения усилится, если вначале произойдет его специфическое связывание с мембраной тромбоцита, а затем необратимая модификация мишени. В связи с этим, привлекают внимание ХПА, поскольку тромбоциты имеют на внешней поверхности специфические рецепторы к ряду структурных аналогов аденозина [4]. Была разработана методика получения хлораминовых производных в реакции гипохлорита натрия с раствором исходных соединений [5]. Далее были изучены реакционные свойства новых хлораминов, важные для проявления их антиагрегантной активности. Определены константы скоростей реакций исследуемых ХПА с серосодержащими соединениями (метионином, цистеином, ацетилцистеином, восстановленным и окисленным глутатионом, альбумином, фибриногеном). Получено, что ХПА проявляют повышенную реакционную способность по отношению к сульфгидрильной атомной группе. Установлено, что хлорамины аналогов аденозина проявляют специфическую фармакологическую активность как антиагреганты в трех клеточных системах. Они эффективно ингибируют агрегацию изолированных тромбоцитов, тромбоцитов в составе обогащенной тромбоцитами плазме и цельной крови при активации коллагеном или АДФ. Исследуемые хлорамины в микромолярных концентрациях вызывают угнетение функций тромбоцитов, не только ингибируя их агрегацию, но и подавляя реакцию выброса содержимого плотных гранул, а также индуцируя распад агрегатов тромбоцитов. Очевидно, что при введении ХПА в цельную кровь, они будут действовать не только на тромбоциты, но и на другие клетки крови. Для определения чувствительности эритроцитов и лейкоцитов к действию хлораминов были определены скорость гемолиза эритроцитов, и изменение скорости образования активных форм кислорода в суспензии нейтрофилов. Опыты с разбавленной суспензией эритроцитов показали, что гемолиз (наблюдаемый через 24 часа) возникает при высокой концентрации хлораминов: на один эритроцит приходится примерно 10^{11} молекул. В цельной крови сильное ингибирование агрегации тромбоцитов достигается, когда это соотношение примерно на 3 порядка ниже. Установлено, что исследуемые хлорамины не вызывают существенного подавления люминол-зависимой хемилюминесценции в суспензии нейтрофилов,

активированных форбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА). Так, при концентрации ХПА 100 мкМ интенсивность свечения снижается примерно лишь на 15%. В присутствии ХПА также не наблюдается усиления хемиллюминесценции в системе нейтрофилы – люминол без стимуляции клеток ФМА, т.е. сами хлорамины не активируют клетки. Таким образом, исследуемые хлорамины в крови действуют на тромбоциты избирательно: на уровне значительного ингибирования агрегационной активности тромбоцитов изменение свойств эритроцитов и лейкоцитов не происходит.

В работе исследовали модификацию белков системы коагуляции плазмы крови под действием ХПА. Коагуляцию инициировали тремя способами: контактным, введением тромбопластина (тканевого фактора) и введением тромбина. Оказалось, что в концентрациях, при которых происходит ингибирование агрегации тромбоцитов, исследуемые соединения не оказывают влияния на систему свертывания крови, т.е. не являются антикоагулянтами.

Антиагрегантное свойство хлораминовых аналогов аденозина, вероятно, обусловлено их способностью к модификации сульфгидрильной группы рецепторов плазматической мембраны. В действующих концентрациях аналоги хлорамина аденозина не оказывают существенного влияния на другие клетки крови.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00532.

Список использованных источников

1. Murina MA, Fesenko OD, Sergienko VI, Chudina NA, Roshchupkin DI. Antithrombotic activity of N,N-dichlorotaurine on mouse model of thrombosis in vivo. Bull Exp Biol Med. 2002; 134(1): 36-8. doi: 10.1023/a:1020600520233.

2. Roshchupkina DI, Buravleva KV, Murina MA, Sergienko VI. A fluorometric study of modification of bovine serum albumin with structural analogues of taurine chloramine. Biophysics. 2017; 62 (1): 24-30. DOI: 10.1134/S0006350917010171

3. Roshchupkin DI, Sorokin VL, Semenkova GN, Buravleva KV, Murina MA. The properties of biologically significant chloramine oxidants: reactivity and its dependence on the structure of the functional atom group. Biophysics. 2019; 64, (2): 145-154. DOI: 10.1134/S000635091902015

4. Lebon G, Warne T, Edwards PC, Bennett K, Langmead CJ, Leslie AG, Tate CG. Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. Nature. 2011; 474: 521-525. DOI:10.1038/nature10136.

5. Murina MA, Roshchupkin DI, Sergienko VI. The antiplatelet effect and chemical activity of N6-chloroadenosine phosphate. Biophysics. 2021; 66: 535-540. doi.org/10.1134/S0006350921040151.

Экзомы – внеклеточные частицы носители холестерина, не связанного с липопротеинами

Ланда С.Б.^{1,2*}, Верлов Н.А.¹, Федорова Н.Д.¹, Филатов М.В.¹, Пантина Р.А.¹, Бурдаков В.С.¹, Варфоломеева Е.Ю.¹, Эмануэль В.Л.²

¹ПНИЯФ|Петербургский институт ядерной физики им Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский Институт»;

²ПБСГМУ|Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова, Санкт-Петербург, РФ;

landa_sb@pnpi.nrcki.ru

Экзосомы и экзомы представляют собой мельчайшие микрочастицы диаметром от 20 до 130 нм. Они содержатся почти во всех биологических жидкостях. Экзосомы и экзомы представляют значительный интерес, поскольку они могут быть вовлечены в межклеточную передачу сигналов и являются биологическими маркерами состояния клеток, которые могут быть использованы для диагностики. Номенклатура микрочастиц до настоящего времени остается слабо разработанной. Большинство исследователей пытаются классифицировать их на основе способа образования, физико-химических характеристик и присутствия тетраспориновых маркеров CD9, CD63 и CD81.

Данные, представленные в этой работе, показывают, что, хотя экзомы несут биомаркеры CD9, CD63 и CD81, характерные для микрочастиц, они сильно отличаются от экзосом по размеру, плавучей плотности и липидному составу, особенно по содержанию холестерина. Продукция экзосом не коррелирует с апоптозом, то есть экзомы не являются продуктами клеточной гибели. Выработка экзосом клетками связана с синтезом холестерина клетками и ингибируется препаратами класса статинов, являющихся регуляторами синтеза мевалоната, промежуточного продукта метаболизма холестерина, в отличие от экзосом, образование которых

подавляется эзетемибом, ингибирующим пути доставки холестерина в клетку. Кроме того, в работе показано, что концентрация внеклеточных частиц в организме сильно коррелирует с концентрацией общей холестерина в плазме, но слабо коррелирует с концентрацией холестерина в липопротеинах. Это говорит о том, что не весь холестерин плазмы связан с липопротеинами, как считалось ранее.

Таким образом, экзомы не являются продуктом клеточной гибели и играют существенную роль в транспорте холестерина в плазме крови .

Экспрессия и внутриклеточная локализация HDAC3 и Akt/GSK-3 β в нейронах ганглиев дорсальных корешков после перерезки седалищного нерва

Дзряян В.А.^{1*}, Гузенко В.В.¹, Калюжная Ю.Н.¹

¹Южный Федеральный Университет;

dzreyan2016@mail.ru

Патологические воздействия, такие как ишемия или нейротравмы, снижают ацетилирование гистонов и негистоновых белков. Вероятно, это происходит в результате активации гистондеацетилаз (HDACs), что нарушает белковый синтез. Так как активация гистондеацетилаз и деацетилирование гистонов приводят к подавлению белкового синтеза, то можно рассматривать изменения экспрессии данных белков как начальные этапы патологического процесса. Но роль эпигенетических процессов в регуляции гибели и выживаемости клеток в первые часы после повреждения нервов пока не изучена.

Одна из важных экспериментальных моделей нейротравмы - перерезка седалищного нерва на бедре у грызунов, которая ведет к хроматолизу, Валлеровой дегенерации и апоптозу нейронов и глии. Перерезка седалищного нерва вызывает апоптоз глиальных клеток дорсальных ганглиев (dorsal root ganglia, DRG), удаленных на 2–3 см от места аксотомии. Пока неясно, какие первичные сигналы учувствуют в этой передаче, ведущей к выживаемости или смерти клетки?

Гистондеацетилаза HDAC3 в нейронах локализована главным образом в цитоплазме и активируется путем фосфорилирования серин/треонин киназы GSK-3 β , что представляет собой механизм, который обычно активируется потерей факторов роста в сигнальном пути PI3K/Akt. Ряд работ демонстрируют ключевую нейротоксическую роль HDAC3, однако специфичность активации HDAC3 при индукции гибели нейронов до конца не изучена. Поэтому представляет интерес исследовать сигнальный путь Akt/GSK-3 β , участвующий в фосфорилировании гистондеацетилазы 3 при нейротравме.

Цель работы. В настоящей работе предполагалось оценить внутриклеточную локализацию гистондеацетилазы HDAC3, а также киназ Akt/GSK-3 β в нейронах и глиальных клетках DRG после перерезки седалищного нерва крыс методом иммунофлуоресцентной микроскопии путем исследования ко-локализации этих белков с ядерным маркером нейронов NeuN.

Материалы и методы. Иммунофлуоресцентную микроскопию использовали для изучения вызванных аксотомией изменений экспрессии и локализации HDAC3, а также киназ Akt/GSK-3 β в ганглиях дорсальных корешков (DRG) спинного мозга крыс после перерезки седалищного нерва. Для детекции HDAC3 и киназ Akt/GSK-3 β методом иммунофлуоресцентной микроскопии мы использовали анти-HDAC3 (SAB4503481 Merck, 1:250); анти-Akt (#9272 Cell Signaling, 1:250); анти-GSK3-3 β (#9315 Cell Signaling, 1:250); антитело против фосфо-GSK-3 β (Ser9) (клеточная сигнализация #9323, 1:250) и антитело против NeuN (MAB377 Merck, 1:1000). Ядра всех нейронов и глиальных клеток визуализировали с помощью Hoechst 33342 (Cat. № 14533). Совместную локализацию белка-мишени с маркером нейрона NeuN оценивали с помощью программы ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) с помощью плагина JaCoP. Коэффициент совместной локализации M1 отражает долю пикселей в зеленых каналах (белок-мишень) относительно общего сигнала, зарегистрированного в красном канале (маркер нейрона NeuN). В расчетах было использовано не менее 100 клеток. Для количественной оценки среднего уровня флуоресценции E2F1 в экспериментальных и контрольных образцах DRG использовали 10 контрольных и 10 экспериментальных изображений для каждой из 7 крыс. Оценивали среднюю (по площади) флуоресценцию цитоплазмы и ядра для каждой клетки и полученные значения усредняли. Образцы DRG крыс фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus BX-51, оснащенного цифровой камерой OrcaFlash 4.0 V3 (Hamamatsu, Япония) при длинах волн возбуждения приблизительно 535 нм для анти-мышинного IgG1 (γ 1), меченного CF555, 488 нм для анти-кроличьего IgG (H+L), меченного CF488A и 365 нм для Hoechst-33342. Флуоресценцию регистрировали при длинах волн >580 нм и >460 нм соответственно. Уровень белка анализировали по интенсивности флуоресценции с использованием программного обеспечения ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, доступ на 4 декабря 2022 года).

Результаты. Метод двойного иммунофлуоресцентного окрашивания показал, что уровень HDAC3 в цитоплазме поврежденных DRG значительно сверхэкспрессируется уже через 1 час после аксотомии ($p < 0,01$), но снижается через 4 часа по сравнению с контрольными ганглиями ($p < 0,05$) и уровнем, определяемым через 1 час

($p < 0,01$). Через 24 часа после повреждения разницы не наблюдалось. В ядре аксотомированных DRG уровень HDAC3 увеличивался через 4 часа после перерезки седалищного нерва по сравнению с неповрежденными ганглиями крыс ($p < 0,01$), но не через 1 или 24 часа. Это свидетельствует о перераспределении HDAC3 из цитоплазмы в ядро через 4 часа после аксотомии седалищного нерва крысы, что также подтверждается коэффициентом M1 ($p < 0,05$). Согласно полученным данным, аксотомия седалищного нерва крыс вызывала достоверное снижение уровня Akt через 24 часа в цитоплазме клеток ганглиев (в 2 раза относительно контрольных ганглиев ($p < 0,01$) и в 1,5 раза относительно четырехчасовой группы ($p < 0,01$)). Уровень Akt в ядре при этом не изменялся и был низким. Уровень GSK3бета был низким и не изменялся на всем протяжении исследования, как в ядре, так и цитоплазме нейронов спинномозговых ганглиев крыс. Однако, по данным иммунофлуоресцентного анализа уровень phospho-GSK-3 β (Ser9) достоверно увеличивался через 24 часа в цитоплазме клеток аксотомированных спинномозговых ганглиях крыс ($p < 0,01$)).

Таким образом, наши данные свидетельствуют о вовлеченности HDAC3, а также сигнального пути Akt/GSK3бета в вызванное аксотомией повреждение нейронов и глиальных клеток DRG. Метод двойного иммунофлуоресцентного окрашивания показал, что перерезка седалищного нерва вызывает транслокацию HDAC3 из цитоплазмы в ядро в первые 24 часа после аксотомии. Антитело Akt #9272 подтверждает подавление экспрессии белка в DRG спинного мозга крыс после перерезки седалищного нерва. Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием антитела к фосфо-GSK-3 β (Ser9) #9323 указывают на активацию нисходящего пути при сниженной экспрессии самого Akt.

Работа выполнена при финансовой поддержке стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых.

Эффективность пассивного нацеливания наноразмерных носителей для лечения рака молочной железы

Постовалова А.С.^{2*}, Истомина М.С.¹

¹*Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России;*

²*Национальный исследовательский университет ИТМО;*

alisa_postovalova@mail.ru

Согласно данным, предоставленным международным агентством по изучению рака (МАИР), рак молочной железы у женщин является наиболее часто диагностируемым заболеванием с высокой распространенностью во всем мире [1]. Известно, что вследствие генетических нарушений, интенсивного деления раковых клеток, а также сопутствующего активного ангиогенеза, опухолевая ткань, при раке молочной железы, активно разрастается. Эти особенности могут быть использованы для нацеливания различных наноразмерных носителей, содержащих терапевтические агенты, для воздействия на опухолевую ткань с терапевтической целью. В связи с этим, особенно важно исследование ЭПР-эффекта – явления, объясняющего пассивное нацеливание и накопление наноразмерных носителей в опухолевом очаге. Благодаря правильно подобранным характеристикам таких носителей, осуществляется их накопление в пораженной ткани, что позволяет избежать токсичного воздействия терапевтического соединения на здоровые ткани, а также достигается его пролонгированное высвобождение из наночастиц [2]. В данной работе исследовали эффективность пассивного нацеливания и удержания системы доставки терапевтических агентов в опухоли на основе сферических наноразмерных частиц на основе оксида кремния.

Частицы на основе оксида кремния (SiO₂) размером 80 -120 нм, получали в результате синтеза из 4-х растворов: 99% этанола, отчищенной мили-м воды, 99% тетраэтилортосиликата (Тэос) и аммиака (NH₃) - в течение 2-часов активного перемешивания на магнитной мешалке. Меченные Су5 флуорофором наноразмерные носители использовали для визуализации их биораспределения *ex vivo*. Наночастицы были охарактеризованы с применением ДРС, световой микроскопии, оценены захват частиц клетками линии 4T1 (рак молочной железы), цитотоксичность. В Чтобы изучить биораспределение частиц органах (сердце, легкие, печень, селезенка, почки, опухоль), образцы вводили внутривенно, из расчета 100 мкл суспензии частиц на одно животное, мышам мышей balb/c с моделью рака молочной железы. Затем животных умерщвляли через 2, 6, 24, 48 часов после инъекции, и интенсивность флуоресцентного сигнала в органах анализировали с использованием системы флуоресцентной визуализации (IVIS Lumina II, PerkinElmer Inc., США). Визуализация распределения наноразмерных носителей была также оценена с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии и прямой радиометрии органов на счетчике гамма-излучения (Триатлер с детектором Окончателный, Hidex Oy, Финляндия). Для этого полученные в ходе химического синтеза частицы метили изотопом 99mTc. В эксперименте задействовали 15 животных. Экспериментальные работы проводились с соблюдением этических принципов, декларированных Европейской конвенцией по защите прав позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей. Для определения существенных различий между несколькими наборами экспериментальных данных были

использованы t-критерий Стьюдента и дисперсионный анализ. Значения $p < 0,05$ и $p^* < 0,005$ оказались статистически значимыми.

На самках линии Balb/c с модельной патологией 4T1 (рак молочной железы) отмечено накопление 3% частиц в опухоли. Отмечено наибольшее поглощение и удержание частиц опухолевыми клетками, а именно более 80%, происходит в печени. Помимо этого, часть частиц меньшего размера выводится из организма через почки и мочевыводящую систему. Оба метода визуализации наноразмерных частиц показали статистически идентичный процент их распределения. В связи с этим, каждая их методик визуализации может быть выбрана в качестве диагностической в зависимости от релевантности ее применения.

Таким образом, исследование биораспределения наноразмерных носителей на основе оксида кремния для терапии показывает пассивное нацеливание, накопление и удержание (ЭПР-эффект) частиц в опухолевой ткани, также отмечается и значительное накопление носителей в основных органах.

Благодарности: Работа была выполнена при поддержке государственного задания (FSEG-2022-0012).

Список литературы:

1. Sung H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // CA Cancer J Clin. 2021. Vol. 71, № 3. P. 209–249.

2. Patel J.K., Patel A.P. Passive Targeting of Nanoparticles to Cancer // Surface Modification of Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. Cham: Springer International Publishing, 2019. P. 125–143.

Эффективность фотодинамической терапии уропатогенных микроорганизмов

Елагин В.В.^{1*}, Игнатова Н.И.¹, Будруев И.А.², Антонян А.Э.¹, Буреев П.А.², Стрельцова О.С.¹,
Каменский В.А.^{1,3}

¹ПИМУ Минздрава России;

²Нижегородский государственный университет им. Лобачевского;

³Институт прикладной физики РАН;

elagin.vadim@gmail.com

Частое, длительное и бесконтрольное применение антибиотиков при лечении инфекций привело к увеличению числа бактериальных штаммов, устойчивых к широкому спектру антибиотиков. Устойчивые к антибиотикам бактерии, такие как *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.*, имеют большое значение в случае инфицированных камней мочевыделительной системы. Во время дробления камней бактерии попадают в полость органов и могут вызвать инфекционные осложнения (пиелонефрит, синдром системной воспалительной реакции, уросепсис). Антимикробная фотодинамическая терапия рассматривается как альтернатива антибиотикотерапии в случае локализованных инфекционных процессов. Целью данного исследования являлась оценка эффективности антибактериальной фотодинамической терапии в отношении уропатогенных микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам.

Микроорганизмы выделяли из почечных камней, предварительно отобранных по их рентгенологической плотности. Оценка восприимчивости бактерий к антибиотикам проводили с использованием метода дисковой диффузии. По изменению интенсивности флуоресценции было изучено накопление фотосенсибилизатора Фотодитазин микроорганизмами. Для этого ночную культуру микроорганизмов разводили до $2,5 \times 10^8$ КОЕ/мл в фосфатно-солевом буфере. Затем к бактериям добавляли фотосенсибилизатор, инкубировали в темноте при комнатной температуре и измеряли интенсивности флуоресценции. Для лазерного облучения 100 мкл суспензии бактерий переносили в 96-луночный планшет. Облучение образцов проводили оптоволоконным диодный лазером с длиной волны 662 нм в течение 9 минут с различной выходной мощностью.

Установлено, что $78,7 \pm 5,2$ % камней было контаминировано. При проверке чувствительности выделенных штаммов к 10 антибиотикам различного механизма действия показано, что данные штаммы обладали выраженной антибиотикорезистентностью. Штаммы *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecalis* были устойчивы ко всем исследуемым препаратам (0 чувствительных из 10). *Escherichia coli* обладала чувствительностью к нитрофуралу (1 из 10 чувствительных), а *Proteus mirabilis* имел промежуточную чувствительность к офлоксацину и нитрофуралу (2 промежуточных из 10). Исследование взаимодействия фотосенсибилизатора с микроорганизмами показало, что накопление фотосенсибилизатора зависело как от времени инкубации, так и от концентрации. Поскольку образцы были отмыты от несвязавшихся молекул фотосенсибилизатора, следовательно, флуоресценция обусловлена фотосенсибилизатором, который проник в клетки и/или связался с клеточной стенкой. Установлено, что интенсивность флуоресценции у грамотрицательных штаммов выше, чем у грамположительных, независимо от концентрации фотосенсибилизатора. Штаммы *E. faecalis* и *S. aureus* демонстрировали усиление интенсивности флуоресценции

в зависимости от времени с максимальными значениями через 60 мин. *E. coli* и *P. mirabilis* имели максимальное значение интенсивности флуоресценции через 30 мин и достоверно снижались к 60 мин. Установлено, что оптимальное время инкубации составляет 30 минут. Однако разрабатываемую методику планируется использовать во время литотрипсии, когда временной интервал ограничен; поэтому была выбрана инкубация в течение 15 мин. В дальнейшем использовали концентрацию фотосенсибилизатора 50 мкг/мл. После инкубации в темноте в течение 15 мин и последующих манипуляций (разведение, посев) при естественном освещении *S. aureus* и *E. faecalis* не давали роста колоний на чашках. Воздействие только лазерного излучения на грамположительные и грамотрицательные бактерии не вызывало снижения КОЕ. Выживаемость *P. mirabilis* при фотодинамической инактивации зависела от мощности. Количество жизнеспособных бактерий снижалось с 65% до 10% при увеличении мощности с 50 мВт до 150 мВт, а максимальный бактерицидный эффект достигался при 150 мВт.

Далее проводили оптимизацию методики антимикробной фотодинамической терапии для грамотрицательных видов. Эффективность аФДТ отмытых от несвязанного фотосенсибилизатора *E. coli* составила всего 5%. Добавление Твин 80 позволило незначительно повысить эффективность аФДТ до 9%. Эффективность аФДТ *E. coli*, инкубированных с фотосенсибилизатором и Тритоном X-100, достигла 52,5%. Установлено, что удаление фотосенсибилизатора из внеклеточной жидкости приводит к потере эффективности аФДТ. *K. pneumoniae* не обладала чувствительностью к аФДТ при отсутствии внеклеточного фотосенсибилизатора, тогда как в его присутствии составляла 89%. *E. coli* обладала низкой чувствительностью к аФДТ не зависимо от наличия фотосенсибилизатора во внеклеточной жидкости. *P. aeruginosa* имела высокую чувствительность к аФДТ при наличии внеклеточного фотосенсибилизатора, которая значительно снижалась при его отмывке. Эффективность аФДТ *P. mirabilis* после отмывки внеклеточного фотосенсибилизатора не изменилась. Показано, что эффективность аФДТ зависела от мощности лазера у всех исследованных видов, за исключением *K. pneumoniae*. Эффективность аФДТ *K. pneumoniae* не превышала 93%. При облучении других видов бактерий с мощностью 450 мВт эффективность аФДТ составляла 99,99%. Для проверки эффективности разработанной методики аФДТ образцы инфицированной мочи пациентов инкубировали с фотосенсибилизатором и Тритоном X-100 в течение 15 минут в темноте. Затем, не удаляя фотосенсибилизатор, облучали лазером с выходной мощностью 450 мВт. Эффективность аФДТ инфицированных культур мочи составила не менее 99,996%.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект №21-15-00371

Эффекты блокатора синтеза NO NO-синтазы L-name на формирование долговременной памяти на обстановку у улитки

Дерябина И.Б.^{1*}, Андрианов А.В.¹, Богодвид Т.Х.^{1,2}, Муранова Л.Н.¹, Хабиб З.С.¹, Гайнутдинов Х.Л.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

²Поволжская академия физической культуры, спорта и туризма;

IBDeryabina@kpfu.ru

Одним из наиболее важных посредников, который участвует в функционировании разнообразных систем организма, является оксид азота (NO). Существует большое количество доказательств участия NO в процессах, связанных с пластичностью [1, 2]. У моллюсков оксид азота играет роль межклеточного мессенджера и сигнальной молекулы. Все эксперименты проводились на виноградных улитках *Helix lucorum*. У животных вырабатывали обстановочный условный рефлекс (ОУР) по контекстуальной парадигме «на шаре» - в ситуации, при которой раковина животных жестко крепилась к штативу в одном положении, но при этом у них сохранялась свобода передвижения по поверхности шара, плавающего в воде. Обучение заключалось в предъявлении безусловного стимула (электрическое раздражение) при нахождении улитки в этом определенном контексте - на шаре. Обучение производили по протоколу: предъявление 5-ти электрических раздражений в день на протяжении 5 дней прикосновением двух металлических электродов – которые вручную подносили к задней и передней дорзальной части ноги. Параметры электрической стимуляции: прямоугольные импульсы тока частотой 50 Гц, сила тока 1-2 мА, продолжительность стимуляции - 1 с. Время между стимулами составляло 15-20 минут [3, 4]. Сила тока стимуляции подбиралась достаточной для запуска оборонительной реакции, связанной с втягиванием головы и передней части тела, и не превышала 2 мА. На время процедуры обучения (5 дней), улитки не получали пищу [5]. До начала обучения и последующие дни после обучения проводили тестирование. Для этого измеряли амплитуду втягивания омматофор в ответ на тактильную стимуляцию, которая представляла собой касательное движение волоска кисточки по кожному покрову дорзальной стороны передней части ноги со стандартной скоростью. ОУР считался сформированным, если реакция на шаре значительно превышала таковую на плоской поверхности. Результаты были статистически обработаны, они представлены как среднее ± SEM.

Достоверность различий оценивали по t- критерию Стьюдента и U- критерию Манна-Уитни. Была использована программа SigmaStat32. Статистическая значимость оценивалась по $p < 0.05$. На следующий день, после теста, подтверждающего выработку УОР, животных поделили на четыре группы. Животным первой группы, инъецировали блокатор NO-синтазы L-NAME за 30 мин до процедуры напоминания с последующей инъекцией анизиомина (AN). Напоминание – это помещение животных на шар на 20-30 мин., как при выработке УОР, но без предъявления тактильных и электрических стимулов. Второй группе животных инъецировали блокатор NO-синтазы L-NAME за 30 мин до процедуры напоминания. Третьей группе проводили процедуру напоминания с последующей инъекцией AN. Четвертой, контрольной группе после процедуры напоминания, инъецировали ФР. Полученные результаты показывают, что инъекция ФР после процедуры напоминания обстановки, не приводит к изменению величины оборонительной реакции на тактильное раздражение при тестировании на шаре, в то же время инъекция AN после напоминания приводили к полному забыванию сформированной памяти. Введении блокатора NO-синтазы L-NAME за 30 мин до процедуры напоминания с последующей инъекцией анизиомина (AN), не приводит к снижению величины оборонительной реакции на тактильное раздражение при тестировании на шаре. Группе которой инъецировали L-NAME за 30 мин до процедуры напоминания без блокады белкового синтеза, продемонстрировала постепенное снижения величины с 77,9 % до 48,2%. в контексте на шаре. Значения тестов на плоскости у всех экспериментальных групп достоверно не отличались. Эти результаты указывают на то, что NO участвует в процессе обучения памяти, но возможно блокирование NO-синтазы препятствуют запуску процесса реконсолидации.

Работа поддержана Программой стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

1. Antonov I., Ha T., Antonova I., Moroz L.L., Hawkins R.D. Role of nitric oxide in classical conditioning of siphon withdrawal in *Aplysia* // *J. Neurosci.* – 2007. – V. 27. – N 41. – P. 10993–11002.

2. Balaban P.M., Roshchin M.V., Timoshenko A.Kh., Gainutdinov Kh.L., Bogodvid T.Kh., Muranova L.N., Zuzina A.B., Korshunova T.A. Nitric oxide is necessary for labilization of a consolidated context memory during reconsolidation in terrestrial snails // *Eur. J. Neurosci.* – 2014. – V. 40. – P. 2963–2970.

3. Bogodvid T.Kh., Andrianov V.V., Muranova L.N., Gainutdinov Kh.L. Influence of nitric oxide donors on electrical characteristics of the premotor interneurons of terrestrial snails. // *BioNanoScience.* – 2016. – V. 6. – N 4. – P. 320-321

4. Deryabina I.B., Muranova L.N., Andrianov V.V., Bogodvid T.Kh., Gainutdinov Kh.L. Effects of thryptophan hydroxylase blockade by p-chlorophenylalanine on contextual memory reconsolidation after training of different intensity. // *Intern. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. 2087.

5. Гайнутдинова Т.Х., Тагирова Р.Р., Исмаилова А.И., Муранова Л. Н., Гайнутдинов Х.Л., Балабан П.М. Зависимая от белкового синтеза реактивация обстановочного условного рефлекса у виноградной улитки. // *Журн. высш. нервн. деят.* – 2004. – Т. 54, № 6. – С. 795-800.

Эффекты муцина при активации нейтрофилов микрочастицами монтмориллонита *in vitro*

Михальчик Е.В.¹, Фирова Р.Х.¹, Клинов Д.В.^{1,2}, Краевский С.В.^{1,3}, Морозова О.В.^{1,2,4}, Образцова Е.А.^{1,5}, Филатова Л.Ю.⁶, Балабушевич Н.Г.⁶, Панасенко О.М.^{1*}

¹Отдел биофизики, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, 119435 Москва, Россия;

²Лаборатория биоматериалов, Университет науки и технологии Сириус, 354340 Сочи, Россия;

³Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121 Москва, Россия;

⁴Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени академика Н.Ф. Гамалеи, 123098 Москва, Россия;

⁵Московский физико-технический институт, 141701 г. Долгопрудный, Московская обл., Россия;

⁶Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия;
o-panas@mail.ru

Монтмориллонит (ММ) – это пористый природный глинистый материал, относящийся к подклассу смектитов и состоящий из гидроксида кремния с ионами магния, алюминия и др., с высокой сорбционной способностью, обуславливающей его эффективность в качестве энтеросорбента и перспективного средства доставки лекарств, в том числе, и благодаря биосовместимости, превышающей показатели для других

наноматериалов [1]. В кишечнике он может способствовать развитию микроорганизмов-пробиотиков и проявлять защитные свойства в отношении слизистой оболочки [2].

При воспалительных заболеваниях кишечника местные эффекты ММ могут зависеть от взаимодействия между минеральными частицами и нейтрофилами, инфильтрующими стенку кишечника. Известно, что ММ вызывает быстрый лизис нейтрофилов в отсутствие белков сыворотки крови, предположительно, вследствие электростатических взаимодействий между поверхностью частиц и фосфолипидами клеточной мембраны, сопровождающихся активацией дыхательного взрыва нейтрофилов [3]. Адсорбированные на частицах белки сыворотки предотвращают лизис нейтрофилов и их активацию, однако эффекты муцина, основного компонента слизистых оболочек, не были изучены. Ранее мы показали, что муцин способен оказывать провоспалительное действие на нейтрофилы в случае его адсорбции минеральными частицами ватерита [4] и фосфата кальция [5]. Нашей целью было изучение эффектов муцина при активации нейтрофилов микрочастицами ММ *in vitro*.

Методы исследования. Оценка адсорбции муцина по убыли его концентрации в растворе после инкубации с ММ и ее визуализация с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ); анализ активации дыхательного взрыва изолированных нейтрофилов крови человека по образованию супероксидного радикала, детектируемого методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции (люц-ХЛ); определение цитотоксичности ММ методом прямого подсчета клеток в камере Горяева; оценка поверхностного заряда с помощью дзета-сайзера.

Результаты. Микрочастицы ММ, дзета-потенциал которых составлял -30 ± 3 мВ, стимулировали выброс супероксидного радикала нейтрофилами, одновременно вызывая лизис 50-70% клеток; при этом величина люц-ХЛ ответа была пропорциональна концентрации целых клеток в пробах. Была показана быстрая сорбция 90% добавленного в пробу люцигенина (52 ± 7 нмоль/мг ММ) без непосредственного влияния на величину люц-ХЛ. Обработка ММ раствором муцина приводила к связыванию гликопротеина, которое варьировало в диапазоне 2 – 17 мкг/мг ММ. По данным СЭМ, выявлялись частицы, не связавшие муцин; с мозаичными участками связывания; полностью покрытые муцином. Связывание муцина с ММ не влияло на последующую адсорбцию люцигенина, и только при максимальном связывании муцина было выявлено снижение лизиса клеток в пробах при измерении ХЛ (на $23 \pm 13\%$). При этом величина люц-ХЛ была пропорциональна концентрации целых клеток, как и в случае частиц ММ, необработанных муцином, то есть специфическое усиление активации нейтрофилов за счет адсорбированного муцина отсутствовало, в отличие от эффектов муцина, сорбированного на микрочастицах карбоната и фосфата кальция [4, 5]. Зависимость эффектов сорбированного муцина от природы минеральных частиц связана, по-видимому, с различиями в механизмах взаимодействия частиц с мембраной нейтрофила.

Выводы. Муцин, связываясь с частицами ММ, частично предотвращает лизис нейтрофилов, не вызывая при этом усиления продукции ими супероксидного радикала. Отсутствие провоспалительного действия сорбированного на ММ муцина является важным условием безопасного перорального применения этих минеральных частиц.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 23-45-10026).

Литература

1. Gaharwar A.K., Mihaila S.M., Swami A., Patel A., Sant S., Reis R.L., Marques A.P., Gomes M.E., Khademhosseini A. Bioactive silicate nanoplatelets for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Adv. Mater.* 2013, 2524, 3329–3336.
2. Park J.H., Shin H.J., Kim M.H., Kim J.S., Kang N., Lee J.Y., Kim K.T., Lee J.I., Kim D.D. Application of montmorillonite in bentonite as a pharmaceutical excipient in drug delivery systems. *J. Pharm. Investig.* 2016, 46, 363-375.
3. Dougherty S.H., Fiegel V.D., Nelson R.D., Rodeheaver G.T., Simmons R.L. Effects of soil infection potentiating factors on neutrophils *in vitro*. *Am. J. Surg.* 1985, 150, 306-311.
4. Mikhailchik E., Basyreva L.Y., Gusev S.A., Panasenکو O.M., Klinov D.V., Barinov N.A., Morozova O.V., Moscalets A.P., Maltseva L.N., Filatova L.Y., Pronkin E.A., Bespyatykh J.A., Balabushevich N.G. Activation of neutrophils by mucin-vaterite microparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 10579.
5. Mikhailchik E.V., Boychenko O.P., Moskalets A.P., Morozova O.V., Klinov D.V., Basyreva L.Yu., Gusev S.A., Panasenکو O.M., Filatova L.Yu., Balabushevich N.G. Stimulation of neutrophil oxidative burst by calcium phosphate particles with sorbed mucin. *Rus. Open Med. J.* 2021, 10, CID e0428.

Биофизическое образование

Использование информационных технологий в физическом практикуме медицинского вуза

Лысенко Е.П.^{1*}, Резников И.И.¹
¹РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России;
elysenko1@mai.ru

В курсе медицинской и биологической физики на кафедре физики и математики РНИМУ им. Н.И. Пирогова в разделе «Медицинская аппаратура» студенты знакомятся с классификацией медицинской аппаратуры; общей схемой съёма, передачи и регистрации медико-биологической информации; устройствами съёма и преобразования медико-биологической информации (электродами и датчиками); классификацией датчиков и их характеристиками. Принцип работы датчиков и их характеристики (функцию преобразования, чувствительность) студенты изучают, выполняя лабораторную работу с использованием макетов двух параметрических датчиков: тензорезисторного и индуктивного. В лабораторной работе «Изучение работы электрокардиографа» студенты знакомятся со структурной схемой электрокардиографа, записывают ЭКГ в трёх стандартных отведениях от имитатора ЭКГ; вычисляют характеристики ЭКГ (высоты зубцов; длительности интервалов, угол наклона дипольного момента «сердца»), а также снимают частотную характеристику усилителя электрокардиографа и знакомятся с возможными частотными и амплитудными искажениями сигналов в усилителях.

Для знакомства студентов с современными методами сбора, представления и обработки медико-биологической информации на кафедре физики и математики были разработаны лабораторные работы с использованием систем MacLab и LabVIEW.

В работе «Использование системы MacLab - Macintosh для автоматизации кардио-гемодинамических исследований» проводились регистрация и стандартный анализ ЭКГ, а также выполнялся спектральный анализ ЭКГ и оценивалась вариабельность R-R интервалов; определялась скорость распространения пульсовой волны при помощи методов электрокардиографии и сфигмографии. Вариабельность R-R интервалов оценивалась методом построения графиков Пуанкаре, которые выражают зависимость значений текущего R-R интервала от R-R интервала, непосредственно предшествующего ему. Из этих графиков получали гистограммы R-R интервалов и delta R-R интервалов. Анализ графиков Пуанкаре является клиническим методом для количественной оценки вариабельности ЧСС и позволяет оценить сложные воздействия различных ветвей нервной системы на сердечную активность.

Использование системы LabVIEW позволило с помощью специальных датчиков регистрировать и обрабатывать на компьютере различные физические величины: биопотенциалы, артериальное давление, температуру и др. На одном компьютере создавались любые комбинации различных электронных приборов, таких как генераторы, осциллографы, вольтметры, частотомеры и т.п. При этом существенно улучшалась визуализация полученных результатов на дисплее компьютера и была возможна регистрация полученных данных в электронном журнале. Несколько лабораторных работах с использованием компьютерной системы LabVIEW были посвящены изучению электрических методов измерения мышечных усилий; мониторингованию температуры тела в различных точках термисторным датчиком; изучению метода ультразвуковой эхолокации; регистрации и анализу спектральной характеристики уха на пороге слышимости; изучению физических основ получения и обработки электрокардиограмм.

Литература

Резников И.И., Лысенко Е.П. Руководство к лабораторным работам с использованием программирования LabVIEW. М, ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава РФ, 2018, 59 с.

**Кафедра биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета:
научно-образовательные процессы, их организаторы и партнеры**

Артюхов В.Г.^{1*}, Антипов С.С.¹, Калаева Е.А.¹, Наквасина М.А.¹
¹*Воронежский государственный университет;*
artyukhov@bio.vsu.ru

В настоящее время кафедра биофизики и биотехнологии Воронежского госуниверситета является выпускающей для обучающихся по направлениям 06.03.01 Биология, профиль Биофизика (очная и очно-заочная форма обучения), 06.04.01 Биология, профиль Биофизика, 06.06.01 Биологические науки, профиль Биофизика и специальностям 30.05.02 Медицинская биофизика и 30.05.03 Медицинская кибернетика.

Выпускники-бакалавры профиля «Биофизика» готовятся к научно-исследовательской деятельности в области биотехнологии, медицины, сельского хозяйства, экологии и охраны природы, молекулярно-клеточной биологии, иммунологии. План профильной подготовки бакалавров (2-4 курсы) включает дисциплины: «Современные методы биофизических исследований», «Биофизика мембранных и клеточных процессов», «Физика ферментов», «Компьютерные исследования и моделирование биопроцессов», «Спецпрактикум», «Структура и функции биомакромолекул и их комплексов», «Радиационная и фотобиофизика», «Биомедицинские нанотехнологии». Арсенал разнообразных практик включает и учебную научно-исследовательскую на базе кафедры и академических институтов РАН в г. Пушкино-на-Оке.

Выпускники магистратуры по направлению подготовки «Биология» по профилю «Биофизика» подготовлены к научно-исследовательской и педагогической деятельности в области общей и медицинской биофизики, биоинформатики, молекулярной биологии, биотехнологии. План подготовки магистров включает спецдисциплины: «Молекулярная биология и биофизика», «Регуляция межклеточных процессов и взаимодействий», «Фотофизика, фотохимия и фотоиммунология компонентов крови», «Внутриклеточные сигнальные пути и способы их регуляции», «Основы коммерциализации биофизических исследований». В течение всего периода обучения осуществляется научно-исследовательская работа.

Обучение по укрупненной группе специальностей 30.00.00 Фундаментальная медицина началось на медико-биологическом факультете Воронежского госуниверситета в 2016 г., в 2022 г. состоялся первый выпуск врачей-биохимиков и кибернетиков, в 2023 г. будут выпущены первые врачи-биофизики.

Организация учебного процесса студентов медицинского отделения Воронежского госуниверситета отличается от такового в медицинских вузах, поскольку обучающиеся в большей степени, чем выпускники "классических" медицинских институтов и университетов, ориентированы на научно-исследовательскую деятельность. Последнее подразумевает преподавание фундаментальных дисциплин (биологии, химии, физики, информатики и т.д.) не только и не столько в качестве обязательной базы высшего образования, а их тесную интеграцию с классическими клиническими дисциплинами, наличие синтетических курсов («Медицинская биофизика», «Математическая статистика в медицине», «Физиологическая кибернетика», «Клиническая кибернетика», «Биофизические основы функциональной диагностики», «Информационные медицинские системы», «Компьютерный анализ медицинских данных и изображений» и т. д).

Реализация качественного биофизического образования в университете невозможна в настоящее время без участия внешних партнеров: муниципальных образовательных учреждений среднего общего образования (10-11 классы), потенциальных работодателей, академических научно-исследовательских институтов.

Так, сотрудники кафедры биофизики и биотехнологии ВГУ проводят лекционные и практические занятия с учащимися старших классов, участвуют в подготовке индивидуальных исследовательских проектов со старшеклассниками на базе кафедры. Это позволяет не только расширить и углубить знания учащихся в области физико-химической биологии, но и сформировать индивидуальную научно-образовательную траекторию будущего абитуриента, а также адаптировать его к научно-исследовательской работе в университете. Старшеклассники представляют индивидуальные научно-исследовательские проекты на университетских конференциях естественнонаучного цикла (в частности, «Лиге инноваций» ВГУ), победа в которых дает дополнительные баллы для поступления.

Привлечение потенциальных работодателей к осуществлению учебного процесса в бакалавриате позволяет значительно повысить уровень профессиональной компетентности выпускников. Примером взаимовыгодного сотрудничества является взаимодействие кафедры биофизики и биотехнологии ВГУ с компаниями «ЭФКО», «BioCad» и другими биотехнологическими и фармацевтическими предприятиями реального сектора экономики. Студенты кафедры получают возможность пройти стажировку на базе этих предприятий без отрыва от учебного процесса в период каникул с компенсацией расходов на проживание и оплатой труда.

На этапе подготовки магистров и аспирантов помимо привлечения предприятий реального сектора экономики, академических научно-исследовательских институтов, целесообразно привлечение обучающихся к

деятельности профессиональных научных сообществ, участию в конкурсах на выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ.

Результаты такого сотрудничества – трудоустройство квалифицированных выпускников кафедры в ведущие академические НИИ и предприятия реального сектора экономики и эффективное продвижение по «карьерной лестнице», интеграция научной деятельности кафедры в решение прикладных задач предприятий и крупные фундаментальные исследования академических организаций на территории России и за ее пределами.

Сотрудничество с внешними партнерами, интенсивные коммуникации с научными учреждениями, научно-производственными предприятиями, медицинскими организациями, многоуровневая подготовка специалистов-выпускников, постоянное совершенствование научно-педагогической квалификации сотрудников, укрепление материально-технической базы кафедры и повышение уровня финансирования работы – основа современного научно-образовательного процесса кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета.

Компьютерная реконструкция сетей белок-белковых взаимодействий: образовательные и исследовательские аспекты

Орлов Ю.Л.^{1,2,3*}, Туркина В.А.¹, Орлова Н.Г.⁵, Анашкина А.А.^{4,1}, Савина Е.А.¹

¹*Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);*

²*Российский Университет Дружбы Народов;*

³*Институт цитологии и генетики СО РАН;*

⁴*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН;*

⁵*Финансовый Университет при Правительстве РФ;*

y.orlov@sechenov.ru

Биофизическое образование требует использования современных компьютерных средств для моделирования белок-белковых взаимодействий. Использование онлайн-инструментов биоинформатики позволяет реконструировать и белковые и геновые сети, отрабатывать навыки моделирования для студентов. Мы рассматриваем вопросы компьютерной реконструкции геновых сетей – комплексов взаимодействующих макромолекул – по списку генов, ассоциированных с тем или иным заболеванием, или комплексным расстройством на основе общедоступных онлайн-инструментов биоинформатики – STRING-DB, GeneMANIA, приложений Metascape, Cytoscape. Представлены примеры компьютерного построения и визуализации геновых сетей онкологических заболеваний – глиомы, рака молочной железы, а также сложных метальных расстройств, таких как болезнь Паркинсона, шизофрения, которые были опубликованы в соавторстве со студентами в российских и международных журналах в за последние годы [1,2,3].

Использование только онлайн-инструментов биоинформатики имеет учебный характер, ориентировано на студентов, как математического профиля, так и естественно-научных и медицинских дисциплин, у которых недостаточно навыков в информатике, программировании, написании собственного кода. Автоматическое построение списков генов, ассоциированных с заболеванием с использованием открытых баз данных (OMIM, GeneCards.org, MalaCard.org), компьютерная реконструкция геновых сетей, расчеты статистики обогащенности категорий геновых онтологий успешно освоены студентами и представлены в серии дипломных работ и научных публикаций. Рассмотрены проблемы освоения студентами учебных материалов на основе преподавания в НГУ, ДВФУ, РУДН, Финансовом Университете при Правительстве РФ, Первом МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России.

Задачи цифровизации медицины, освоения ИТ-технологий являются приоритетными в России. Существовавшая последние годы эпидемическая ситуация и вынужденный переход на дистанционное обучение ускорили принятие мер по изменению форматов образования, появлению новых учебных платформ [4]. Отдельный интерес представляет компьютеризация и автоматизация преподавания собственно дисциплин связанных с информатикой, в том числе в медицине – в областях телемедицины, электронного здравоохранения [5].

Вопрос разработки учебных курсов биофизики и биоинформатики связан с необходимостью адаптации обучения к профилю образования студентов и слушателей. По опыту работу преподавания биоинформатики студентам-математикам требуется не только другая подача материала, но и сама методика, в отличие от студентов медиков и студентов естественно-научных специальностей. Отметим ряд качественно новых задач образования в области цифрового здравоохранения, таких как использование блокчейн-технологий, использования методов Искусственного Интеллекта (ИИ) в поддержке принятия врачебных решений [5]. Разработан образовательный курс, который включает теоретическую часть (прослушивание курса в форме

лекций, видеоуроков) и практическую часть - выполнение заданий по использованию компьютерных программ и баз данных, нашедших ряд применений для медицинских задач по реконструкции и анализу сетей взаимодействий макромолекул [1,6,7].

Благодарности: Проект реализуется победителем грантового конкурса для преподавателей магистратуры 2021/2022 Стипендиальной программы Владимира Потанина.

Литература

1. Дохойн А.Ю., Глушенко М.В., Орлов Ю.Л. Реконструкция геной сети шизофрении для поиска генов-мишеней. Ульяновский медико-биологический журнал. 2022; 3: 6–22. doi: 10.34014/2227-1848-2022-3-6-22.
2. Орлов Ю.Л., Галиева А.Г., Орлова Н.Г., Иванова Е.Н., Мозылева Ю.А., Анашкина А.А. Реконструкция геной сети болезни Паркинсона для поиска генов-мишеней. Биомедицинская химия. 2021; 67(3): 222-230 doi: 10.18097/PBMC20216703222
3. Gubanova N.V., Orlova N.G., Dergilev A.I., Oparina N.Y., Orlov Y.L. Glioblastoma gene network reconstruction and ontology analysis by online bioinformatics tools. Journal of Integrative Bioinformatics. 2021; 18:20210031. doi: 10.1515/jib-2021-0031
4. Orlov Y.L., Anashkina A.A., Klimontov V.V., Baranova A.V. Medical Genetics, Genomics and Bioinformatics Aid in Understanding Molecular Mechanisms of Human Diseases. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(18):9962. doi: 10.3390/ijms22189962
5. Koshechkin K.A., Lebedev G.S., Fartushnyi E.N., Orlov Y.L. Holistic Approach for Artificial Intelligence Implementation in Pharmaceutical Products Lifecycle: A Meta-Analysis. Applied Sciences. 2022; 12(16):8373. doi: 10.3390/app12168373
6. Dergilev A.I., Orlova N.G., Dobrovolskaya O.B., Orlov Y.L. Statistical estimates of multiple transcription factors binding in the model plant genomes based on ChIP-seq data. J Integr Bioinform. 2021;19(1):20200036. doi: 10.1515/jib-2020-0036.
7. Тийс Р.П., Осипова Л.П., Галиева Э.Р., Личман Д.В., Воронина Е.Н., Мелихова А.В., Орлов Ю.Л., Филипенко М.Л. Полиморфизм вариантов гена N-ацетилтрансферазы 2 (NAT2) и анализ геной сети. Биомедицинская химия. 2021; 67(3): 213-221 doi:10.18097/PBMC20216703213

Курс “История биологии и биофизики” как инструмент самоопределения студента-биофизика в научной деятельности

Самойлова А.А.^{1,2*}, Кратасюк В.А.^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет;

² Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»;

samalice@mail.ru

В настоящее время в интересы государства входит привлечение в исследовательскую сферу талантливой молодежи, о чем говорит, например, инициация нового федерального проекта «Популяризация науки и технологий» и другие программы.

Успех в воспитании молодого ученого заключается в выстраивании цепочки школьник - студент младших курсов - студент старших курсов и/или выпускник бакалавриата - магистрант - аспирант - молодой ученый. Именно такой подход реализует кафедра биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета.

С каждой из перечисленных категорий исследователей можно и нужно работать в определенной специфике.

В этой взаимосвязи для решения одной из задач - задачи вовлечения студентов-первокурсников в научно-исследовательскую деятельность - на кафедре биофизики Сибирского федерального университета разработаны курсы “История Биологии” и “История биологии и биофизики” соответственно для студентов направления Биология (распределение которых на специальность Биофизика происходит после 2 курса) и студентов направления Физика, специальности Биохимическая физика (набор с 1 курса).

Курс для обеих специальностей проходит в 1 семестре на 1 курсе обучения и составляет 108 з.е. Он реализован в смешанной модели обучения (blended learning) с использованием электронной информационной образовательной среды СФУ на базе LMS Moodle, что позволяет комбинировать работу в цифровой среде с классическими лекционными, а также семинарскими занятиями - дискуссиями, игровыми и творческими заданиями в очном режиме, выступлениями с докладами и т.д.

Дисциплина включает три основных блока:

- от протоэволюции к естественной истории (от первобытного общества к эпохе Возрождения);

- от естественной истории к современной биологии (биология Нового времени до середины XIX в.);
- становление и развитие современной биологии (с середины XIX в. до начала XXI в.).

В ходе курса рассматриваются как исторические факты - великие открытия, повлиявшие на развитие биологии и биофизики, появление и преобразование научных знаний и концепций, так и философские проблемы методологии науки. На занятиях рассуждают о критериях научного познания, роли ошибок и научных заблуждений в следующих за ними исследованиях, этических аспектах в науке, науке как социальном институте.

Для лучшего усвоения курса студенту предлагается представить себя в роли великого ученого или сравнить его и свои черты характера при подготовке доклада об ученом.

В третьем модуле в рамках курса студенты знакомятся с деятельностью современных научных деятелей. Это могут быть лектории, встречи, семинары по актуальным тематикам, научные и научно-популярные мероприятия. Такой подход позволяет обучающимся встретиться с передовыми разработками и открытиями современности, узнать истории успеха современников. Отдельно на практике с каждым студентом прорабатывается научный метод, проектная деятельность, грантовые заявки, анализ научной статьи, принципы представления научной работы - доклады и презентации.

В конце семестра студентам предлагается пройти опрос, целью которого является оценка адаптации студента в институте и готовности заниматься научной деятельностью.

Был опрошен 181 студент с 2021 по 2023 учебные года. Ответы на вопрос “Возникло ли у Вас желание стать ученым?” распределились следующим образом:

да - 128 (71%)

нет - 53 (23%)

Нужно отметить, что часть студентов и ранее изъявляли желание быть ученым, но часто в процессе обучения укреплялись в своем выборе.

Таким образом, предложены новые принципы и методологические подходы привлечения молодежи к занятиям научными исследованиями в биофизике, механизмы переноса биофизических знаний в образовательный процесс. Предложенные подходы реализованы в рамках курсов “История биологии” и “История биологии и биофизики” для решения проблем самоопределения молодого поколения в области биофизики.

Методическое обеспечение дистанционных занятий по медицинской и биологической физике

Дигурова И.И.^{1*}, Мачнева Т.В.¹, Дигурова А.И.¹

¹РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России;

digurova56@mail.ru

Система образования в наибольшей степени испытала ограничения и необходимость выполнения требований карантина во время пандемии COVID - 19 [1]. Вынужденный переход на удаленное обучение сделал актуальным вопрос о методическом обеспечении дистанционных занятий. На кафедре физики и математики РНИМУ им. Н. И. Пирогова при изучении дисциплины «Медицинская и биологическая физика», как при традиционном аудиторном, так и при удаленном обучении студенты могут воспользоваться, кроме учебников, видеолекциями и методическими разработками по темам занятий. Для дистанционного проведения лабораторного практикума на кафедре были подготовлены видео презентации или презентации со звуковой «дорожкой» и карточки с заданиями по практической части лабораторных работ. Однако такой комплект, на наш взгляд, не является достаточным. При изучении физики и биофизики в медицинском университете нередко приходится сталкиваться со сниженной мотивацией, что особенно заметно при дистанционной работе. При проведении занятий в режиме онлайн возрастает роль наглядности. Еще одной проблемой является проведение удаленного модульного контроля. В связи с этим нами были разработаны и опробованы комплекты методических материалов к дистанционным лабораторно - практическим занятиям по медицинской и биологической физике, проводимым в режиме реального времени.

Повышению заинтересованности учащихся способствует, в первую очередь, подбор профильных задач, связанных с диагностическим и лечебным применением физических факторов, изучением организма с точки зрения физики, работой медицинских приборов. Как и при традиционных занятиях, материалы подбирались с учетом направления подготовки студентов (лечебное дело, педиатрия или стоматология). По каждой теме были сделаны презентации по решению профессионально ориентированных задач по медицинской физике и биофизике. С учетом обучения студентов нефизических специальностей, использовались несложные задания тренировочного типа с подробным разбором решения. Также для усиления мотивации представлялось полезным составление схем, демонстрирующих межпредметные связи и возможности практического применения изучаемых явлений в медицине [2]. Для повторения основных теоретических вопросов использовались

презентации с небольшим количеством слайдов, не дублирующие лекции, но акцентирующие внимание учащихся на наиболее важных вопросах. В дальнейшем при подготовке дистанционных занятий можно добавить и другие формы закрепления знаний, например, глоссарий. Также, если позволяет время, на занятия можно использовать презентации по дополнительному материалу, не входящему в лекции. Небольшие сообщения с текстовыми, графическими или анимационными иллюстрациями могут сделать и сами студенты. Это повысит их активность, самостоятельность и заинтересованность в изучаемом материале, способствуя тем самым формированию профессиональных компетенций.

При проведении модульного контроля обоснованной являлась комбинированная проверка знаний: письменный опрос и собеседование в режиме видеоконференции с использованием такого дидактического средства как блиц - опрос [3, 4]. Для письменной части были составлены по каждой теме не менее 15 вариантов билетов. С их помощью проверялись знания формулировок законов, схем, графиков, формул, навыки решения графических или расчетных задач. При собеседовании в режиме блиц - опроса не только качество, но и быстрота ответов позволяли оценить уровень подготовки студента. Для проведения таких опросов был подготовлен банк заданий по каждой теме.

Используемый подход к организации удаленного занятия и его методическое обеспечение позволили сделать обучение более эффективным, улучшить взаимодействие между преподавателем и студентами. Подготовка к дистанционному занятию является трудоемкой, поэтому оптимальным было бы распределение изучаемых тем между преподавателями и создание единого методического комплекса. Рассматривая удаленные занятия как временное явление, следует обратить внимание на возможности интеграции форматов дистанционного и традиционного аудиторного обучения.

1. Гафуров И.Р., Ибрагимов Г.И., Калимуллин А.М., Алишев Т.Б. Трансформация обучения в высшей школе во время пандемии: болевые точки // Высшее образование в России. 2020. Т. 29. № 10. С. 101-112. DOI: <https://doi.org/10.31992/0869-3617-2020-29-10-101-112>.

2. Дигурова И. И., Крайнова Е. Ю., Дигуров Р. В., Гурова Н. Н. К вопросу повышения мотивации в учебно-исследовательской и научно-исследовательской деятельности студентов // Актуальные проблемы физики и технологии в образовании, науке и производстве : материалы Всерос. науч.-практ. конф. — Рязань, 2019. — С.138–142.

3. Дигуров Р. В., Гурова Н. Н. Опыт проведения модульного контроля по физике у студентов нефизических специальностей // Актуальные проблемы физики и технологии в образовании, науке и производстве: материалы III Всерос. науч.-практ. конф., 25–26 марта 2021 года / под ред. В. А. Степанова, О. В. Кузнецовой. — Рязань : Ряз. гос. ун-т имени С. А. Есенина, 2021. — С. 55–57.

4. Гусев Д. А., Бутина Е. А. Блиц-опрос как дидактическое средство контроля знаний учащихся / Образовательные ресурсы и технологии. – № 4 (25). – 2018. – С. 29–35.

Модель интегрированной академической магистратуры-аспирантуры

Евстигнеев М.П.^{1*}

¹*Севастопольский государственный университет;*
max_evstigneev@mail.ru

Проблематика исследовательской аспирантуры

Исследовательская аспирантура в настоящее время составляет основу системы воспроизводства научно-педагогических кадров в развитых странах мира. Более того, эффективность института аспирантуры коррелирует с технологической развитостью государства и, в связи с этим, имеет и экономический аспект.

Существует устойчивое мнение, что в Российской Федерации институт аспирантуры является сравнительно малоэффективным: данные статистики указывают, что лишь 30% выпускников аспирантуры получают степень кандидата наук, причем не более трети из них в дальнейшем занимаются научной деятельностью. Одной из составляющих этой проблемы является характерная для современной российской системы разобщенность вузовской и академической науки.

Рассмотрим проблематику повышения эффективности института академической (исследовательской) магистратуры-аспирантуры (ИАМА) на базе научно-образовательного центра мирового уровня «Морские науки, технологии и региональные экосистемы» (НОЦ), созданного с участием ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет» (СевГУ) в кооперации с пятью институтами академии наук: ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН», ФИЦ «Морской гидрофизический институт РАН», «Институт природно-технических систем», «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма».

Общие принципы ИАМА

1. «Продукт» ИАМА – кандидат наук в области естественных наук, обладающий исследовательской компетенцией, а также знаниями и навыками, необходимыми для организации самостоятельной исследовательской деятельности.

2. Показателями эффективности ИАМА являются: 1) доля магистрантов, продолживших свою исследовательскую траекторию в аспирантуре, либо в качестве штатного исследователя, 2) доля аспирантов, представивших в диссертационный совет свою научную работу в срок (т.е. в период обучения в аспирантуре).

3. Преемственность учебных планов магистратуры и аспирантуры. Предполагает формирование условно «единого» учебного плана «2+4»-шестилетнего учебного процесса, особенностью которого является его конструирование с учетом того научного направления и той квалификационной научной задачи, которая будет решаться будущим выпускником магистратуры – аспирантом – на этапе подготовки кандидатской диссертации.

4. Преемственность научного руководства исследовательской программой обучающегося. Предполагает, что в идеальном случае руководителем образовательной программы на этапе магистратуры и аспирантуры является один и тот же ведущий ученый.

5. Приоритетность конструирования ИАМА как «научно-исследовательской программы, включающей образовательную компоненту, а не как образовательной программы, включающей научно-исследовательскую компоненту». Данный подход в первую очередь отражает принцип глубокой интеграции и неразрывности исследовательского и образовательного процессов.

В рамках общих подходов формирования ИАМА, описанных выше, институт интегрированной магистратуры-аспирантуры, реализующийся на базе кооперации вузов и НИИ севастопольского НОЦ, имеет следующие фокусы:

1. Основным заказчиком и потребителем выпускника ИАМА являются НИИ-участники НОЦ.

2. Инструментом реализации ИАМА является так называемая «кафедра исследовательского типа»: это базовая кафедра НИИ, созданная в вузе, при которой существует научно-исследовательская лаборатория, проводящая исследования по совместно скоординированным тематическим планам исследований вуза и НИИ. Руководителями основных образовательных программ магистратуры и/или аспирантуры, как правило, являются кадровые сотрудники НИИ.

3. Модель учебного процесса на этапе магистратуры – проблемно-центрированная – фокус которой ориентирован на решение обучающимися научной задачи в рамках актуальной научной проблемы (тематики исследования). В рамках тематики формируется пул конкретных исследовательских задач. Группа магистрантов разбивается на подгруппы, каждой из которых ставится одна задача из пула. Решение этой задачи составляет основу будущей выпускной квалификационной работы магистра и основой кандидатской диссертации наиболее талантливых выпускников.

Опыт реализации модели ИАМА

Прообраз модели ИАМА реализовывался нами на регулярной основе сравнительно давно, начиная с 2005 года, по направлению подготовки магистратуры «Физика» профиль «Биофизика» и аспирантуры по специальности 03.01.02-биофизика (физико-математические науки). Тематика научного исследования и учебный план выстраивался в единой логике начиная с 3-го курса бакалавриата вплоть до аспирантуры под единый предмет исследования – комплексобразование биомолекул, – накладывающий определенную специфику на содержание и перечень учебных курсов. Начиная с 2005 по 2014 годы по этому учебному плану было защищено 8 кандидатских диссертаций по специальности «биофизика» строго в срок окончания аспирантуры соискателями, являвшимися выпускниками данной магистратуры. Недостатком этого опыта явилось отсутствие партнеров из академии наук как «заказчиков» молодых исследователей по данному направлению, в результате чего большая часть защищенных аспирантов «осели» в СевГУ в качестве преподавателей с частичной деградацией исследовательской компетенции, либо иммигрировали за рубеж.

Начиная с 2021 года на базе Института перспективных исследований СевГУ реализуются уже четыре полноценных кейса ИАМА с выходом в аспирантуру академических институтов-партнеров:

- «Физика» профиль «Биофизика»,
- «Физика» профиль «Спутниковая океанология»,
- «Биология» профиль «Гидробиология» и «Ботаника и функциональная геномика».
- «Экология и природопользование» профиль «Природно-технические системы».

В этих кейсах удалось достичь уровня кооперации вуза и академических институтов, которого до сих пор в севастопольском регионе не было, что указывает на перспективу повышения эффективности академической аспирантуры.

Подходы к преподаванию математических дисциплин для биофизиков в Сибирском федеральном университете

Суковатая И.Е.^{1*}, Шишов В.В.¹, Сутормин О.С.^{1,2}, Суковатый Л.А.¹, Самойлова А.А.¹

¹Сибирский федеральный университет;

²Сургутский государственный университет;

ISukovataya@sfu-kras.ru

Основными проблемами преподавания и изучения математики и информатики в образовательных программах биофизиков являются, как правило, такие как: отсутствие мотивации и непонимание студентами в необходимости знаний и навыков в области математических наук в будущей профессиональной деятельности, стандартизованная «упрощенная» обработка экспериментальных результатов с помощью прикладных программных пакетов, возможность использовать открытые on-line-ресурсы для расчетов часто приводит к отрицанию необходимости математических навыков, преподавание «чистой» математики без специфики биологических наук, слабая школьная подготовка и др.

Кроме того, цифровая трансформация экономики и всех сфер жизни, включая преподавание, обучение и научно-исследовательскую деятельность, переход на гибридную (смешанную) модель обучения и академических коммуникаций в научной и инновационной деятельности, необходимость обучения на протяжении всей жизни - Life Long Learning (LLL), междисциплинарные компетенции для новых профессий: hard-skills + IT-skills + soft-skills, требования ФГОС ВО и др. современные вызовы определяют развитие новых подходов к преподаванию и обучению математических наук для биофизиков. В частности, междисциплинарные компетенции для новых профессий, например, в области биоинформатики, геномики, протеомики и других омиксных наук закреплены в различных документах Минобрнауки, в частности в «Перечне основных знаний и навыков в области разработки и применения генетических технологий, в том числе технологий геномного редактирования, в целях актуализации на их основе образовательных программ высшего образования и дополнительного профессионального образования». В связи с этим для привлечения талантов и наращивание конкурентоспособного на мировом уровне кадрового потенциала для сектора исследований и разработок через обеспечение формирования набора ключевых междисциплинарных компетенций для научно-исследовательской, информационной и образовательной деятельности в области биоинженерии и биотехнологии, биофизики, биоинформатики, биохимии и медицинской биологии, биоэкологии, генетики, геномики и протеомики и др. в Сибирском федеральном университете (СФУ) разработана и реализуется целевая модель выпускника по профилю Биофизика включающая профессиональные междисциплинарные компетенции (биотехнология, биофизика, биоинформатика, биохимия и медицинская биология, биоэкологии, генетики, геномики и протеомики), «цифровые» навыки (аналитика данных, машинное обучение, искусственный интеллект, программирование и др.) и «мягкие» навыки (проектная деятельность, работа в команде и др.). Для общепрофессиональных компетенций, направленных на применение выпускниками «методов математического анализа и моделирования, теоретических и экспериментальных исследований, приобретение новых математических и естественнонаучных знаний, используя современные образовательные и информационные технологии и понимать принципы работы современных информационных технологий и использование их для решения задач профессиональной деятельности» (ОПК-6), а также «понимание принципов работы современных информационных технологий и использование их для решения задач профессиональной деятельности» (ОПК-7) разработаны индикаторы достижения этих компетенций. Разработана профессиональная компетенция, направленная на развитие способности выпускников-биофизиков осуществлять сбор, обработку и анализ научно-технической информации для решения задач профессиональной деятельности в области биологических наук с использованием современных информационных технологий, с индикаторами, например, такими как «использует базовые знания фундаментальных разделов математики и биоинформатики в объеме, необходимом для обработки информации и анализа биологических данных, в том числе в соответствии с задачами генетики, геномики и генетических технологий», «применяет современные языки программирования для адаптации алгоритмов машинного обучения к задачам, сформированным тематикой научного исследования» и др.

Для формирования компетенций в этих межпредметных областях разработан модуль «Математические методы и компьютерные технологии в биологии» трудоёмкостью 23 з.е., содержание которого включает, в том числе следующие разделы: Математика и основы статистики для биологов, Прикладная биологическая статистика и элементы программирования, Элементы теории классификации, Биометрика, Математическое моделирование биологических процессов, Data science в биологии, Биоинформатика, Анализ омиксных данных.

Новые программы магистратуры в области применения методов машинного обучения и искусственного интеллекта для решения задач биологии, экологии и медицины: «Геномика и биоинформатика» и «Biomedical Data Science» (на английском языке, полностью онлайн) открыты и реализуются в университете для развития новых профессиональных междисциплинарных компетенций выпускников – биофизиков.

Проблемы преподавания медицинской техники как составной части дисциплины «Медицинская и биологическая физика» и пути их решения

Мачнева Т.В.^{1*}, Дигурова И.И.¹

¹*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова; machneva_tv@mail.ru*

Современная медицинская техника используется для диагностики, лечения, реабилитации и профилактики. В соответствии с федеральным законом от 21 ноября 2011 г. N 323ФЗ "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации" [1] пациентам может быть оказана высокотехнологичная, медицинская помощь, включающая, в том числе, помощь с помощью роботизированной техники, информационных технологий и методов геномной инженерии. Таким образом, в повседневной практике врачи должны использовать сложное и, часто, дорогостоящее оборудование.

В РНИМУ им. Н.И. Пирогова согласно ФГОС 3++ профессиональной подготовки врачей, например, по специальности 31.05.01 «Лечебное дело» [2], в математический и естественнонаучный цикл входят дисциплины «Физика, математика», «Медицинская и биологическая физика» с общей трудоемкостью 3 зачетных единицы (108 академических часов) каждая. Такой объем не является достаточным для получения теоретических знаний, приобретения необходимых навыков и умений, а, следовательно, овладения профессиональными компетенциями в сфере использования высокотехнологичного оборудования. Другой проблемой является слабые базовые знания студентов по физике. В связи с вышесказанным введение новой дисциплины «Медицинская техника» («Медицинская аппаратура») могло бы способствовать инженерной подготовке будущих врачей с учетом современного развития технологий создания и эксплуатации медицинского оборудования.

Практические занятия по дисциплине «Медицинская техника» («Медицинская аппаратура») должны включать обязательное решение задач по физике и биофизике, объединяющих фундаментальные и специальные знания, а также лабораторный практикум с использованием современных медицинских приборов и аппаратов [3]. В настоящее время интеграция дистанционного и традиционного аудиторного обучения позволяет применять новые формы работы. Важным представляется также взаимодействие с преподавателями клинических кафедр.

Серьезным вопросом является также уровень знаний преподавателей кафедр физики и математики, медицинской и биологической физики, касающийся создания и применения современной медицинской аппаратуры. В РНИМУ им. Н.И. Пирогова проходят циклы повышения квалификации преподавателей медицинских университетов «Методика преподавания физики и математики в медицинских вузах». Включение занятий по устройству и эксплуатации сложного медицинского оборудования является актуальным вопросом. Также своевременным следует признать планируемое открытие на кафедре физики и математики с 2024 года магистратуры по медицинскому приборостроению.

Предлагаемые пути решения проблем преподавания медицинской техники будут способствовать более полному овладению будущими врачами знаниями, позволяющими работать с современной медико-технической аппаратурой.

1. Федеральный закон от 21.11.2011 г. N 323-ФЗ "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации"

2. Приказ Министерства науки и высшего образования РФ от 12 августа 2020 г. N 988 "Об утверждении федерального государственного образовательного стандарта высшего образования - специалитет по специальности 31.05.01 Лечебное дело" (с изменениями и дополнениями). Редакция с изменениями N 1456 от 26.11.2020.

3. Антоненко Г.В., Карасенко Н.В. Опыт преподавания дисциплины «Медицинская аппаратура» в РостГМУ// Инженерный вестник Дона, №4, ч.2 (2014) ivdon.ru/ru/magazine/archive/n4p2y2014/2634

Решение задач по физике и биофизике на разных видах занятий в медицинском университете

Дигуров Р.В.^{1*}, Дигурова И.И.²

¹Технологический институт сверхтвердых и новых углеродных материалов;

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова;
roman.digurov@yandex.ru

Исследование явлений жизни с использованием физических представлений и методов невозможно переоценить с позиций формирования врачебных компетенций у студентов медицинского университета. Профессионально - ориентированные задачи по физике и биофизике интегрируют фундаментальные и специальные знания, создают умения и навыки, необходимые в будущей деятельности врача, а акцент на межпредметные связи усиливает мотивацию студентов к изучению этих дисциплин, повышает их активность, развивает способность к логическому и аргументированному анализу. Желательно, чтобы решение задач в процессе обучения на кафедрах физики и биофизики было систематическим. Однако использование этого элемента учебной работы на практическом занятии бывает затруднено. Здесь следует учитывать, во-первых, недостаточный уровень школьной подготовки первокурсников по физике. Этот фактор влияет на уровень усвоения студентами физики и биофизики в непрофильных ВУЗах. А во-вторых, устранить пробел в неумении решать задачи на первом курсе бывает затруднительно из-за дефицита времени вследствие небольшого количества учебных часов. Для нахождения путей решения этой проблемы нами исследовалась возможность применения задач на разных видах занятий по физике, математике, медицинской и биологической физике со студентами – первокурсниками медицинского университета: лабораторно-практических, семинарских и контрольных.

На занятиях семинарского типа предлагались задания, связанные с изучением организма с точки зрения физики, применения физических процессов, явлений и приборов для диагностики и лечения. Важным представлялось использование задач при рассмотрении вопросов по биофизике тканей и органов, биофизике клетки, моделированию биофизических процессов, воздействию на человека внешних физических полей и потоков радиоактивных излучений. Полезным является включение задач в домашнее задание для закрепления полученных знаний и умений. С учетом того, что занятия проводятся со студентами нефизических специальностей, предлагаемые задания не были сложными. При обсуждении теоретического материала на лабораторных занятиях решались задачи, относящиеся к проведению конкретного лабораторного эксперимента, в том числе графические, наиболее наглядно отражающие функциональные зависимости [1]. Использование таких заданий на лабораторном практикуме снимало вопрос о недостаточном времени на решение задач, повышало заинтересованность в проведении эксперимента и улучшало качество предоставляемых отчетов по лабораторным работам. Экспериментальная часть лабораторно-практического занятия в этом случае становится развитием теоретической и расчетной частей [2]. Если позволяет продолжительность занятия, то несложные задачи можно использовать и при защите лабораторной работы для более полной оценки полученных знаний и умений. Важным критерием усвоения материала является качество решения профильных задач при проведении контрольных занятий [3]. Такой метод контроля стимулирует познавательную активность студентов. Особенно результативным он оказался при вынужденном переходе на дистанционное обучение. Задачи, входящие в билеты для модульного контроля, позволили эффективно проверить усвоение профессионально ориентированного содержания физики и биофизики будущими врачами. Профильные физические задачи могут быть также использованы и в работе студенческого научного кружка на кафедрах физики и биофизики. Научно-исследовательские ситуационные задания в большей степени моделируют профессиональную деятельность. Интересной представляется практика составления задач студентами с помощью преподавателя по теме научного исследования.

Таким образом, использование задач профильного характера на разных видах занятий в значительной мере устраняет проблему дефицита времени на их решение, повышает заинтересованность студентов в изучении физики и биофизики, способствует формированию компетенций врача.

1. Дигурова И.И., Дигуров Р.В. Решение профессионально — ориентированных физических задач на лабораторном занятии // Актуальные проблемы физики и технологии в образовании, науке и производстве: материалы IV Всерос. Науч.- практ. Конф., посвящ. 120-летию Александра Васильевича Пёрышкина, 24–25 марта 2022 года / под ред. В. А. Степанова, О. В. Кузнецовой. — Электрон. Текстовые дан. (1 файл: 8,81 МВ). — Рязань: Ряз. Гос. Ун-т имени С. А. Есенина, 2022. - С. 72-73.

2. Артюхина, А. И. Практическое занятие в высшей медицинской школе: учеб. пос. /А. И. Артюхина, В. И. Чумаков. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2017. – 232 с.

3. Кривцова И.О., Плетнев А.В., Бельчинский В.В. Анализ эффективности профильного изучения физики в медицинском вузе в рамках формирования профессиональных компетенций будущего врача // Проблемы современного педагогического образования. – 2018. –С. 106-108.

Формирование междисциплинарных компетенций в новой программе магистратуры «Медицинская и биологическая физика»

Суковатая И.Е.^{1*}, Кратасюк В.А.^{1,2}, Салмина А.Б.^{3,4}, Суковатый Л.А.¹, Деева А.А.¹, Сутормин О.С.¹

¹*Сибирский федеральный университет;*

²*Институт биофизики ФИЦ СО РАН;*

³*Лаборатория экспериментальной нейробиологии Отдела исследований мозга Научного центра неврологии (г. Москва);*

⁴*Красноярский Государственный Медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого;*

ISukovataya@sfu-kras.ru

Биофизическое образование больше не ограничивается какой-то одной профессиональной областью или сферой деятельности. В настоящее время биофизики все чаще работают в междисциплинарных областях, включая биомедицинскую физику. Разработка и дальнейшая реализации междисциплинарной программы магистратуры «Медицинская и биологическая физика» на английском языке отвечает глобальным вызовам и их междисциплинарному характеру, изменению ландшафта высшего образования и переходу к гибридной модели преподавания и обучения [1,2], а также имеет своей целью подготовку специалистов новой генерации, обладающих новыми междисциплинарными компетенциями в области биомедицинской физики, с пониманием роли науки для решения проблем здравоохранения, владеющие современными информационными технологиями (аналитика больших данных, машинное обучение, искусственный интеллект, программирование и др.), а также «мягкими» навыками (soft-skills) (межкультурные и языковые компетенции, работа в команде, эмпатия и эмоциональный интеллект, системное и критическое мышление, адаптивность, способность к самообучению в режиме Life Long Learning и др.), которые могут эффективно конкурировать на региональном, национальном и глобальном рынках труда.

Целью программы "Медицинская и биологическая физика" является подготовка специалистов, способных использовать существующие инструменты и разрабатывать новые подходы для решения современных проблем в области медицины и наук о жизни. Участники познакомятся с концепциями и методами физики, которые применяются в исследованиях и диагностике. Программа включает в себя общие курсы, направленные на обучение профессиональным, цифровым и мягким навыкам, а также две отдельные образовательные траектории, которые студенты могут освоить для продолжения своей будущей карьеры: Фундаментальная и прикладная нейробиология или биолюминесцентные биотехнологии в науках о жизни. Участие в разработке программы и дальнейшей ее реализации организаций-партнеров, в том числе международных, таких как лаборатория экспериментальной нейробиологии Отдела исследований мозга Научного центра неврологии, г. Москва, Красноярский Государственный Медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Университет Кадиса, Испания, Департамента медицинской Элементологии и токсикологии Университета Хамдард Джамай, Индия, институт биофизики ФИЦ СО РАН, свидетельствует об актуальности и востребованности подготовки уникальных специалистов в таких междисциплинарных и практикоориентированных областях медицинской и биологической физики для регионального, национального и международного рынка. Особенности и конкурентные преимущества программы включают следующие аспекты:

- разработка программы в парадигме результата обучения, проектирование которой основано на технологии обратного дизайна
- модульная структура программы и увеличение проектной и практической подготовки
- смешанная модель обучения и использование дистанционных образовательных технологий, в том числе для возможности реализации программы зарубежными и российскими организациями-партнерами
- формирование системы обучения через интеграцию науки и образования, обновлением контента и технологий обучения в условиях цифровой трансформации, повышением качества обучения через интеграцию в международное пространство
- практикоориентированность программы - научные исследования студентов будут проходить в современных оборудованных лабораториях в исследовательских группах университетов-партнеров
- кросс-культурная среда обучающихся и преподавателей
- возможность реализации англоязычных модулей академической мобильности с университетами-партнерами, в т.ч. и зарубежными, включая виртуальную и индивидуальную мобильность
- студентоориентированный подход к обучению через гибкую персонализацию образовательных треков, выбора тематики научных направлений, совместное руководство НИР магистрантов и др.

Разработка программы расширяет перечень англоязычных программ университета в дополнение к реализуемой на английском языке программе магистратуры «Биологическая инженерия», семестровому модулю

«Биолюминесцентные биотехнологии» и программе аспирантуры «Биофизика», и отвечает целям развития медико-биологического образования в СФУ от международной сопоставимости к конкурентоспособности [3]. Междисциплинарность и практикоориентированность программы будет способствовать развитию фундаментальных прикладных задач медицинской и биологической физики и подготовку уникальных специалистов, компетенции которых отвечают приоритетным направлениям развития науки и технологий в медицинской и биологической физике и проблемам здоровьесберегающих технологий.

Проект "Новая международная магистерская программа "Медицинская и биологическая физика" на английском языке реализуется победителем Конкурса на предоставление грантов преподавателям магистратуры благотворительной программы "Стипендиальная программа Владимира Потанина" Благотворительного фонда Владимира Потанина (договор гранта №ГСГК-0028/21).

1. Jen Bichel-Findlay, Sabine Koch, John Mantas, at al., Recommendations of the International Medical Informatics Association (IMIA) on Education in Biomedical and Health Informatics: Second Revision, International Journal of Medical Informatics, Volume 170, 2023, 104908.

2. C.J. Caruana, V. Karenauskaite, V. Mornstein, at al., A generic curriculum development model for the biomedical physics component of the educational and training programmes of the non-physics healthcare professions, Physica Medica, Volume 85, 2021, Pages 32-41.

3. Суковатая, И. Е. Новые тенденции развития биофизического образования в Сибирском федеральном университете / И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // VI Съезд биофизиков России : СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ, Сочи, 16–21 сентября 2019 года. Том 1. – Сочи: ООО Полиграфическое объединение «Плехановец», 2019. – С. 342. – EDN FZXRJX.

Новые методы в биофизике

Дистанционное бесконтактное фунгицидное воздействие электромагнитных волн на развитие грибов *Bipolaris sorokiniana*

Воробьев Н.И.^{1*}, Коваленко Н.М.², Попова Э.В.², Толмачев С.Ю.¹

¹*ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии;*

²*ВНИИ защиты растений;*

Nik.IvanVorobyov@yandex.ru

Электромагнитное воздействие на фитопатогенные грибы и их развитие мало изучено. В настоящее время разрабатываются и применяются только химические фунгициды. Химические фунгициды требуют разработки технологии их масштабного производства и разработки эффективной технологии распыления этих препаратов на сельскохозяйственных территориях. В этой ситуации, предпочтительной может быть бесконтактное воздействие на растения электромагнитными волнами, способными переносить сигналы о наличии фунгицидов в окружающей среде и препятствовать развитию фитопатогенных грибов.

Задачей данного исследования был поиск способа модуляции электромагнитных волн фунгицидным сигналом. Для решения данной задачи был проведен опыт с 6 чашками Петри.

Описание эксперимента. Для решения поставленной задачи на все 6 чашек Петри была помещена питательная среда, а в центр этих чашек – диски ($d=0,6$ мм) с патогенным грибом *Bipolaris sorokiniana*. На чашки №1, 2 дополнительно был добавлен фунгицид «Титл» в концентрации 0,005%, а на чашку №3 – в концентрации 0,01%. После этого на один генератор электромагнитных волн (100 Гц; патент РФ №2297392) устанавливались чашка №1 (на нее сверху чашка №4), а на другой генератор чашка №3 (на нее сверху чашка №5). В эксперименте чашки №1(4), 3(5) непрерывно облучались электромагнитными волнами в течение семи суток, а чашки №2 и 6 располагались вдали от генераторов электромагнитных волн и отдельно друг от друга.

Обсуждение результатов

После семидневного непрерывного облучения чашек №1(4), 3(5) мицелий гриба на чашках № 1, 3 и 2 развился, так как на этих чашках фунгицид присутствовал в питательной среде. На контрольной чашке №6 мицелий гриба развился на всю площадь чашки, так как на этой чашке фунгицид отсутствовал. В то же время, на чашках №4 и 5 фитопатогенный гриб образовал колонию, составляющую 40% и 10% от площади чашки соответственно, хотя на этих чашках фунгицид тоже отсутствовал. Мы полагаем, что электромагнитные волны, проходя сквозь чашки №1 и 3, получили модуляцию, передающую ложный сигнал фитопатогену, находящемуся на чашках №4 и 5. Поэтому следствием ложного сигнала явился замедленный рост мицелий гриба на чашках №4 и 5. При этом на чашке №5 колония гриба росла медленнее, чем на чашке №4. Возможно этот эффект связан с разной концентрацией фунгицида на соответствующих чашках №3 и 1 (0,01% и 0,005%).

Таким образом, можно утверждать, что электромагнитные волны способны переносить количественную и качественную информацию о наличии фунгицида в окружающей среде и переносом этой информации замедлять развития фитопатогенного гриба на любых питательных средах. Следовательно, биофизические исследования воздействия электромагнитных волн на биологические объекты позволят создать наименее затратные защитные агротехнологии для растений.

Изучение упругих свойств слоев кишечной стенки с помощью компрессионной оптической когерентной эластографии

Киселева Е.Б.^{1*}, Советский А.А.², Рябков М.Г.¹, Губарькова Е.В.¹, Бедерина Е.Л.¹, Богомолова А.Ю.¹,
Гладкова Н.Д.¹, Зайцев В.Ю.²

¹*ПИМУ Минздрава России;*

²*Институт прикладной физики РАН;*

kiseleva84@gmail.com

Обладая высоким разрешением (порядка 40-50 мкм), метод компрессионной оптической когерентной эластографии (К-ОКЭ) в настоящее время активно применяется для картирования упругих свойств (в частности, жесткости) биотканей для задач дифференциальной диагностики опухолевых и неопухолевых процессов [1], а также оценки ответа тканей после проведенного лечения (например, выявление очагов отека и некроза) [2].

Анализ литературных данных показал, что основной областью применения К-ОКЭ являются онкологические процессы [3]. В данной работе мы используем метод К-ОКЭ для изучения упругих свойств стенки тонкой кишки в норме, что проводится впервые. Потребность в объективных интраоперационных данных о жесткости слоев тонкокишечной стенки обусловлена рядом сложных диагностических и лечебных задач: необходимостью дифференциальной диагностики острого и хронического воспаления в стенке кишки [4]; внедрением в реконструктивную хирургию пищеварительного тракта приемов микрохирургии, предполагающих прецизионное сопоставление слоев с различными параметрами жесткости [5]; в перспективе – необходимостью контроля за дистракционным энтерогенезом при синдроме короткой кишки [6].

Целью данного исследования было разработать методику и провести измерения жесткости всех слоев стенки тонкой кишки в норме методом К-ОКЭ. Измерения проводились на образцах (n=16) тонкой кишки 6 минипигов (самцы, массой 28-34 кг). Для получения эластограмм использовались уникальные алгоритмы и оптический когерентный томограф (ОКТ), разработанные в ИПФ РАН (г. Нижний Новгород). ОКТ работает на длине волны 1310 нм, разрешение по глубине составляет 10 мкм, латеральное 15 мкм. Картирование деформации ткани основано на векторном подходе к оценке межкадровой вариации градиента фазы ОКТ-сигнала [7]. При этом используется калибровочный силиконовый слой с известной жесткостью (для тонкой кишки 40 кПа) на поверхности ткани, что позволяет вычислять абсолютные значения жесткости (модуль Юнга, кПа) в ткани и стандартизировать уровень давления на ткань [8]. К-ОКЭ данные получали как со стороны серозной оболочки тонкой кишки (измерена жесткость серозного и нижележащего мышечного слоев), так и со стороны слизистой оболочки (измерена жесткость слизистого и подслизистого слоев). Картирование жесткости проводили с разной степенью давления ОКТ зонда на ткань, в режимах однократного и повторяющегося давления, а также при сжатии ткани с последующим разгрузением. Таким образом, были получены зависимости напряжения от деформации, жесткости от деформации и жесткости от напряжения для всех четырех слоев стенки тонкой кишки в норме.

Было установлено, что при однократном нагружении со стороны серозной оболочки наибольшие значения жесткости при оказанном одноосном напряжении $\sigma = 2$ кПа зафиксированы у серозной оболочки (модуль Юнга $E \approx 40$ кПа), мышечная оболочка была менее жесткой (модуль Юнга $E \approx 30$ кПа). Наименьшие значения получены для слизистой (модуль Юнга $E \approx 20$ кПа) и подслизистой (модуль Юнга $E \approx 10$ кПа) оболочек. При этом при равномерном сжатии серозной и мышечной оболочек зависимости модуля Юнга от напряжения обладали меньшей нелинейностью, чем кривые для слизистого и подслизистого слоев. Установлено, что методом К-ОКЭ можно визуализировать морфологические особенности строения кишечной стенки: различать не только слои, но и определять наличие фолликулов и крупных сосудов в подслизистом слое, нервные ганглии между мышечными слоями. Кроме того, метод позволяет детектировать изменения в толщине слоев, например, атрофию серозного слоя, снижение высоты ворсин, утолщение подслизистого слоя.

Компрессия тканей с последующим разгрузением при давлении более 30 кПа показала возникновение существенной гистерезисности у нелинейных зависимостей напряжения от деформации с частичной потерей биотканью способности возвращения к исходной форме, а повторное нагружение ткани приводило к повышению начальных значений жесткости.

В заключении, методом К-ОКЭ было показано, что механические свойства каждого из слоев кишечной стенки отличаются, как и характер зависимости модуля Юнга от напряжения. Представленная работа является начальным этапом применения К-ОКЭ для оценки упругих свойств отдельных слоев тонкокишечной стенки. Полученные результаты представляют значительный интерес в перспективе интраоперационного использования К-ОКЭ в широком спектре хирургических манипуляций с тонкой кишкой, предполагающих ее сжатие и контролируемое растяжение.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-75-10096.

1. Gubarkova E.V. et al. OCT-elastography-based optical biopsy for breast cancer delineation and express assessment of morphological/molecular subtypes // *Biomed Opt Express*. 2019. Vol. 10. P. 2244-2263.
2. Plekhanov A.A. et al. Histological validation of in vivo assessment of cancer tissue inhomogeneity and automated morphological segmentation enabled by Optical Coherence Elastography // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10. P. 11781.
3. Zaitsev V.Y. et al. Strain and elasticity imaging in compression optical coherence elastography: The two-decade perspective and recent advances // *J Biophot.* 2021. Vol. 14. P. e202000257.
4. Gabbiadini R. et al. Application of Ultrasound Elastography for Assessing Intestinal Fibrosis in Inflammatory Bowel Disease: Fiction or Reality? // *Curr Drug Targets*. 2021. Vol. 22. P. 347-355.
5. Iida T. et al. Two-stage Reconstruction Using a Free Jejunum/Ileum Flap After Total Esophagectomy // *Ann Plast Surg*. 2020. Vol. 85. P. 638-644.
6. Bioletto F. et al. Efficacy of Teduglutide for Parenteral Support Reduction in Patients with Short Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Nutrients*. 2022. Vol. 14. P. 796.
7. Matveyev A.L. et al. Vector method for strain estimation in phase-sensitive optical coherence elastography // *Laser Phys. Lett.* 2018. Vol. 15. P. 065603.
8. Sovetsky A.A. et al. Full-optical method of local stress standardization to exclude nonlinearity-related ambiguity of elasticity estimation in compressional optical coherence elastography // *Laser Phys. Lett.* 2020. Vol. 17.

Иммобилизованные ферменты в молекулярной биофизике: расчетные и инструментальные методы оценки их состояния

Холявка М.Г.^{1*}, Артюхов В.Г.¹

¹*Воронежский государственный университет;*
marinaholyavka@yahoo.com

Одним из перспективных направлений современной молекулярной биофизики является исследование иммобилизованных биологических систем – ферментов и их комплексов. Общеизвестно, что при промышленном масштабировании каталитических процессов гетерогенный режим их проведения (биосистема находится в иммобилизованном на нерастворимом носителе состоянии) является экономически более выгодным по сравнению с гомогенными технологиями (биообъекты равномерно распределены в фазе растворителя), так как при этом значительно упрощается и удешевляется весь производственный цикл.

Дополнение экспериментальных эмпирических подходов по подбору удачных комбинаций фермент-носитель в условиях различного микроокружения современными методами компьютерного и математического моделирования позволяет не только экономить материальные ресурсы на апробацию иммобилизационных агентов и выявлять механизмы процесса иммобилизации, но и создавать принципиально новые комплексы препаратов на основе использования направленного конструирования материалов (лигандов, подложек, шивок) [1]. Для получения иммобилизованного биообъекта, востребованного на современном рынке, исследователь должен хорошо разбираться не только в области классической биофизики, но и в вопросах моделирования и анализа структурно-функциональных особенностей широкого круга молекул, уметь выявлять фундаментальные механизмы, управляющие конформационными перестройками в биополимерах, определять наиболее вероятные пути образования комплексов различной природы и протекания химических реакций. Для этого необходимо уметь активно манипулировать теоретическими подходами – современными методами квантовой химии: методами молекулярной динамики в полноатомном приближении, гибкого молекулярного докинга, методами прогнозирования спектров биологической активности и высокопроизводительным виртуальным скринингом соединений.

К настоящему времени нашим исследовательским коллективом раскрыты особенности физико-химических, кинетических и структурно-функциональных свойств инулиназ и некоторых цистеиновых протеаз (бромелина, папаина, фицина) в условиях различного микроокружения с точки зрения фундаментальной и прикладной науки [2]. В сравнительном аспекте описаны методы регулирования активности названных гидролаз, дана характеристика гетерогенных препаратов на основе иммобилизованных энзимов и предложены пути их применения [3, 4].

Проанализированы физико-химические и кинетические свойства гетерогенных биокатализаторов. Особое внимание было уделено описанию функциональных свойств ферментов в условиях различного микроокружения, выявлению оптимальных для их функционирования параметров системы, характеристике стабильности белковых макромолекул, устойчивости их к температурным воздействиям и экстремальным значениям pH среды [5].

Показано, что одним из эффективных путей регулирования и стабилизации активности изучаемых нами гидролаз является их иммобилизация. Выдвинуто предположение о том, что механизмы стабилизации иммобилизованного фермента в условиях экстремальных значений pH, температуры, а также других денатурирующих агентов в главных чертах совпадают и обусловлены, прежде всего, изменением степени мобильности третичной структуры белка, ответственной за образование фермент-субстратного комплекса. Установлено, что универсального метода иммобилизации гидролитических ферментов в настоящее время не существует, каждый из способов имеет свои преимущества и недостатки [6]. В целом выбор метода иммобилизации биокатализатора зависит от задач исследования и направления использования получаемого препарата в той или иной области науки и производства. Обсуждаемые нами научные положения будут обоснованы демонстрацией необходимого иллюстративного материала.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №21-74-20053)

1. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Kondratyev M.S., Samchenko A.A., Kabanov A.V., Komarov V.M. / *In silico design of high-affinity ligands for the immobilization of inulinase* // *Computers in Biology and Medicine*. – 2016. – V. 71. – P. 198-204.

2. Артюхов В.Г., Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Битюцкая Л.А., Гречкина М.В., Образцова Т.Б. / *Исследование олигомерной структуры и некоторых физико-химических свойств инулиназы из Kluyveromyces marxianus Y-303* / *Биофизика*. – 2009. – Т. 54. – № 6. – С. 1005-1011.

3. Kholiyavka M.G., Kayumov A.R., Baydamshina D.R., Koroleva V.A., Trizna E.Yu., Trushin M.V. / Efficient fructose production from plant extracts by immobilized inulinases from *Kluyveromyces marxianus* and *Helianthus tuberosus* // International Journal of Biological Macromolecules. – 2018. – V. 115. – P. 829-834.

4. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Agafonova M.N., Chirkova M.N., Vasileva O.S., Akhmetov N., Shubina V.V., Porfiryev A.G., Semenova E.V., Sachenkov O.A., Baltina T.V., Kayumov A.R., Koroleva V.A., Pankova S.M., Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Bogachev M.I. / Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized ficin // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – V. 164. – P. 4205-4217.

5. Холявка М.Г., Ковалёва Т.А., Хрупина Е.А., Волкова С.А., Артюхов В.Г. / Создание гетерогенного ферментного препарата на основе иммобилизованной инулиназы из *Helianthus tuberosus* / Биотехнология. – 2012. – № 6. – С. 31-42.

6. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. / Характеристика инулиназ. Пути регулирования и стабилизации их активности // Биотехнология. – 2012. – № 1. – С. 43-63.

Использование неоднородных рациональных В-сплайнов в разрешении перекрывающихся полос поглощения белков

Лавриненко И.А.^{1*}, Бойко А.А.¹, Марчукова К.Н.¹, Подгорная А.А.¹, Барышева В.Э.¹, Карпова О.В.¹, Черняев П.С.¹, Шатский И.В.¹, Вашанов Г.А.¹

¹*Воронежский государственный университет;*

lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

Анализ электронных спектров поглощения белков и их комплексов является одним из наиболее доступных, универсальных, практически безынерционных и неразрушающих способов исследования их структурно-функциональных свойств. Однако в отличие от атомных линейчатых спектров молекулярные спектры поглощения представляют собой суперпозицию плохо разрешенных перекрывающихся полос, происхождение которых обусловлено квантово-механическими переходами различных по своим свойствам хромофоров. Расщепление системы электронных переходов молекулы до более тонких энергетических состояний вследствие возникновения колебательных и вращательных уровней энергии ядер атомов, в совокупности с неквантуемыми уровнями тепловой энергии и доплеровским уширением, делает такие спектры поглощения практически непрерывными. Кроме этого, в конденсированных средах, в том числе, в водных растворах белков, дополнительно возникают межмолекулярные взаимодействия, приводящие к существенному сглаживанию пиков полос поглощения таким образом, что в итоге наблюдаемый пик может представлять собой суперпозицию, максимум которой не соответствует ни одному из основных электронных переходов в молекуле.

В связи с этим, выявление пиков в плохо разрешенных полосах поглощения представляет собой задачу, которая в той или иной степени может быть решена, как минимизацией межмолекулярного взаимодействия путем изоляции отдельных молекул и уменьшения кинетической энергии системы, так и математически, за счет минимизации постоянной составляющей поглощения в спектре. Наиболее известными решениями стали методы базовой линии, дифференциальной (т.е., разностной) и производной спектрофотометрии. Общий принцип этих методов заключается в уменьшении постоянной составляющей поглощения за счет ее вычитания, что приводит к повышению соотношения значений по оси $O\omega$ анализируемого спектра и, как следствие, увеличению разрешения [1-3].

В дополнение к этим методам нами предложен способ, комбинирующий разностную и производную спектрофотометрию. В этом случае в качестве базовой линии (или вычитаемого спектра) выступает аппроксимирующий сплайн от спектра поглощения образца. Вычитанием этого сплайна из спектра поглощения, реализуемого аналогично методу базовой линии или разностной спектрофотометрии, получается функция, которая по своей форме схожа со второй производной спектра поглощения и относительно оси Ox зеркально ее отображает.

В качестве аппроксимирующей функции нами использованы неоднородные рациональные В-сплайны (Non-uniform rational B-spline, NURBS), которые получили широкое распространение в решении задач 2-х и 3-х мерной графики, и в частности, в системах автоматического проектирования. Построение базовой линии к исследуемому спектру поглощения осуществлялось путем варьирования количества контрольных точек (узлов сетки) и порядка сплайна. В качестве демонстрации возможности применения такого решения использовали спектр поглощения раствора гемоглобина, измеренный с шагом 0.2 нм в диапазоне длин волн 240–320 нм (область поглощения хромофоров боковых групп аминокислотных остатков). Этот спектр был «прорежен» (децимирован) с помощью кубического сплайна в спектры с фиксированным шагом интерполяции: 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 и 5.0 нм. Далее эти спектры были аппроксимированы NURBS-кривыми от второго до восьмого порядков, и которые, в дальнейшем, были передискретизированы к исходному значению шага измерения 0.2 нм. Вычитая эти

NURBS-кривые из исходного спектра поглощения гемоглобина, получали разностные спектры, по которым можно выявить плохо разрешенные пики полос поглощения. Уменьшение порядка NURBS-кривой и шага интерполяции приводит к росту разрешения пиков поглощения. Однако это разрешение ограничивается отношением сигнал/шум (S/N) в исходном спектре поглощения образца, зависящим от условий измерения спектра. Уже для случая, когда кривая NURBS восьмого порядка получена от децимированного спектра поглощения с шагом 2.0 нм, становится возможным выявить 10 плохо разрешенных пиков полос поглощения без дополнительного подавления шумов этого спектра.

Таким образом, в общем виде, выделение аналитически значимого сигнала в спектрах поглощения достигается минимизацией постоянной составляющей, где NURBS-кривые можно рассматривать как фильтр высоких частот. Следует также отметить, что возможности NURBS-кривых, особенности их применения, а также предлагаемого в настоящей работе метода анализа спектров поглощения полностью не раскрыты и требуют дальнейшего изучения [4-5].

1. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Рубан М.К. / Анализ вклада хромофоров боковых групп аминокислот в спектр поглощения гемоглобина // Журнал прикладной спектроскопии .– 2013 .– Т. 80(6) .– С. 907-912.

2. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Артюхов В.Г. / Разложение УФ-спектра поглощения гемоглобина на спектры поглощения протетических групп и апобелка с помощью аддитивной модели // Биофизика .– 2015 .– Т. 60(2) .– С. 253-261.

3. Lavrinenko I.A., Holyavka M.G., Chernov V.E., Artyukhov V.G. / Second derivative analysis of synthesized spectra for resolution and identification of overlapped absorption bands of amino acid residues in proteins: Bromelain and ficin spectra in the 240–320 nm range // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy .– 2020 .– Vol. 227 .– P. 117722. doi: 10.1016/j.saa.2019.117722

4. Лавриненко И.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. / Разрешение перекрывающихся полос поглощения хромофоров белков с помощью неоднородных рациональных базовых сплайнов // Актуальные вопросы биологической физики и химии .– 2017 .– Т. 2(1) .– С. 321-326.

5. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Артюхов В.Г. / Кривые NURBS в спектральном анализе перекрывающихся полос поглощения некоторых хромофоров белков // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация .– 2018 .– № 4 .– С. 82-88.

Исследование автофлуоресценции НАД(Ф)Н иммунных клеток в лимфоузлах методом FLIM как маркера эффективности иммунотерапии

Южакова Д.В.^{1*}, Изосимова А.В.^{1,2}, Сачкова Д.А.^{2,1}, Щеславский В.И.¹, Можеров А.М.¹, Загайнова Е.В.², Шаронов Г.В.^{3,1}, Ширманова М.В.¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия;

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия;

³Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия;

yuzhakova-diana@mail.ru

За последнее десятилетие методы лечения, стимулирующие противоопухолевый иммунный ответ, в частности, чек-пойнт иммунотерапия, произвели революцию в лечении рака. Несмотря на это, далеко не у всех пациентов наблюдается выраженный ответ на лечение, и лишь в меньшей части случаев достигается максимальный клинический эффект. Для улучшения иммунотерапии рака необходимы надежные маркеры для предсказания эффективности лечения. Перспективной стратегией может быть оценка метаболического статуса лимфоцитов, отражающая ключевые изменения в иммунных клетках в ответ на опухоль и терапию. Инновационной технологией для оценки метаболизма клеток является время-разрешенный флуоресцентный имиджинг (FLIM) метаболических коферментов. В отличие от стандартных методов, FLIM не требует использования красителей, деструкции тканей и позволяет получать изображения в режиме реального времени. Однако работы по метаболическому FLIM-имиджингу иммунных клеток пока единичны.

Исследование проводилось на мышах линии C57Bl/6 FoxP3-EGFP с меланомой B16F0, привитой вблизи пахового лимфатического узла (ЛУ). Мышам вводили антитела к CTLA-4 (Bio X Cell, США) (250 мкг на мышь, внутрибрюшинно на 7, 8, 11 и 12 дни роста опухоли). FLIM-изображения в канале кофермента никотинамидадениндинуклеотида (фосфата) (НАД(Ф)Н) (возбуждение 375 нм, прием 435–485 нм) получали с помощью флуоресцентного конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss,

Германия), оснащенного модулем FLIM Simple Tau 152 TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Германия). Проточную цитометрию проводили с использованием клеточного сортера BD FACSAria III.

Впервые разработан протокол исследования автофлуоресценции иммунных клеток из свежих фрагментов ЛУ. Параметры времени жизни флуоресценции кофермента НАД(Ф)Н демонстрируют чувствительность к развитию опухоли. Наиболее выраженными изменениями в процессе роста опухоли были увеличение относительной амплитуды свободного НАДН α_1 и увеличение вклада фосфорилированной формы НАДФН α_3 . Вероятной причиной роста α_1 и α_3 может быть, соответственно, сдвиг в сторону гликолиза и усиление пентозофосфатного пути для обеспечения повышенных потребностей антиген-активированных Т-клеток. Данные проточной цитометрии подтверждают повышение экспрессии поверхностных маркеров активации CD25 и CD69 и продукции интерферона-гамма (IFN γ), а также увеличение индекса пролиферации Ki67 в субпопуляциях эффекторных CD4+Th и CD8+ Т-клеток.

Касательно анти-CTLA-4-терапии, у мышей, отвечающих на терапию (с замедленным ростом опухоли) наблюдалось увеличение относительной амплитуды свободного НАДН α_1 , ассоциированного с гликолизом, по сравнению с мышами с прогрессирующей опухолью, а также с нелечеными контрольными мышами. В то же время у мышей, не отвечающих на терапию, наблюдалось выраженное снижение α_1 даже по сравнению с контрольной группой без лечения. Данные FLIM коррелируют с уровнем экспрессии активационных (CD25, CD69 и IFN γ) и пролиферативных (Ki67) маркеров.

Таким образом, FLIM-микроскопия автофлуоресценции кофермента НАД(Ф)Н в иммунных клетках может служить мощным инструментом для оценки иммунного ответа на опухоль и прогнозирования эффективности иммунотерапии.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 21-74-00101).

Исследование влияния паракринного эффекта на дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в кардиомиоциты и их доставка в ткань сердца на микроподложках

Аитова А.А.^{1*}

¹*МФТИ, лаборатория экспериментальной и клеточной медицины;*
alika_aitova@mail.ru

В строме костного мозга существует подмножество негематопозитических клеток, называемых мезенхимальными стволовыми клетками (МСК). Эти клетки могут быть размножены и далее дифференцированы в другие типы клеток, что делает их уникальным инструментом клеточной терапии.

Клеточная терапия - одна из многообещающих стратегий современной медицины. Тканевая инженерия сердца и клеточные технологии, включающие и прямую инъекцию клеток, являются ключевыми подходами для лечения заболеваний сердца, однако, подобные методы сопряжены с рядом сложностей: функциональной активностью кардиомиоцитов после пересадки и возможность иммунного ответа со стороны тканей хозяина. Решением этих проблем служат стволовые клетки, полученные от пациента, например: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки и другие. Способность таких клеток к дифференцировке в самые разные типы клеток делает возможным их использование в клеточной терапии. Остается проблема функциональной приживаемости клеток в ткани пациента.

Представляемая работа посвящена изучению паракринного эффекта при дифференцировке стволовых клеток и разработке нового метода доставки клеток в ткань сердца животного с последующей оценкой функциональной интеграции клеток. Паракринный эффект позволяет дифференцировать клетки непосредственно в ткани до терминальной стадии, что дает возможность создания межклеточных связей. Выявление этапов дифференцировки с помощью паракринного эффекта и возможности подсадки дифференцируемых клеток в ткань на разных этапах и являлись задачами данной работы. Для решения представленных задач в работе использовались МСК человека. Были поставлены и модифицированы протоколы выделения МСК из биопсии костного мозга человека. Получены клеточные линии МСК. Была выбрана оптимальная подложка, на которой достигалась необходимая плотность культуры за оптимальное время. Был получен один протокол дифференцировки из МСК в кардиомиоциты с помощью факторов, получаемых из параллельной дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты с выходом около 10%. Полученные из МСК кардиомиоциты были охарактеризованы с помощью оптического картирования и иммунофлуоресценции. Полученная культура была доставлена в ткань сердца крысы на нановолоконных структурах, обеспечивающих более эффективную функциональную интеграцию клеток. В дальнейшем планируется совершенствование протокола дифференцировки МСК в кардиомиоциты и метода доставки клеток для достижения более качественной функциональной интеграции.

Исследование конформационных изменений пептида Аβ(1-42) методом рамановской спектроскопии

Шутиков А.А.^{1*}, Арзуманян Г.М.¹, Арынбек Е.^{1,2}, Дёмина Е.М.¹, Закрытная Д.С.¹, Маматкулов К.З.¹

¹Объединённый институт ядерных исследований, Дубна, Московская область, Россия;

²Институт ядерной физики, Алматы, Казахстан;

artyom.shutikov@nf.jinr.ru

Известно, что агрегация β-амилоидного пептида (Аβ) способствует накоплению амилоидных бляшек в мозге человека, что приводит к формированию целого ряда заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера. Нейротоксичность основных компонентов пептидов Аβ, может быть опосредована прямым взаимодействием между белками и липидными мембранами.

Данная работа посвящена изучению конформационных изменений пептида Аβ(1-42) в присутствии фосфолипидной системы – в миметиках, таких как липосомы и липодиски. Исследование проводилось методом рамановской спектроскопии, который является неинвазивным, быстрым и одним из мощных диагностических инструментов не требующим сложной подготовки и большого объёма исследуемого материала. В данной работе мы представляем сравнительный анализ конформационных изменений чистого пептида Аβ(1-42) со временем, в том числе в системе фосфолипидных мембран.

Целью нашего исследования было выяснить закономерность структурных изменений в области Амида I в рамановских спектрах пептидов, способствующих формированию амилоидных бляшек. В качестве фосфолипидов для исследования были выбраны: полностью насыщенный фосфолипид DMPC.

В результате работы установлено, что пептид, растворенный в воде, вне липидной системы, склонен к агрегации. При добавлении пептида Аβ(1-42) в процессе формирования липосом, увеличивается вероятность встраивания белка в липидный бислой. В такой системе белок переходит на более стабильную структуру – превалирует α-helix конформация. При добавлении пептида Аβ к сформированным липосомам, уменьшается вероятность встраивания пептида в структуру бислоя, что также приводит к формированию амилоидных фибрилл. В случае с липодисками, со встроенным пептидом Аβ, его структура меняется на β-turn конформацию. Полученные спектральные данные подтверждаются расчетами моделирования – молекулярной динамики (MD), а также методом расчета теории функционала плотности (DFT).

Литература:

1. A. Accardo, V. Shalabaeva, M. Cotte, M. Burghammer, R. Krahn, C. Riek, S. Dante. «Amyloid β Peptide Conformational Changes in the Presence of a Lipid Membrane System». *Langmuir*, 30(11), 2014.

2. N.V. Surovtsev. Raman spectroscopy of phospholipid membranes. Institute of Automation and Electrometry, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia, 2021.

Исследование микроволнового излучения лактозы, насыщенной высокими разведениями веществ

Борискин В.С.^{1*}, Фёдорова М.Ф.¹

¹РТУ - МИРЭА (ИТХТ имени М.В. Ломоносова);

vladimir.borisckin@gmail.com

За последние несколько десятилетий стало появляться все больше и больше исследований, свидетельствующих о том, что сверхвысокие разведения (СВР) веществ, способны воздействовать на исходные вещества, модифицируя их свойства, а также было доказано, что активность СВР обусловлена особой технологией их приготовления [1]. Были установлены отличия между технологически обработанными разведениями различных веществ, растворителями и исходными веществами [2]. Известно, что образцы СВР представляют собой самоорганизующиеся дисперсные системы, в которых формируются нанобъекты [3, 4], которые и могут обуславливать их биологическую активность и механизм действия.

Наиболее интересным из свойств СВР разведений является их излучательная способность. Доподлинно известно о способности растворов, содержащих СВР веществ, излучать в ИК-диапазоне, что приводит к так называемому дистантному эффекту, то есть к способности образца воздействовать на рядом стоящие образцы посредством электромагнитного излучения [5, 6].

Однако оставалось неизвестным, способны ли к подобного рода излучениям твердые лекарственные формы, насыщенные разведениями различных антител. В качестве вспомогательного вещества для лекарственных форм была использована альфа лактозы моногидрат, которая широко используется в

фармацевтической промышленности для изготовления таблеток [7]. Известно, что лактоза изменяет конформацию после насыщения в псевдооживленных слоях активными фармацевтическими ингредиентами, полученными путем многократного разведения антител в сочетании с внешней интенсивной вибрационной обработкой [8].

Целью данной работы было установление излучательной способности порошков лактозы, насыщенных СВР различных фармацевтических субстанций, а также установление зависимости интенсивности данного излучения от внешнего воздействия (нагрева образцов).

В качестве экспериментальных образцов брали порошки, насыщенные СВР антител к ИФН- γ , а в качестве контрольных образцов использовали порошки, насыщенные СВР глицинового буфера, и порошки интактной лактозы. Измерения проводились на интегральном детекторе электромагнитного излучения TES-92 (TES Electrical Electronic Corp., Taiwan). Модель имеет диапазон измерения плотности потока электромагнитного излучения от 1 мкВт/м² до 30,93 Вт/м², а диапазон частот от 50 МГц до 3,5 ГГц. Датчик измерения трехосный, что позволяет настраивать ориентацию прибора и образца в пространстве соответствующим образом.

Для выполнения измерения образцы насыпали ровным слоем в чашку Петри диаметром 60 мм и высотой 12 мм, ставили нагреваться в разогретый до 60°C термошейкер (BIOSAN PST-60HL-4) на 5 минут. Измеряли плотность излучения в диапазоне работы прибора от 50 МГц до 3,5 ГГц. Измерения проводились в режиме максимальное среднее в течение 15 минут, прибор был ориентирован по оси Z, температура образцов составляла 37 °C. Для экранирования внешнего электромагнитного поля образцы помещали в клетку Фарадея.

Показано, что интенсивность излучения от образцов СВР АТ к ИФН- γ значимо ($p < 0.05$) отличается от интенсивности излучения образца СВР буферного плацебо в 2,8 раз и от образца Интактной лактозы в 3,6 раз. При этом контрольные образцы между собой значимо не отличаются.

Таким образом однозначно показана способность порошков лактозы моногидрата после предварительного насыщения СВР АТ к ИФН- γ излучать в радиодиапазоне в интервале от 50 МГц до 3,5 ГГц.

Полученные результаты, при их дальнейшем исследовании могут быть применены как для оценки контроля качества лекарственных препаратов.

[1] Epstein, O. I., Beregovoy, N. A., Sorokina, N. S., Starostina, M. V., Shtark, M. B., Gainutdinov, K. L., ... & Muhamedshina, D. I. (2003). Membrane and synaptic effects of anti-S-100 are prevented by the same antibodies in low concentrations. *Front. Biosci.*, 8, 79-84

[2] Gudkov, S. V., Penkov, N. V., Baimler, I. V., Lyakhov, G. A., Pustovoy, V. I., Simakin, A. V., ... & Scherbakov, I. A. (2020). Effect of mechanical shaking on the physicochemical properties of aqueous solutions. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8033

[3] Ryzhkina, I. S., Murtazina, L. I., Kiseleva, Y. V., & Konovalov, A. I. (2015, May). Self-organization and physicochemical properties of aqueous solutions of the antibodies to interferon gamma at ultrahigh dilution. In *Dokl. Phys. Chem* (Vol. 462, No. 1, pp. 110-114).

[4] Bunkin, N. F., Shkirin, A. V., Ninham, B. W., Chirikov, S. N., Chaikov, L. L., Penkov, N. V., ... & Gudkov, S. V. (2020). Shaking-induced aggregation and flotation in immunoglobulin dispersions: Differences between water and water-ethanol mixtures. *ACS omega*, 5(24), 14689-14701.

[5] Penkov, N., & Penkova, N. (2020). Analysis of emission infrared spectra of protein solutions in low concentrations. *Frontiers in Physics*, 8, 624779.

[6] Novikov, V. V., & Yablokova, E. V. (2022). Interaction between Highly Diluted Samples, Protein Solutions and Water in a Controlled Magnetic Field. *Applied Sciences*, 12(10), 5185.

[7] Portnoy M., David M. Barbano. Lactose: Use, measurement, and expression of results. *J. Dairy Sci.* 104:8314–8325 (2021)

[8] Baranova A., Lykina A., Antonova D., Smolyanskaya O. Optical Properties of Crystalline Lactose Fluidized with Dilutions of Various Substances in the Terahertz Frequency Range. *Pharmaceutics*, 14, 32 (2022)

Исследование особенностей клеточных реакций методом аномальной временной зависимости вязкости

Иванов К.Ю.^{1*}

¹*Российский Федеральный ядерный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной физики, Саров, Россия;
gane@orb2.vniief.ru*

Состояние организма и его реактивность определяют индивидуальные особенности реакций на самые разнообразные воздействия. Реакции клеток сопряжены с изменением пространственной структуры ДНК. Исходное конформационное состояние хроматина может обуславливать особенности клеточных реакций. Метод

аномальной временной зависимости вязкости (АВЗВ), основанный на изучении эластичных свойств ДНК-белковых комплексов с помощью ротационной вискозиметрии, позволяет изучать конформационное состояние хроматина и оценивать его реактивность по реакции на тепловой шок.

Цель работы: исследовать индивидуальные особенности изменения конформационного состояния хроматина при гипертермии, действии ионизирующего излучения и магнитного поля в зависимости от его исходного состояния и реактивности.

Материал и методы. Исследования выполнены на клетках крови человека и клетках крови белых беспородных крыс-самцов при воздействии *in vitro*. Образцы цельной крови человека ($n=18$) и животных ($n=18$) подвергали тепловому шоку - гипертермии при 46°C в течение 30 минут. Образцы крови человека ($n=17$) подвергали действию гамма-излучения ^{60}Co в дозе 3,0 Гр при мощности дозы 1,0 Гр/мин, а образцы крови животных ($n=32$) - действию низкоинтенсивного низкочастотного биполярного импульсного магнитного поля с индукцией 11,8 мТл в течение 30 минут.

Определение конформационного состояния хроматина проводили после четырехчасового лизиса клеток. Параметры кривой АВЗВ регистрировали с помощью цилиндрического вискозиметра Зимма-Кроузера. Критерием оценки конформационного состояния хроматина являлась величина приведенной вязкости, которая пропорциональна максимальному периоду оборота ротора вискозиметра. Реактивность хроматина оценивали по изменению конформационного состояния после теплового шока.

По исходному конформационному состоянию и реактивности хроматина формировали группы сравнения. В основу формирования групп положено соотношение индивидуальных значений показателя метода АВЗВ к среднему для группы в целом. Доноры и животные со значением показателя от $M-0,67s$ до $M+0,67s$ попадали в среднюю группу, где M - среднее значение для группы в целом, а s - стандартное отклонение. Значения показателя ниже или выше указанного интервала являлись критериями, на основании которого были сформированы крайние группы.

Статистическую значимость воздействия изучаемых факторов оценивали по критерию Уилкоксона. Для анализа различий между выборочными группами использовали критерий Краскела-Уоллиса.

Результаты. Тепловой шок вызывал деконденсацию хроматина в клетках крови человека ($p=3,27E-04$) и в клетках крови животных ($p=0,001$). Между группами гипо-, нормо-, и гиперреактивных доноров выявлено статистически значимое различие в реакции хроматина на тепловой шок ($p=0,001$). Выраженное различие в реактивности хроматина на тепловой шок также выявлено при аналогичном делении животных на группы ($p=0,001$). При этом исходное конформационное состояние определяло реактивность хроматина на тепловой шок. Между группами доноров, различающимися по исходной приведенной вязкости ($p=0,001$), выявлено различие реакции хроматина на тепловой шок ($p=0,003$). Реактивность хроматина в группах животных, сформированных по исходному конформационному состоянию ($p=0,001$) также различалась ($p=0,031$). Тепловой шок приводил к максимальной деконденсации хроматина в клетках доноров и животных с максимально конденсированным его состоянием.

На клетках крови человека установлено, что облучение в дозе 3,0 Гр приводит к деконденсации хроматина ($p=0,001$). Исходное конформационное состояние и реактивность на тепловой шок определяли степень радиационно-индуцированной деконденсации хроматина. Максимальное изменение конформационного состояния происходило в группах доноров с максимально конденсированным состоянием хроматина ($p=0,022$) и гиперреактивных доноров ($p=0,014$).

На клетках крови животных выявлено, что действие магнитного поля на группу в целом вызывает слабую деконденсацию хроматина. Эффект воздействия достоверно проявлялся у животных с максимально конденсированным состоянием хроматина ($p=0,022$).

Заключение. Исходное конформационное состояние определяло степень деконденсации хроматина после теплового шока, действия ионизирующего излучения и магнитного поля, а исходная реактивность - изменение конформационного состояния после облучения. Метод АВЗВ позволяет определять конформационное состояние, оценивать реактивность хроматина по реакции на тепловой шок и на основании этого прогнозировать индивидуальные особенности клеточных реакций на различные воздействия.

Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность своим коллегам Е.А. Никаноровой, Г.Л. Паточке, В.И. Нагибе, И.А. Варгановой, Я.И. Медведеву за участие в экспериментальных исследованиях.

Мобильность апконверсионных наносенсоров NaF4Yb,Er в организме виноградной улитки

Андрианов В.В.^{1,2*}, Гайнутдинов Х.Л.^{1,2}, Шмелёв Г.Г.², Никифоров В.Г.², Жарков Д.К.², Леонтьев А.В.², Митюшкин Е.О.², Арсланов А.И.¹, Муранова Л.Н.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

²Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского ФИЦ КазНЦ РАН;

yvandrianov@kpfu.ru

В докладе представлены результаты исследования мобильности наночастиц (НЧ) NaYF₄: Yb, Er, инъецированных во внутреннюю полость тела виноградной улитки в виде коллоидного раствора (0.2 мл, дозировка 600 мг/кг). НЧ были синтезированы нами гидро- и сольвотермальными методами и представляли собой узкие наностержни (nanorods) длиной до 1 мкр. Они обладали яркой апконверсионной люминесценцией при возбуждении на длине волны 980 нм. В работе основное внимание сфокусировано на вопросах распределения НЧ в органах улитки, а также скорости естественного их выведения из организма. Идея использовать различные наносенсоры для исследования, контроля и терапии в биологии и медицине в настоящее время получила бурное развитие. Одним из перспективных направлений является флюоресцентная наносенсорика, когда внешним источником света возбуждается отклик флюоресценции. Как правило, для возбуждения используется УФ излучение, что оказывает негативное воздействие на биологические объекты, связанное с поглощением, фотодеструкцией биомолекул, разогревом тканей. Помимо этого, возникает активное рассеивание УФ излучения тканями и автофлюоресценция белков, что отрицательно сказывается на точности метода. В данной работе мы тестируем возможность применения апконверсионных наночастиц (НЧ) NaYF₄: Yb, Er в качестве флюоресцентных нанозондов. Эти НЧ обладают яркой зеленой люминесценцией при возбуждении лазером на длине волны 980 нм, которая находится в «окне прозрачности» биологических тканей. Использование такого апконверсионного возбуждения позволяет полностью избежать описанных выше проблем с УФ излучением.

В синтезе были использованы гидро- и сольвотермальные методы, описанные в работах [1-3]. Затем синтезированные НЧ были очищены от побочных продуктов синтеза и покрыты силиконовой оболочкой для защиты НЧ от нежелательного воздействия поверхностных тушителей люминесценции в биосреде и приданию НЧ гидрофильных свойств. В докладе представлены результаты исследования мобильности НЧ, инъецированных во внутреннюю полость тела виноградной улитки. Инъекции водных коллоидных растворов НЧ осуществлялись через район синусного узла улитки, где отсутствуют болевые рецепторы. Затем проводились наблюдения за состоянием животных в течение семи дней с забором выделяемых экскрементов. После чего из органов улитки и собранных экскрементов готовились препараты по следующей методике. Органическая составляющая препаратов отжигались при температуре 500°C в течение нескольких минут. Затем полученный пепел растворялся в 0,06 N соляной кислоте и дважды промывался водой с осаждением в микроцентрифуге. В результате выделялся несгоревший и нерастворимый осадок, который анализировали на предмет количественного содержания НЧ. Данные исследования позволили получить информацию о мобильности инъецированных НЧ в тело улитки, скорость их естественного выведения из организма улитки и остаточную локализацию в органах через 7 дней после инъекции. В докладе поднимаются вопросы о дальнейших перспективах использования синтезированных нами апконверсионных НЧ в биологических задачах (биовизуализация, удалённое измерение температуры и др.). Обсуждаются зависимости мобильности НЧ от их формы и размеров, а также вопросы токсичности.

1. D.K. Ma, D.P. Yang, J.L. Jiang, P. Cai, S.M. Huang. CrystEngComm 2010, 12, 1650-8.

2. X. Liang, X. Wang, J. Zhuang, Q. Peng, Y.D. Li. Advanced Functional Materials 2007, 17, 2757-65.

3. J.C. Boyer, C.J. Carling, B.D. Gates, N.R. Brand. Journal of the American Chemical Society 2010, 132, 15766–

72.

Неинвазивную идентификация микотоксинов грибов рода Фузариум на семенах озимой пшеницы с помощью микроскопии комбинационного рассеяния и спектроскопии

Московский М.Н.^{1*}

¹Федеральный научный агроинженерный центр "ВИМ", Москва, Россия;

maxmoskovsky74@yandex.ru

Идентификация специфических микотоксинов р. Фузариоз, содержащийся в зараженных семенах озимой пшеницы, обычно затруднена. Выявление возможно путем визуального распознавания отличительных

фенотипических черт грибов при большом увеличении. Визуальное распознавание видов носит субъективный характер и обычно требует значительных таксономических знаний. Химические методы определения различных видов микотоксинов р. Фузариоз трудоемки и требуют применения дорогостоящих химикатов и применения инвазивных методов исследования. В представленном докладе будет представлена возможность использования микроскопии комбинационного рассеяния в качестве безметочного, неинвазивного и неразрушающего аналитического метода для быстрой и точной идентификации токсинов р. Фузариоз. Грибы р. *Fusarium* могут продуцировать микотоксины, которые непосредственно влияют на химическую структуру инфицированных семян, в том числе и на ДНК и РНК. Анализ спектров методами комбинационного рассеяния и флуоресценции позволяет идентифицировать здоровые, инфицированные и контаминированные семена озимой пшеницы микотоксинами р. Фузариоз. Анализ семян с помощью комбинационного рассеяния обеспечивает точную идентификацию токсинов р. Фузариоз в 96% образцов. Кроме того, мы приводим данные по идентификации углеводов, белков, клетчатки и других пищевых веществ. Полученные результаты позволяют утверждать, что комбинационное рассеяние обеспечивает быстрый, точный и неинвазивный скрининг фитосанитарного статуса семян.

Обнаружение и идентификация внутриклеточного микропластика посредством усиленной темнопольной микроскопии, дополненной гиперспектральной визуализацией

Ишмухаметов И.Р.¹, Ахатова Ф.С.¹, Фахруллина Г.И.¹, Хаертдинов Н.Н.^{1*}

¹*Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;*
Haertdinov@yandex.ru

Одной из главных экологических проблем является повсеместное распространение микропластика. Тогда как большинство сред обитания уже загрязнены микрочастицами пластика, точные механизмы, участвующие в их клеточном поглощении и последующей токсичности, остаются не до конца исследованными [1]. Несмотря на распространенность в природе микропластмассы с нерегулярным размером и морфологией, важным материалом в изучении токсичности микропластика, за счет своей контролируемой формы, монодисперсности и коммерческой доступности, остаются частицы полистирола. Они широко используются для установления общего клеточного и молекулярного воздействия полимерных частиц [2]. Усиленная темнопольная микроскопия, дополненная гиперспектральной визуализацией (УТМ-ГВ) активно применяется в нанотехнологических исследованиях для обнаружения и идентификации различных наноматериалов в клетках и организмах. В данной работе исследован потенциал УТМ-ГВ для быстрого и точного обнаружения поглощения микропластика различного диаметра в первичной клеточной культуре [3].

Жизнеспособность фибробластов кожи человека после 24-часовой инкубации с полистиролом в диаметре 100–1000 нм была измерена с помощью колориметрического МТТ-теста. Морфология микрочастиц и их поглощение клетками после ко-инкубации исследовались с помощью системы усиленной темнопольной микроскопии CytoViva. Гиперспектральные снимки частиц и образцов клеток в диапазоне длин волн 400–1000 нм были получены для диагностики полистирола в растворе и клетках посредством алгоритма спектрального углового картирования. С целью оптимизации метода для высокопроизводительного анализа, собранные снимки визуализации микропластика разного размера были использованы в качестве набора данных для обучения нейронной сети. Полученная модель была протестирована на классификации образцов живых клеток для оценки возможности исследования поглощения микропластика в динамике.

Результаты показали, что образцы полистирола в концентрации до 5 мкг/мл не оказывали значимого воздействия на жизнеспособность клеток. Активность клеток несколько снижалась при воздействии частиц размером 200 и 1000 нм в концентрации 10 мкг/мл, в то время как воздействие частиц размером 100 нм стимулировало их жизнеспособность. Визуализация показала, что частицы микропластика присутствовали как внутри, так и снаружи клеточной мембраны, но не в ядрах клеток. Гиперспектральный анализ позволил классифицировать частицы разных размеров на основе их спектральных характеристик. При этом небольшая часть была классифицирована ошибочно, что вызвано идентичным химическим составом образцов. Внедрение нейронной сети в процесс анализа микропластика позволило сохранить высокую точность обнаружения при увеличении скорости обработки данных. Дальнейшие исследования с использованием этой методики могут углубить понимание воздействия микропластика на здоровье человека и окружающую среду.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 21-73-00097).

Список литературы:

1. Kögel T., Bjørøy Ø., Toto B., Bienfait A.M., Sanden M. Micro- and nanoplastic toxicity on aquatic life: Determining factors // *Sci. Total Environ.* 2020. Vol. 709. P. 136050.

2. Kooi M., Primpke S., Mintenig S.M., Lorenz C., Gerdts G., Koelmans A.A. Characterizing the multidimensionality of microplastics across environmental compartments // *Water Res.* 2021. Vol. 202. P. 117429.

3. Akhatova F., Ishmukhametov I., Fakhrullina G., Fakhrullin R. Nanomechanical Atomic Force Microscopy to Probe Cellular Microplastics Uptake and Distribution // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 2. P. 806.

Оценка транспорта воды по плазмодесмам в корнях растений с использованием градиентного ЯМР с парамагнитным допингом

Суслов М.А.^{1*}, Анисимов А.В.¹, Ахтямова Г.А.¹, Аггьямова А.Р.¹

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН;

makscom87@mail.ru

Для производства сельскохозяйственных культур и систем управления растениеводством, которые позволяют поддерживать высокие урожаи в условиях ограниченного доступа воды, необходимо четкое понимание процессов, которые контролируют поглощение воды корнями для её дальнейшего использования растениями. В свое время Штейдлом была предложена композитная модель радиального транспорта воды в корне растений. Согласно этой модели имеются три параллельных пути транспорта воды и растворенных веществ в корне: апопластный, симпластный и трансмембранный. Новые экспериментальные данные последнего десятилетия привели к необходимости усовершенствования классической модели транспорта воды в корне с добавлением последовательно соединенных в корне сопротивлений эпидермиса, кортекса, эндодермиса и других тканей. На сегодняшний день последним шагом в усовершенствовании композитной модели транспорта воды в корне стало появление математической модели МЕСНА (model of explicit cross-section hydraulic anatomy). Данная модель позволяет рассчитать поток воды через корень, учитывая анатомическую структуру корня и гидравлические параметры мембран, клеточных стенок и плазмодесм (межклеточных каналов) в масштабе отдельных клеток по всему поперечному срезу корня. При этом МЕСНА предсказывает высокую чувствительность гидравлической проводимости корня к изменению водной проницаемости симпласта и скорости потока воды через плазмодесмы. Однако слабым местом данной модели является недостаток экспериментальных данных о гидравлической проводимости плазмодесм, связанный с отсутствием необходимых методических и технических подходов для измерения скорости потока воды через плазмодесмы.

В данной работе, на примере корней растений кукурузы продемонстрирована методика измерения методом спинового эха ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля трансляционной диффузии воды селективно по симпласту корня с последующим определением эффективного коэффициента проницаемости симпластной системы корня и скорости потока воды через плазмодесмы. Селективность водного переноса по симпластной системе корня была достигнута с помощью эффекта релаксационного подавления сигнала ЯМР от внеклеточной воды путём внедрения в межклеточное пространство корня парамагнитных частиц высокой релаксационной эффективности (парамагнитный допинг). Суть подхода заключается в том, что парамагнитный комплекс проникает в межклеточное пространство тканей корня, но не проникает в клетки, и ускоряет процессы магнитной релаксации межклеточной воды, тем самым, исключая вклад межклеточной воды в регистрируемое затухание спин-эха ЯМР сигнала. В результате ЯМР-контроль трансляционной диффузии применяется к сигналу от воды, движущейся вдоль симпласта через плазмодесмы, куда парамагнитный комплекс не проникает. В качестве парамагнитных комплексов были использованы Gd-диэтилтриаминапентауксусная кислота (GdDTPA), Mn²⁺-транс-1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (MnDCTA), и хлорид гадолиния (GdCl₃). Было показано, что увеличение концентрации парамагнитных комплексов приводит к побочному эффекту в виде снижения, в разной степени, диффузионного транспорта воды в радиальном направлении корня. Учитывая это, эффективный коэффициент проницаемости плазмодесм был определён с помощью экстраполяции концентрационной зависимости на нулевую концентрацию парамагнитных комплексов. Среди исследованных парамагнитных комплексов наименьшим побочным влиянием на диффузионный транспорт воды при линейной концентрационной зависимости обладал MnDCTA. При использовании парамагнитного комплекса MnDCTA эффективный коэффициент проницаемости симпласта составлял 30 – 35% от величины эффективного коэффициента суммарной межклеточной проницаемости в контроле (корни без воздействия парамагнитными комплексами). При этом скорость потока воды через плазмодесмы корня в радиальном направлении в приближении поршневого режима течения по линейной цепи клеток была оценена в диапазоне (4.5-8.8)×10⁻⁷ м/с.

Полученные в данной работе результаты по оценке проницаемости симпластной системы корня кукурузы и скорости потока воды через плазмодесмы могут быть использованы в усовершенствовании существующих математических моделей транспорта воды в корне, в том числе и модели МЕСНА, а также могут быть полезны в

исследовании механизмов координации компонентов гидравлической системы растений на уровне отдельных клеток, тканей и органов целого растения.

Работа поддержана грантом № 22-74-10087 Российского научного фонда (<https://rscf.ru/en/project/22-74-10087/>).

Подавление шумов в электронных спектрах поглощения белков с помощью неоднородных рациональных В-сплайнов

Лавриненко И.А.^{1*}, Барышева В.Э.¹, Карпова О.В.¹, Черняев П.С.¹, Шатский И.В.¹, Бойко А.А.¹,
Марчукова К.Н.¹, Подгорная А.А.¹, Вашанов Г.А.¹

¹*Воронежский государственный университет;*

lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

Молекулярные спектры поглощения белков характеризуются, как правило, широкими плохо разрешенными и зачастую перекрывающимися полосами светопоглощения. Это обусловлено тем, что кроме электронных уровней потенциальной энергии, для молекул, в отличие от отдельных атомов, характерно наличие дополнительных колебательных и вращательных уровней с более низкими величинами квантования относительно электронных. Неквантуемые сдвиги в потенциальных уровнях энергии за счет теплового и доплеровского эффектов приводят к уширению этих полос и формированию практически непрерывного спектра поглощения. Это обстоятельство существенным образом затрудняет соотнесение пиков полос светопоглощения к электронным переходам, которые их формируют.

Использование техники квазилинейчатых спектров Шпольского, матричной изоляции молекул в инертных газах, а также низкотемпературной селективной лазерной спектроскопии, хотя отчасти и решает эту проблему, но также имеет и ряд ограничений методического характера. Другим способом повышения разрешающей способности в спектрах поглощения молекул стало использование производной спектрофотометрии [1]. Здесь также существуют свои ограничения: артефакты численного дифференцирования, ложные пики-спутники, а также ухудшение отношения сигнал/шум с ростом порядка производной анализируемого спектра.

Наиболее известными способами уменьшения шумов в спектрах светопоглощения являются увеличение времени интегрирования при измерении сигнала, накопление спектров поглощения и последующее их усреднение, использование алгоритмов сглаживания на основе скользящей средней, различных линейных, нелинейных, рекурсивных и нерекурсивных фильтров, а также фильтров с использованием Фурье- и вейвлет-преобразований, и пр. [2-3]. Среди сглаживающих фильтров с минимизацией квадратической ошибки в спектроскопии наиболее часто находят свое применение полиномиальный фильтр Савицкого-Голея, который по сути является развитием метода скользящей средней.

Нами предлагается осуществлять фильтрацию шумов с помощью неоднородных рациональных В-сплайнов, также известных, как кривые-NURBS. Являясь, по сути, сглаживающей аппроксимацией, данный сплайн может быть использован для низкочастотной фильтрации исходных экспериментальных данных с их последующим дифференцированием. Если фильтр Савицкого-Голея задается параметрами ширины окна сглаживания, порядка аппроксимирующего полинома и количества последовательных проходов этого фильтра, то NURBS-сглаживание определяется количеством контрольных точек, порядком сплайна, а также числом последовательных аппроксимаций спектра. Управлением числа контрольных точек, в качестве которых выступают данные измерений спектра поглощения, порядка аппроксимирующей функции сплайна и числа последовательных аппроксимаций, можно найти решение, наилучшим образом отвечающее отношению сигнал/шум (S/N).

На спектрах поглощения гемоглобина и альбумина нами продемонстрирована возможность применения NURBS, как способа подавления шумов в спектрах светопоглощения белков. Показано, что метод сглаживания с помощью кривых NURBS успешно конкурирует с оконным методом сглаживания Савицкого-Голея. Однако следует отметить, что подбор оптимальных значений параметров для того или иного метода сглаживания требует некоторых априорных знаний о спектральных свойствах исследуемых хромофоров, в частности белков. Это позволяет минимизировать ошибки интерпретации плохо разрешенных полос поглощения. Вместе с тем, предложенный способ фильтрации шумов с помощью NURBS требует дальнейшего исследования с целью оценки его преимуществ и недостатков относительно уже используемых методов в части анализа спектральных данных [4-5].

1. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Рубан М.К. / Анализ вклада хромофоров боковых групп аминокислот в спектр поглощения гемоглобина // Журнал прикладной спектроскопии. – 2013. – Т. 80(6). – С. 907-912.

2. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Артюхов В.Г. / Разложение УФ-спектра поглощения гемоглобина на спектры поглощения простетических групп и апобелка с помощью аддитивной модели // Биофизика. – 2015. – Т. 60(2). – С. 253-261.

3. Lavrinenko I.A., Holyavka M.G., Chernov V.E., Artyukhov V.G. / Second derivative analysis of synthesized spectra for resolution and identification of overlapped absorption bands of amino acid residues in proteins: Bromelain and ficin spectra in the 240–320 nm range // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* .– 2020 .– Vol. 227 .– P. 117722. doi: 10.1016/j.saa.2019.117722

4. Лавриненко И.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. / Разрешение перекрывающихся полос поглощения хромофоров белков с помощью неоднородных рациональных базовых сплайнов // *Актуальные вопросы биологической физики и химии* .– 2017 .– Т. 2(1) .– С. 321-326.

5. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Артюхов В.Г. / Кривые NURBS в спектральном анализе перекрывающихся полос поглощения некоторых хромофоров белков // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация* .– 2018 .– № 4 .– С. 82-88.

Проявление действия электрического поля переменного напряжения на семена ячменя

Юдаев И.В.^{1*}, Казакова А.С.², Татьянченко И.С.², Донцова В.Ю.²

¹*Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилин;*

²*Азово-Черноморский инженерный институт – филиал ФГБОУ ВО «Донской государственный аграрный университет»;*
etsh1965@mail.ru

По подсчетам ФАО ООН уже в 80-х годах прошлого столетия в аграрном секторе было рекомендовано применять более 700 видов разнообразных электротехнологических операций, среди которых рассматривалось и прямое воздействие электрического тока на материалы и сырье. Существенное достоинство данной электротехнологической операции заключается в её экологической и продовольственной безопасности, что позволяет говорить о возможности её включения в реализацию программы органического земледелия и концепции переоснащения аграрного сектора «Agriculture 4.0». С практической точки зрения результат влияния физического фактора на биологический объект, например, семена злаковых культур, рассматривают как увеличение их всхожести и, в конечном счете, урожайности. При этом остаются недостаточно изученными режимы обработки семян и механизмы реализации полученного воздействия, приводящие к увеличению урожайности. В связи с этим целью данной работы явилось изучение влияния предпосевной обработки семян ярового ячменя в электрическом поле переменного напряжения (ЭППН) с целью повышения всхожести и ускорения их прорастания, интенсификации роста и развития растений и увеличения урожайности.

Объектом исследования служили семена ярового ячменя сортов местной селекции Сокол, Вакула, Грис и Приазовский 9 за три года репродукции, которые обрабатывали в ЭППН напряженностью 0,5 кВ/см на лабораторной установке в течение 20, 40 и 60 секунд. Всхожесть семян определяли в течение 10 дней после обработки. Определяли поглощение воды контрольными и обработанными семенами весовым методом в течение суток после замачивания; мощность проростков определяли при проращивании семян в рулонах фильтровальной бумаги; активность амилаз определяли стандартным методом по микрофенологическим фазам прорастания семян (МФФПС); в условиях полевого опыта определяли урожайность. Установлено, что все испытанные режимы предпосевной обработки семян оказывают положительный эффект на все изученные признаки, однако самый высокий и устойчивый эффект был получен при обработке семян в ЭППН течение 40 секунд и последующей их отлёжке в течение 4-х суток; этот режим обработки семян использовали в дальнейшей работе.

Предпосевная обработка семян в ЭППН при оптимальном режиме приводит к увеличению энергии прорастания на 18-34 %, а всхожести на 4-6 % в среднем по всем изученным сортам за разные годы их репродукции. Электростимуляция семян оказывает положительный эффект на водопоглощение. Увеличение массы семян имеет общий характер в контроле и в опыте, однако разница значений их массы в процессе водопоглощения постепенно нарастает: разница массы семян через 30 минут набухания составила 4,6 %, а через 12 часов она увеличилась в 3,9 раза и составила уже 17,9 %. Более высокая влажность обработанных прорастающих семян сохраняется также и по всем МФФПС до их прорастания.

Стимулирующий эффект предпосевной обработки семян в ЭППН проявляется также и в формировании более мощной первичной корневой системы 7-суточных проростков: увеличивается общая длина корешков за счет увеличения длины каждого. Наибольший эффект отмечен по длине 1-4 корешков проростка, их длина возрастает на 25-30 %. Выявлена сильная корреляционная связь между величинами прибавки суммарной длины корешков проростка и прироста длины каждого корешка после обработки семян в ЭППН. При оценке результатов воздействия предпосевной обработки семян ячменя физическими факторами надо использовать не абсолютные значения длины первого зародышевого корешка, как это часто делают, а величину прироста его длины в опыте по сравнению с контролем

Предпосевная обработка семян приводит к увеличению активности амилаз: активность β -амилазы возрастает на 30 %, а активность α -амилазы – на 40-50 % в среднем по всем сортам и МФФПС. Имеются и сортовые различия: так, в наклонувшихся семенах у сорта Приазовский 9 суммарная активность амилаз возрастает в 5 раз, а у сорта Грис только на 10%.

Предпосевная обработка семян ярового ячменя сорта Вакула привела к превышению урожайности зерна по сравнению с контролем в острозасушливом году на 20,2 %, а в оптимальном – на 10,5 %. Увеличение урожайности произошло за счет таких элементов её структуры, как число зерен в колосе, масса 1000 зерен, количество растений на 1 м² и продуктивная кустистость.

Таким образом, проявление действия электрического поля переменного напряжения на семена ячменя проявляется сразу после контакта семян с влагой, запускается каскад физиологических и биохимических процессов на более высоком уровне, что и приводит к повышению урожайности.

Режим лазерного облучения клеточного скаффолда из ПГА определяет клеточный ответ

Дудаев А.Е.^{2,1*}, Рыльцева Г.А.^{2,1}

¹Институт биофизики СО РАН;

²Сибирский федеральный университет;
alex15-96@mail.ru

Активное развитие науки, техники и производства приводит к все более широкому внедрению высокомолекулярных полимерных соединений синтетического и природного происхождения в различные сферы жизни человека. Требования к структуре и физико-механическим свойствам полимеров и изделий из них различны и определяются, исходя из конкретных областей применения (строительство, сельское и коммунальное хозяйство, медицина и др.).

Для улучшения свойств полимерных материалов применяют 3 основных подхода – биологический, химический или физический. Под физическими подразумевают применение разнообразных физических технологий (обработка плазмой, ионная имплантация и др.)

Сравнительно недавно для улучшения свойств пластиков стали применять лазерную обработку, которая имеет безоговорочное преимущество по отношению к другим методам, так как позволяет избирательно модифицировать поверхность без разрушения материала и образования токсичных продуктов.

Целью настоящей работы стало исследование влияния двух режимов (непрерывного и квази-импульсного) углекислотной (СО₂) лазерной обработки на микроструктуру и свойства поверхности полимерных пленок из четырех типов ПГА – поли-3-гидроксibuтирата и трех сополимеров: 3-гидроксibuтирата с 4-гидроксibuтиратом, 3-гидроксивалератом или 3-гидроксигексаноатом.

Биосовместимость клеточных матриц во многом определяется физико- химической реактивностью поверхности. Основными факторами, регулирующими рост клеток на матрице, являются топография поверхности, шероховатость, химический и фазовый составы. Начальное поведение клетки на поверхности во многом определяет последующие процессы клеточной дифференцировки и пролиферации.

Для доказательства вышеупомянутого тезиса было проведено исследование функционального статуса клеток после культивирования на исследуемых образцах с помощью проточной цитофлуориметрии после окраски флуоресцентными красителями. Стадии апоптоза клеток определяли количественно с помощью проточной цитофлуориметрии на 3 сутки культивирования, измеряя сигналы аннексина V и йодида пропидия (ПИ) (Thermo Fisher Scientific, США). Апоптотические стадии исследовали с использованием цитофлуориметра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Аннексин V-положительные/ПИ- отрицательные и аннексин V-положительные/ПИ-положительные клетки рассматривались как находящиеся в ранней и поздней фазах апоптоза соответственно. Аннексин V-отрицательные/ПИ-положительные клетки считались некротическими. В качестве положительного контроля использовали клетки, культивируемые на культуральном полистироле.

Для нативных необработанных пленок из П(ЗГБ) характерна активная работа процесса программируемой клеточной гибели, количество жизнеспособных клеток 34,16 %, для сополимеров же процент живых активных клеток составляет 60,58-72,77 %. Обработка в непрерывном режиме сопровождается усилением темпов процесса апоптоза для гомополимера и сополимера П(ЗГБ/ЗГГ), количество клеток в поздней стадии апоптоза для них составляет 77,54 и 59,94 %, соответственно; для сополимеров с ЗГВ и 4ГБ соотношение живых и апоптотических клеток относительно необработанных пленок увеличивается в сторону последних. Квази-импульсное облучение, напротив, сопровождается повышением числа жизнеспособных клеток – для гомополимера до 44,61 %, для сополимеров до 69,88-87,15 %, при этом доля апоптотических клеток снижается.

В данной работе впервые представлены результаты сравнительного исследования биологических свойств пленок из 4-х типов ПГА, обработанных лазером в режимах постоянного и квазиимпульсного излучения.

Постоянный режим лазерного излучения, сопровождался снижением количества жизнеспособных фибробластов по сравнению с их процентом на необработанных пленках на 7-36%, в отличие от этого, количество жизнеспособных клеток на пленках, обработанных в квазиимпульсном режиме, выросло: на 4-15% и на 15-40%, соответственно, по сравнению с исходными пленками и обработанными постоянным излучением. Это важный результат, открывающий возможность стимулировать развитие клеточных культур при использовании пленок в качестве скаффолдов в клеточных технологиях.

Роль фибриногена во взаимодействии эритроцитов и эндотелия на уровне отдельных клеток: *in vitro* измерения с помощью лазерного пинцета на крови здоровых доноров

Ермолинский П.Б.^{1*}, Максимов М.К.¹, Щегловитова О.Н.², Луговцов А.Е.¹, Приезжев А.В.¹

¹*Физический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*

²*Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, Россия;*

ermolinskiy.pb15@physics.msu.ru

Микрореология крови обусловлена свойствами плазмы крови и взаимодействием между клетками крови, среди которых можно выделить агрегацию эритроцитов, взаимодействие между клетками крови и эндотелием и др. [1]. Эндотелиальные клетки выступают в качестве изолирующего слоя между кровью и тканями и играют важную роль в потоке крови, регулируя кровеносные сосуды, капилляры, и также влияя на свойства клеток крови. В данной работе изучалось только взаимодействие между эндотелием и эритроцитами. Известно, что эритроциты обратимо взаимодействуют друг с другом под действием низкого напряжения сдвига, образуя линейные и более сложные структуры, которые называются эритроцитарными агрегатами. Степень агрегации эритроцитов определяет вязкость крови. Фибриноген – это основной индуктор агрегации эритроцитов (также данный белок играет одну из основных ролей в процессе тромбообразования), по-видимому, должен влиять на взаимодействие между эритроцитами и эндотелием.

Основная цель данного исследования заключалась в изучении взаимодействия здорового эндотелия и эритроцитов здоровых добровольцев при различных концентрациях фибриногена на уровне отдельных клеток *in vitro*. Для экспериментов использовалась установка лазерного пинцета, позволяющая манипулировать отдельными клетками без механического контакта, а также измерять силы их взаимодействия [2].

Кровь для исследования была взята из кубитальных вен здоровых доноров. Эндотелиальные клетки выращивались на круглых стеклышках, и образовывали монослой клеток [3]. Перед измерениями и перед каждым измерением их помещали в эксикатор (среда CO₂), помещенным в термостат при 37°C. Образец крови представлял собой аутологичную сыворотку, в которую добавлялся фибриноген до достижения определенных концентраций, и далее добавлялось небольшое количество крови (1:1000). Были исследованы следующие концентрации фибриногена в сыворотке: 0, 2, 4, 6, 8 мг/мл. Образец крови помещался в изолированную от воздуха кювету, в которой находилось стеклышко с монослоем эндотелия и измерялись силы взаимодействия между клетками.

В результате было показано, что сила взаимодействия между эритроцитами и эндотелием приходит к насыщению при концентрации фибриногена 4 мг/мл. Силы взаимодействия между эритроцитами и эндотелием в здоровых условиях составляют около 4 пН, что сопоставимо с силами взаимодействия между эритроцитами. Эти результаты важны для лучшего понимания взаимодействия между эритроцитами и эндотелием.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 23-45-00027) в соответствии с программой развития Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова "Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина".

[1] Furst E.M., Squires T.M. "Microrheology" Oxford University Press, United Kingdom (2017).

[2] Priezhev A.V., Lee K., Firsov N.N., and Lademann J. "Optical Study of RBC Aggregation in Whole Blood Samples and on Single-Cell Level," Chapter 1 in "Handbook on Optical Biomedical Diagnostics", V. V. Tuchin – editor, 2nd Edition, SPIE Press Bellingham, WA, United States (2016).

[3] Щегловитова О. Н., Бабаянц А. А., Склянкина Н. Н., Болдырева Н. В., Беляев Д. Л., и Фролова И. С., "Первичная культура клеток сосудистого эндотелия человека проявляет интерферонпродуцирующую, антивирусную и иммуномодулирующую активность под воздействием иммуномодуляторов". Иммунология, 33 (3), 116-119 (2012).

Слияние соматических клеток с использованием флуоресцентного красителя BioTracker 400 Blue Cytoplasmic Membrane методом фемтосекундной лазерной нанохирургии

Залесский А.Д.^{1,2*}, Осыченко А.А.¹, Мартиросян Д.Ю.¹, Точило У.А.¹, Федотов Ю.А.^{1,3}

¹ФИЦ ХФ РАН;

²МФТИ(ГУ);

³ Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России;
aleksandr.zalesskij@phystech.edu

Коллективом авторов разрабатывается оригинальная методика объединения (слияния) клеток при помощи фемтосекундного лазерного излучения. Традиционными альтернативными методами слияния клеток являются электрослияния и химическое слияние (при помощи полиэтиленгликоля). Так же существует методика слияния клеток при помощи гемагглютинирующих вирусов, которая применяется в работах как с эмбрионами животных, так и человека. Все эти методы существенно инвазивны, поскольку неизбежно воздействуют на объединяемые клетки целиком.

Важнейшей особенностью разрабатываемой методики является возможность направлять лазерное воздействие строго в область контакта клеток. При таком подходе сами по себе клетки остаются практически интактными. Кроме того, методика обладает широкой вариативностью параметров дозы и интенсивности лазерного воздействия, что позволяет применять лазер для слияния как очень мелких и деликатных объектов (например, соматических клеток в суспензии), так и достаточно крупных (ооцитов мыши).

Ранее мы показали, что при помощи фемтосекундного лазерного излучения можно совершать энуклеацию ооцитов мыши с высокой точностью и малой инвазивностью (Osychenko A.A. et.al, Biomedical Optics Express, 2022). В рамках данной работы предлагается дополнить методику фемтосекундного лазерного слияния клеток использованием флуоресцентного красителя BioTracker 400 Blue Cytoplasmic Membrane Dye, который встраивается в липиды, в т.ч. цитоплазматическую мембрану, для увеличения эффективности поглощения фемтосекундного лазерного излучения.

В работе использованы две модельные системы: суспензия клеток линии A549 и двухклеточные эмбрионы мыши. Исследована эффективность проведения процедуры лазерного слияния клеток в зависимости от присутствия флуоресцентного красителя, длины волны фемтосекундного лазерного излучения, энергии импульса, частоты следования импульсов. Продемонстрирована способность управлять долей поглощённого фемтосекундного лазерного излучения за счёт спектральных особенностей используемого флуоресцентного красителя. Результат данной работы носит общий характер для использования фемтосекундного лазерного излучения в качестве наноскальпеля и может быть использован в других работах, связанных с фемтосекундной лазерной нанохирургии.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-75-10155. Работа выполнена на ЦКП № 506694 ФИЦ ХФ РАН и УНУ № 1440743.

Техника градиентного ЯМР для контроля транспорта воды в растениях в поле одномерного давления

Анисимов А.В.^{2*}, Суслов М.А.²

¹КИББ ФИЦ КазНЦ РАН;

²Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН;
anisimov@kibb.knc.ru

Ранее проведенные методом градиентного ЯМР исследования влияния объемного давления (гипербарии) на трансляционный перенос воды в растительных тканях показали относительно широкий спектр ответных реакций растений на фактор давления (Анисимов, Суслов, Абдрахимов, и др.2013,2014,2016, 2019)

В частности, продемонстрировано влияние гипербарии на образование кластерных агрегатов из элементов эндомембранной системы, локальных деструкций тонопласта, эффект кислородного допинга, вследствие увеличения под давлением концентрации в растворяемого в воде кислорода и др. Эти результаты, мотивировали к постановке задач детализации мишеней давления с надеждой коррекции представлений о механизмах регуляции трансляционного переноса воды по разным путям растительной ткани (симпластному, трансклеточному, апопластному), реакции переноса воды через аквапорины с оценкой гипотезы о возможности насосной функции последних, исследовании феномена полярности транспорта воды. В этой связи перспективными представляются исследования переноса при приложении одномерного давления, которое может генерироваться центробежной силой. В свою очередь возникает методическая задача совмещения техники

контроля переноса воды с техникой создания центробежной силы. В качестве техники контроля переноса информативным и технически адекватным задачей является спин-эхо метод ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля – градиентный ЯМР (Анисимов 2021).

В работе описывается комплекс: градиентный ЯМР на центрифуге, состоящий из трех переносимых самодостаточных блоков: 1. портативного блока градиентного ЯМР, с возможностью работы в классическом варианте стационарного спин-эхо ЯМР релаксометра-диффузомера; 2. специализированной центрифуги; 3. компьютера для управления и сбора информации. Особенностью градиентного ЯМР является: 1. полностью автономная система термостатирования образца, на диапазон температур -5 $+80^{\circ}\text{C}$, построенная на термомодулях Пельтье, с охлаждением последних водой, циркулирующей по замкнутому контуру; 2. возможность приложения вектора центробежной силы под любым углом к продольной оси образца, благодаря подвижной подвеске магнита диффузомера, 3. автономная цифровая система управления импульсными последовательностями и регистрации сигналов намагниченности с передачей экспериментальных данных на компьютер по радиоканалу. Двухканальный блок импульсного градиента с градиентами соответственно в Z и Y направлениях величиной до 4 Т/м.

Центрифуга выполнена в виде пяти опорной симметричной консоли, с закрепленной осью вращения для ротора которым является собственно блок ЯМР. На оси вращается приводной шкив, одновременно являющийся приводным элементом кулачковой муфты. Ответная часть муфты выполнена в виде ложементов для установки блока градиентного ЯМР. В свою очередь ложемент установлен на каретку, которая обкатывается по плоскому опорному кольцу, закреплённому по периметру опорной консоли. Кольцо служит для предотвращения возможности аварийного опрокидывания блока ЯМР во время вращения. Безопасность работы экспериментатора установка обеспечивается защитным цилиндром из полиэтилена высокого давления с внешним бандажом из стальной сетки и ограничением скорости вращения центрифуги величиной g не более единицы.

Комплекс может быть использован и для исследования влияния на биологические объекты гипергравитации и ускорения в рамках задач космической биологии и медицины.

Литература

1. Anisimov A. Gradient NMR method for studies of water translational diffusion in plants // Membranes. – 2021. – V. 11, No. 7. – P. 487.

2. Абдрахимов, М. А. Суслов, А. В. Анисимов // Цитология. — 2013. — Т. 55, 6. — С. 414-420.

3. Anisimov and M. A. Suslov. The Effect of External Gas Pressure on the Magnetic Relaxation of Water in Plant Cell, Biophysics, 2016, Vol. 61, 67–72.

4. Suslov, M.A. Anisimov, //Environmental and experimental botany .2019 v162 239-246

5. Anisimov, A.V.; Suslov, M.A.; Alyab'ev, A.Y. J. Plant. Physiol. 2014, 61, 512–520.

6. Anisimov, A.V.; Dautova, N.R.; Suslov, M.A.. Protoplasma. 2019, 256, 1425–1432.

Работа поддержана грантом № 22-74-10087 Российского научного фонда

Ультралокальный термодинамический контроль и управление биологическими процессами с помощью наноалмазного термометра-нагревателя

Ромшин А.М.^{1*}, Цееб В.Э.², Осипов А.А.^{2,3}, Попова И.Ю.², Раденович А.⁴, Глушков Е.⁴, Седов В.С.¹, Баграмов Р.Х.⁵, Филоненко В.П.⁵, Власов И.И.¹

¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия;

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуццино, Россия;

³Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва, Россия;

⁴Федеральная Политехническая Школа Лозанны (EPFL), Лозанна, Швейцария;

⁵Институт физики высоких давлений им. Верещагина РАН, Москва, Россия.

alex_31r@mail.ru

Изучение термодинамики внутриклеточных процессов является новым направлением в науке, прогресс которого критически зависит от создания инструментария, способного прецизионно наводить и измерять температурные градиенты в микро/наноскопических объемах внутри и вблизи живых клеток. Такой ультралокальный термометр-нагреватель (ТН) на основе люминесцирующего наноалмаза, локализованного на торце стеклянного микрокапилляра, был недавно нами разработан [1]. Термочувствительность ТН обеспечивается ансамблем центров окраски “кремний-вакансия” (SiV-центр), встроенных в кристалл в процессе синтеза. Положение максимума бесфонной линии SiV-флуоресценции зависит от температуры и позволяет регистрировать температуру любой микро-/наносистемы после предварительной калибровки.

В качестве первого примера применения алмазного ТН в ультралокальной термической стимуляции мы продемонстрировали изменение уровня свободного внутриклеточного кальция в отдельных раковых клетках HeLa и первичной культуры нейронов [2], а также нейробластоме и кардиомиоцитах H9C2. Было обнаружено, что локальное повышение температуры на 12 °С относительно уровня окружающей среды (22 °С) в объеме ~1-3 мкм³ вблизи плазматической мембраны инициирует высвобождение кальция из внутриклеточных компартментов в цитоплазму и запускает каскад физиологических процессов.

Эффективность применения алмазного ТН в ультралокальной термометрии продемонстрирована на примере обнаружения температурного скачка вблизи микронных кластеров митохондрий в водной среде при разобщении электрон-транспортной цепи [3]. Эксперименты показали, что сброс мембранного потенциала при добавлении разобщителя СССР приводит к выделению тепла митохондриями в диапазоне от 4 до ~ 22 °С по сравнению с уровнем окружающей среды (22 °С), с абсолютным максимумом 45 °С. Спонтанные температурные всплески с сопоставимой амплитудой были также обнаружены до аппликации разобщителя, что может отражать участие некоторых митохондрий 1) в синтезе АТФ или 2) утечку мембранного потенциала во избежание гиперпродукции активных форм кислорода.

Предлагаемый новый подход открывает беспрецедентные возможности для микро- и наномасштабной тепловой инициации физиологических процессов в живых клетках, а также модуляции их скорости в различных внутриклеточных компартментах.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. M. Romshin, V. Zeeb, A.K. Martyanov, O.S. Kudryavtsev, D.G. Pasternak, V.S. Sedov, V.G. Ralchenko, A.G. Sinogeikin, I.I. Vlasov, A new approach to precise mapping of local temperature fields in submicrometer aqueous volumes, *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 14228, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-93374-7.

2. A.M. Romshin, V. Zeeb, E. Glushkov, A. Radenovic, A.G. Sinogeikin, I.I. Vlasov. A new method for ultra-local thermal control of a single living cell, arXiv: arXiv.2206.14890 (2022).

3. Romshin, A. M., Osypov, A. A., Popova, I. Y., Zeeb, V. E., Sinogeikin, A. G., Vlasov, I. I. Heat release by isolated mouse brain mitochondria detected with diamond thermometer. *Nanomaterials*, 13(1), 98, Jan. 2023, doi: 10.3390/nano13010098.

Эффективность проникновения в клетки борсодержащих аптамеров, новых потенциальных агентов доставки бора для бор-нейтронозахватной терапии

Новопашина Д.С.¹, Дымова М.А.¹, Давыдова А.С.¹, Мещанинова М.И.¹, Малышева Д.О.^{1*}, Кулигина Е.В.¹, Рихтер В.А.¹, Колесников Я.А.¹, Таскаев С.Ю.², Воробьева М.А.¹

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия;*

²*Институт ядерной физики имени Г.И.Будкера СО РАН, Новосибирск, Россия;*

d.malysheva@g.nsu.ru

Мультиформная глиобластома – распространённая агрессивная форма опухолей мозга. Гетерогенность и высокая инвазивность данной опухоли делают её резистентной к традиционным радио- и химиотерапевтическим методам лечения. Двухлетняя выживаемость используемых сейчас способах терапии составляет 26.5% [1], общая выживаемость более 10 лет равна 0.71% [2]. Перспективным подходом к лечению данной формы опухоли является бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ), в физической основе которой лежит распад изотопа бора-10 внутри опухолевых клеток при облучении потоком эпитепловых нейтронов. Одним из главных препятствий внедрения БНЗТ в массовую клиническую практику является проблема таргетной доставки изотопа бора-10 в раковые клетки. Борсодержащий препарат должен иметь минимальную токсичность, высокую эффективность доставки в раковые клетки и минимальную степень поглощения здоровыми клетками.

Перспективными препаратами являются бормодифицированные аптамеры —ДНК- или РНК-олигонуклеотиды, конъюгированные с кластерами клозо-додекабората, способные селективно связываться с опухолевыми клетками. Ранее в ИХБФМ СО РАН была показана возможность применения аптамеров для таргетной доставки бора в опухолевые клетки для БНЗТ [3].

Целью данной работы было: (1) качественно оценить эффективность проникновения борсодержащих аптамеров в клетки глиобластомы человека U-87 MG; (2) количественно оценить содержание бора в клетках глиобластомы человека после их инкубации с борсодержащим аптамером.

Материалы и методы: в работе использовали клеточные культуры глиобластомы человека U-87 MG и нормальные фибробласты человека hFF8. Оценку эффективности проникновения аптамеров в клетки глиобластомы человека U-87 MG проводили с помощью метода конфокальной микроскопии; оценку накопления бора - с помощью атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-АЭС).

Результаты: По данным микроскопии, наиболее эффективно в клетки проникал 2'-фтор-модифицированный РНК-аптамер GL44, несущий на 5'-конце клозо-додекаборат. Поглощение бора клетками U-

87 МГ после их инкубации с данным аптамерным конъюгатом и последующей промывки составило $1,5 \cdot 10^9$ атомов В на клетку по данным ИСП-АЭС.

Заключение: Показана принципиальная возможность использования аптамеров для доставки бора, поскольку такой агент доставки селективно проникает в опухолевую клетки и обеспечивает достаточную для БНЗТ внутриклеточную концентрацию бора. В дальнейшем мы планируем провести исследование эффективности модифицированных аптамеров как таргетных доставщиков бора при БНЗТ на экспериментальных животных.

Работа проведена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 19-74- 20127.

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96. doi: 10.1056/NEJMoa043330. PMID: 15758009

2. Tykocki T, Eltayeb M. Ten-year survival in glioblastoma. A systematic review. *J Clin Neurosci.* 2018 Aug;54:7-13. doi: 10.1016/j.jocn.2018.05.002. Epub 2018 May 23. PMID: 29801989.

3. Vorobyeva MA, Dymova MA, Novopashina DS, Kuligina E V., Timoshenko V V., Kolesnikov IA, et al. Tumor cell-specific 2'-fluoro RNA aptamer conjugated with closo-dodecaborate as a potential agent for boron neutron capture therapy. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22147326>.

Дискуссионный клуб

Адаптационный механизм действия гипоксии согласно митохондриально-аргининовой теории старения

Касумов Э.А.^{1*}, Касумов Р.Э.¹, Касумова И.В.¹
¹ООО Научно-производственный центр «КОРВЕТ»;
kasumov_eldar@mail.ru

Гипоксия вызывает закономерно развивающиеся изменения ультраструктуры клеток, причем определяющую роль в них играет повреждение митохондрий. Патология митохондрий выражается в появлении нескольких типичных форм изменений, зависящих от длительности и тяжести гипоксического воздействия и представляет собой сложный многоступенчатый процесс [1]: 1 стадия, кратковременная активация комплекса I электрон-транспортной цепи и увеличение содержания субъединиц цитохром bc1 комплексов; 2 стадия, при усилении гипоксии происходят подавление комплекса I и компенсаторная активация комплекса II; 3 стадия (истощение) развивается при очень низких значениях рО₂ или длительном гипоксическом воздействии и сопровождается подавлением комплекса III (цитохром bc1 комплекс), а затем и комплекса IV, что приводит к дезэнергизации клетки.

Одновременно данное гипоксическое воздействие в 1 стадии приводило к повышению плотности матрикса, увеличению количества органелл с плотно и параллельно упакованными кристами, что отражает усиление окислительного фосфорилирования и снижение уровня активных форм кислорода (АФК). Аналогичное влияние гипоксии происходит на митохондрии растений [2]. Продолжительная гипоксия (3 стадия) вызывает набухание митохондрий с уменьшением крист, конденсацию митохондриального матрикса и повышение уровня АФК.

Приобретение параллельно упакованных крист ультраструктуры митохондрий под действием начальных стадий гипоксии невозможно объяснить с точки зрения классического механизма функционирования митохондрий, но легко можно объяснить с помощью митохондриально-аргининовой теории старения. В основе этой теории лежит механо-хемиосмотический механизм сопряжения, где сопряжены перенос электронов, низкоамплитудное набухание-сокращение митохондрий и синтез АТФ (<https://www.youtube.com/watch?v=48jScej4dl0>) [3]. Согласно этому механизму, при сокращении внутрикристного пространства митохондрий, электрон переносится от [2Fe-2S] кластера одного димера на гем c1 другого димера цитохром bc1 комплекса, расположенного на противоположной стороне мембраны крист, а при набухании внутрикристного пространства перенос электронов прекращается. Этот механизм выполняет важную регуляторную роль. В условиях гипоксии для максимально эффективного расхода дефицитного кислорода митохондрии приобретают параллельную упаковку крист, в результате чего создается возможность одновременных контактов между димерами цитохром bc1 комплексов и снижается уровень АФК.

Таким образом, эпизодическая гипоксия может обеспечить защиту от клеточного стресса и апоптоза, снижая АФК [4], что является важнейшим вкладом в антивозрастную программу для продления активного долголетия.

1. Lukyanova L.D. Mitochondrial signaling in hypoxia. *Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases*, 2013, 3, 213-225 <http://dx.doi.org/10.4236/ojemd.2013.33029>

2. Vartapetian B.B., Andreeva I.N., Generozova I.P., Polyakova L.I., Maslova I.P., Dolgikh Y.I., Stepanova A.Y. Functional electron microscopy in studies of plant response and adaptation to anaerobic stress. *Ann Bot.*, 2003, Spec no. 91, 155-172

3. Kasumov E.A., Kasumov R.E., Kasumova I.V. A mechano-chemiosmotic model for the coupling of electron and proton transfer to ATP synthesis in energy-transforming membranes: a personal perspective. *Photosynth Res* 123, 1–22 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0043-3>.

4. Heß V., Kasim M., Mathia S., Persson P.B., Rosenberger Ch., Föhling M. Episodic Hypoxia Promotes Defence Against Cellular Stress. *Cell Physiol Biochem.*, 2019, vol. 52, pp. 1075-1091, doi: 10.33594/000000073

Влияние механического и магнитного воздействия на электромагнитное излучение водных растворов иммуноглобулина G

Гаркуша М.В.^{1*}, Родионова Н.Н.¹
¹ООО "НПФ "Материа Медика Холдинг";
garkushamv@materiamedica.ru

Вода – это уникальная природная субстанция, исследования которой приобретают всё больший масштаб. Известно, что оказание на неё разного рода воздействий способно привести к изменению свойств как самой воды, так и различных водных растворов. Ранее было установлено, что внешние воздействия, такие как механическое встряхивание[1] или облучение магнитным полем[2,3], оказывают явные, хорошо регистрируемые эффекты на характеристики водных растворов. В связи с этим мы решили изучить, как повлияет на водные растворы IgG вертикальное встряхивание с частотой 4,4 Гц, а также облучение переменным магнитным полем с частотой 8Гц и 50Гц.

В работе изучался водный раствор иммуноглобулина G (IgG). В качестве контроля использовалась Milli-Q вода (удельное сопротивление 18 МΩ*см при 25°C).

Образцы исследовали при помощи установки, разработанной на базе фотозлектронного умножителя HC135 версии hc135-01 (Hamamatsu Photonics, Япония), для детектирования собственного электромагнитного излучения от растворов в видимом (300-650 нм) диапазоне, которое генерируется образцами после оказания на них дополнительного специфического воздействия (встряхивания или облучения магнитным полем). Перед проведением измерений на исходный раствор белка и воды было оказано дополнительное воздействие. Оценивался исходный раствор IgG и вода: 1) без дополнительного воздействия перед измерением; 2) после вертикального механического встряхивания с амплитудой 20 мм и частотой 4,4Гц; 3) после облучения переменным магнитным полем с индукцией 60 мкТл и частотой 8 Гц; 4) после облучения переменным магнитным полем с индукцией 60 мкТл и частотой 50 Гц. Полученные результаты подвергались статистическому анализу – в зависимости от нормальности распределения применялся U- или T-критерий, а также дисперсионный анализ и перестановочный тест. Статистически значимыми считались отличия при $p < 0,05$.

Нами было установлено, что в области 300 – 650 нм:

1) Как и ожидалось, собственное излучение раствора IgG и воды, которые не подвергались дополнительному воздействию перед измерением, не отличается;

2) После облучения переменным магнитным полем с частотой 8Гц, и 50 Гц собственное излучение раствора IgG стало статистически значимо более высоким, чем у IgG без дополнительного воздействия, в отличии от воды, собственное излучение которой после воздействия аналогичными магнитными полями не изменилось;

3) После дополнительного встряхивания собственное излучение воды стало статистически значимо более высоким, чем у воды без дополнительного воздействия, в отличие от раствора IgG, собственное излучение которого после дополнительного встряхивания не изменилось;

Таким образом, нами было выявлено, что разный тип воздействия оказывает влияние на разные по составу растворы, в частности: раствор IgG чувствителен в магнитному воздействию, а вода к механическому воздействию (встряхиванию).

[1] Gudkov S.V., Penkov N.V., Baimler I.V., Lyakhov G.A., Pustovoy V.I., Simakin A.V., Sarimov R.M., Scherbakov I.A. Effect of mechanical shaking on the physicochemical properties of aqueous solutions // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol.21, №21. – P.8033. doi:10.3390/ijms21218033

[2] Chuchai Sronsri, Kongpop U-yen, Wanpasuk Sittipol, Analyses of vibrational spectroscopy, thermal property and salt solubility of magnetized water, Journal of Molecular Liquids, Volume 323, 2021, 114613, ISSN 0167-7322, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114613>

[3] Pornchai Premkaisorn and Wanpen Wasupongpun (2020). Magnetic Field Effect on Physicochemical Properties of Water, RMUTP Research Journal, 14(2), 1-17

Изменение в крови собак при поении кавитированной водой

Барбин Н.М.^{1,2*}, Дроздова Л.И.², Барашкин М.И.², Шакиров В.Е.², Мильштейн И.М.²

¹Уральский институт государственной противопожарной службы МЧС России;

²Уральский государственный аграрный университет;

nmbarbin@mail.ru

Биохимические показатели крови характеризуют состояние организма. На организм оказывают воздействия различные факторы, в том числе биологически активные вещества.

Физические воздействия на воду ведут к изменению ее биологической активности.

Под кавитацией понимают процесс нарушения сплошности внутри жидкости с образованием и схлопыванием парогазовых пузырьков и их скоплений. При этом в жидкостях происходят сложные физико-химические явления, в результате которых не только ускоряются отдельные химические реакции, но и происходят реакции, не идущие в других условиях.

В ФГУП НИИ «Гермес» (г.Златоуст) разработаны технология и оборудование (роторный гидроударный активатор) для механической обработки жидкостей гидроударами и кавитацией.

Установка представляла собой настольный аппарат, состоящий из роторно-статорного модуля, выполненного из нержавеющей стали, закрепленного на штативе и погружаемого в пластиковый сосуд емкостью 6 литров. Обрабатываемый объем воды составляет 5 литров. При включении в сеть (220 в) ротор начинал вращение с частотой 2750 об./мин. Вода, поступающая в модуль через специальные окна, подвергалась кавитации.

Собаки случайным образом были распределены в две группы: 5 собак в контрольную группу и 5 собак в опытную группу.

У всех животных отбирали венозную кровь в вакуумные пробирки. Анализ крови проводился общепринятыми методами.

Определяли следующие ферменты в крови собак: аланинаминотрансферазу (АлАТ), аспаратаминотрансферазу (АсАТ), амилазу, щелочную фосфатазу.

Ферменты — это вещества белкового происхождения, осуществляющие все основные биохимические реакции в организме.

У контрольной группы диапазон амилазы в плазме крови составил от 321,9 до 525,2 Ед/л, среднее значение амилазы составило 433,1 Ед/л.

Содержание амилазы в крови опытной группы находилось в диапазоне от 436,6 до 577,7 Ед/л, при среднем значении — 497,1 Ед/л.

Среднее содержание амилазы в плазме крови у опытной группы выше контрольной группы.

У опытной группы собак по сравнению с контрольной выявлена тенденция к снижению АлАТ, АсАТ, и тенденция к увеличению щелочной фосфатазы, α -амилазы.

По среднему значению у опытной группы собак на конец эксперимента отмечено снижение уровня активности АлАТ на 9% по отношению к контрольной группе, для АсАТ снижение уровня активности составило 28,3%. По среднему значению для контрольной группы собак отношение АлАТ/АсАТ=1,10 у.е., для опытной группы собак АлАТ/АсАТ=1,17 у.е., для опытной группы увеличение составило 6%. Данные показатели указывают на снижение проницаемости мембран гепатоцитов и на нормализацию функций печени животных из опытной группы.

У опытной группы собак отмечено увеличение активности щелочной фосфатазы на 10,6%, что указывает на активизацию выделительной функции печени у опытных собак.

У опытной группы животных отмечена тенденция к увеличению активности α -амилазы в плазме крови на 12,9% относительно контроля, что указывает на улучшение состояния поджелудочной железы и улучшение ее пищеварительной функции.

Обнаружен положительный эффект применения воды прошедшей кавитационную обработку на собак (на желудочно-кишечный тракт), что проявлялось в нормализации функций печени, поджелудочной железы и снижением антигенной нагрузки на кишечник.

Изучение модифицирующего действия сверхвысоких разведений гемоглобина и люминола на модели люминол-зависимой хемилюминесценции с гемоглобином

Макаров А.Ю.^{1*}, Фёдорова М.М.¹

¹РТУ - МИРЭА;

makarov.ayu@yandex.ru

В настоящее время всё большую актуальность приобретают исследования физико-химических свойств сверхвысоких разведений (СВР) различных веществ [1, 2]. СВР обладают способностью изменять физико-химические свойства ряда хорошо изученных модельных систем, то есть обладают модифицирующим действием [3]. Данное модифицирующее действие уже применяется как для регуляции молекулярно-биологических процессов, так и в материаловедении [4, 5].

Целью данной работы было изучение модифицирующего действия СВР гемоглобина, а также СВР люминола на хорошо известной модели люминол-зависимой хемилюминесценции гемоглобина в присутствии пероксида водорода.

В качестве экспериментальных образцов использовались СВР гемоглобина, СВР люминола, а в качестве технологического и интактного контролей были взяты СВР очищенной воды и очищенная вода, соответственно. Выполнение измерений технологического контроля было необходимо для того, чтобы учесть как возможные погрешности выполнения технологии, так и возможное влияние самой технологии последовательных разведений на свойства растворителя. Методика приготовления СВР представляла собой ряд последовательных стократных разбавлений, сопряженных с интенсивным механическим воздействием (встряхиванием). Для выполнения измерений, к смеси фосфатного буфера, гемоглобина, люминола и экспериментального образца или контроля, добавляли пероксид водорода, после чего происходило его взаимодействие с гемоглобином с образованием радикалов, приводящих к окислению люминола с последующей хемилюминесценцией. Конечные концентрации составляли: фосфатного буфера 4,92 мМ, гемоглобина 0,167 мкМ, люминола 83,3 мкМ, пероксида водорода 30 мкМ, а также по 150 мкл экспериментальных образцов или контролей. Конечный объем смеси составлял 300 мкл. Измерения проводились на хемилюминометре Lum-1200 (ДиСОФТ, Россия) при температуре 37 °С в течение 10 минут.

В результате эксперимента было установлено, что интенсивность хемилюминесценции через 3 минуты после добавления пероксида водорода в присутствии СВР люминола или СВР гемоглобина статистически значимо ($p < 0.05$) уменьшилась на 12,4% и 21,8% соответственно по сравнению с образцом содержащим воду очищенную. Также есть статистически значимое отличие между образцами, содержащими: СВР очищенной воды и СВР гемоглобина, равное 17,55%; СВР гемоглобина и СВР люминола, равное 11,96%. При этом между образцами, содержащими воду очищенную и СВР очищенной воды, статистически значимых отличий нет. Абсолютные значения (в тысячах пульсов в секунду) образцов с: интактной очищенной водой $8,698 \pm 0,342$; СВР очищенной воды $8,253 \pm 0,686$; СВР люминола $7,620 \pm 0,259$; СВР гемоглобина $6,805 \pm 0,150$. Результаты описательной статистики представлены в формате Среднее \pm Стандартное отклонение. Межгрупповое сравнение выполнялось при помощи критерия Стьюдента.

Таким образом однозначно показано модифицирующее действие СВР гемоглобина и СВР люминола на модели люминол-зависимой хемилюминесценции смеси гемоглобина в присутствии пероксида водорода, что свидетельствует об изменении физико-химических свойств модельной системы.

Модифицирующее действие СВР может быть использовано как для создания новых, так и для контроля качества существующих лекарственных препаратов, для исследования экспериментальных моделей, имеющих большое медико-биологическое применение в понимании биофизических основ патофизиологических процессов, в материаловедении и других отраслях.

[1] Bunkin, N. F., Shkirin, A. V., Ninham, B. W., Chirikov, S. N., Chaikov, L. L., Penkov, N. V., ... & Gudkov, S. V. (2020). Shaking-induced aggregation and flotation in immunoglobulin dispersions: Differences between water and water-ethanol mixtures. *ACS omega*, 5(24), 14689-14701

[2] Shcherbakov, I. A. (2022). Current trends in the studies of aqueous solutions. *Physics of Wave Phenomena*, 30(3), 129-134

[3] Epstein O. I. et al. Membrane and synaptic effects of anti-S-100 are prevented by the same antibodies in low concentrations. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 8, 79-84. (2003)

[4] Novikov, V. V., Yablokova, E. V., & Fesenko, E. E. (2020). The role of water in the effect of weak combined magnetic fields on production of reactive oxygen species (ROS) by neutrophils. *Applied Sciences*, 10(9), 3326.

[5] Spitsin, A. I., Bush, A. A., & Kamentsev, K. E. (2020). Piezoelectric and dielectric properties of Bi₃TiNbO₉ prepared by hot pressing from powders activated using the serial dilution method. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.

Квантовая биоэнергетика живых клеток и организмов

Галль Л.Н.^{1*}

¹Институт Аналитического Приборостроения РАН;
Ingall@yandex.ru

В докладе, со ссылками на первоисточники, излагаются основные принципы квантовой биоэнергетики. Биоэнергетика, основанная на законах квантовой физики и понимаемая, как движение энергетических потоков по молекулярным системам живой клетки (организма), является результатом единства физических механизмов трех систем: молекулярной системы биополимеров данного организма, структурированных систем молекул воды, связывающих его биополимеры, и потоков квантов электромагнитного поля в энергетическом диапазоне, не разрушающем единую молекулярно-водную структуру организма[1]. Биополимеры живых организмов, когда-то победившие в предбиологической эволюции, обладают структурой, насыщенной осцилляторами, способными переводить внешнюю, неспецифическую для полимера, энергию, квантовую или механическую, в специфическую для него[2] квантовую, причем в диапазоне энергий, являющихся неразрушающими для водно-молекулярных систем живого. Количество осцилляторов существенно возрастает при гидратации биополимера[3]. Это делает биополимер уникальной «энергетической машиной» живой системы, создающей квантовые энергетические потоки. Молекулы воды при гидратации биополимера образуют на его гидрофильных центрах стержневые квазифрактальные энергонапряженные структуры[4], связывающие все биополимеры и малые биомолекулы как в клетке, так и между клетками, и являющиеся магистралями для транспортировки квантовых потоков, как биохимических, так и управляющих, без их поглощения водной средой цитоплазмы клетки. Это обеспечивает единую систему биоэнергетики живого организма любой сложности как при обеспечении межмолекулярных реакций, так и при управлении их последовательностью и синхронностью.

Все перечисленные процессы уже имеют достоверное экспериментальное подтверждение: переизлучение энергии биополимером в работах Карери[5], Кокая[6] и др.; образование солитонов при гидратации в работах Александра, два состояния воды в живых системах – в работах Хохловой[7], Галль и др[8]. Условия проведения экспериментов и их результаты будут представлены в докладе.

1 Галль Л.Н. Квантовая физика и биоэнергетика живых организмов. СПб 2023.

2 Давыдов А.С. Солитоны в биоэнергетике. Киев. Наукова думка, 1984, 282с.

3 Alexander D.M, Krumhansl J.A. Localized excitations in hydrogen-bonded molecular crystals. // Phys Rev, V 33. 1986: 7172-85.

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

5 Careri G. Search for Cooperative Phenomena in Hydrogen-Bonded Amide Structures. In: Haken H., Wagner M. (eds) Cooperative Phenomena. Springer-Verlag. Berlin, 1973. P. 391–394.; См.: Careri G., Buontempo U., Galluzzi F., Scott A. C., Gratton E., Shyamsunder E. Spectroscopic evidence for Davydov-like solitons in acetanilide // Physical Review B. 1984. Bd. 30, p. 4689–4702..

6 Кокая А.А. и др. Специфичность действия электромагнитного излучения преобразованного различными биоструктурами. // Вестн. Росс. воен-мед. акад. – 2012. – № (40). – С. 163–168.

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

8 Л. Н. Галль, Т. Э. Кулешова, Н. Р. Галль, А. С. Бердников, И. Р. Галль.

О физико-химических свойствах воды в цитоплазме клеток растений. Журнал физической химии, 2023, том 97, № 1, с. 1–5.

Митохондриально-аргининовая теория старения согласно механо-хемиосмотическому механизму

Касумов Э.А.^{1*}, Касумов Р.Э.¹, Касумова И.В.¹

¹ООО Научно-производственный центр «КОРВЕТ»;
kasumov_eldar@mail.ru

Митохондриальная теория старения Хармана [1], которая является “расширенной версией” гипотезы свободных радикалов, основывается на том, что старение происходит из-за кумулятивного воздействия свободных радикалов на митохондриальную ДНК и ее функцию. Согласно этой теории, митохондрии являются основным источником разрушительных свободных радикалов, которые атакуют различные компоненты клетки, и утечка свободных радикалов из дыхательных цепей митохондрий происходит практически неконтролируемо и

постоянно. Это означает, что животные, имеющие высокий уровень метаболизма, быстро образуют свободные радикалы и живут недолго, а животные с низким уровнем метаболизма, наоборот. Несмотря на то, что эта точка зрения не оправдалась, митохондриальная теория старения учитывает исключительную важность роли митохондрий в жизнедеятельности живых организмов и старении, следовательно, представляет огромный интерес. По нашему мнению, данная теория не в состоянии полностью объяснить механизм старения из-за недостаточного знания механизмов функционирования митохондрий. Известно, что активная форма кислорода (АФК) образуется также в молодых организмах и играет важную физиологическую роль в клеточных процессах и процессах развития организма. Например, низкий уровень АФК участвует в селективном удалении митохондрий в митофагии, тогда как высокий уровень участвует в неселективной макроаутофагии [2]. Считается, что причиной образования повышенного уровня АФК является задержка электрона больше оптимально необходимого времени в электрон транспортной цепи (ЭТЦ) на участках до цитохрома с внутренней митохондриальной мембраны, что в результате образовавшаяся АФК вызывает цепные реакции перекисного окисления липидов, повреждение митохондриальной ДНК, дисфункции митохондрий, апоптоз и гибель клеток. Однако, до сих пор остается непонятной причина задержки электрона в ЭТЦ. По предложенной нами механо-хемиосмотической модели сопряженными являются процессы: перенос электронов по ЭТЦ, циклическое низкоамплитудное набухание-сокращение митохондрий и синтез АТФ (<https://www.youtube.com/watch?v=48jScej4dl0>) [3]. Согласно этой модели, при сокращении внутрикristного пространства митохондрий, электрон переносится от [2Fe-2S] кластера одного димера на гем c1 другого димера цитохром bc1 комплекса, расположенного на противоположной стороне мембраны крист, а при набухании внутрикristного пространства перенос электронов прекращается, и это выполняет регуляторную роль. Гиперосмотические условия, в т.ч. вызываемые дефицитом воды в цитозоле старых организмов, увеличивают время циклического набухания-сокращения митохондрий, что является причиной задержки переноса электрона в ЭТЦ, уменьшения скорости синтеза АТФ и образования АФК. В свою очередь, повышенное количество АФК вызывает сильную деполаризацию (слабая деполаризация-реполаризация является составной частью функционирования митохондрий), открытие митохондриальной поры переходной проницаемости и апоптоз. Согласно механо-хемиосмотическому механизму циклическое низкоамплитудное набухание-сокращение митохондрий сопровождается вращением γ -субъединицы и скручиванием-раскручиванием b2-субъединиц АТФ синтазы, где остатки аргинина и лизина выполняют ключевую роль. Остатки лизина и аргинина участвуют в трансформации энергии, как при синтезе АТФ в митохондриях, так и при гидролизе АТФ в мышцах. В связи с тем, что синтез аргинина уменьшается в человеческом организме после 28 лет, то дефицит аргинина и лизина приводит не только к дефициту энергии в организме, а также нарушаются другие важные функции, связанные с этими аминокислотами. Лизин и аргинин оказывают влияние на длину теломеров, на гормональную регуляцию, эпигенетическую регуляцию гистонов и др. белки. Высокие концентрации глюкозы вызывают набухание митохондрий [4], снижающее эффект гипоксии в раковых клетках [5] и являются причиной гликирования остатков лизинов и аргининов белков при старении [6].

Таким образом, мы предлагаем митохондриально-аргининовую теорию старения в основе которой лежит, снижение синтеза аргинина и дисфункция митохондрий с возрастом. Дисфункция митохондрий, сопровождающаяся уменьшением частоты низкоамплитудного цикла набухания-сокращения, вызывается каскадными процессами, происходящими генетически обусловленным снижением количества воды в организме, связанным в т.ч. с повышением концентрации глюкозы с возрастом; дефицитом аргинина и лизина; уменьшением физической активности, приводящим к повышению уровня сахаров и снижению уровня АДФ (АДФ в клетке является триггером функционирования митохондрий). В свою очередь, из-за дисфункции митохондрий происходит гликирование белков вследствие повышения концентрации сахаров и АФК. Итак, для достижения здорового долголетия необходимы: регулярная физическая активность, прием достаточного количества воды, сбалансированное питание с учетом устранения дефицита аргинина и лизина, сон и отсутствие дистресса [7-8].

1. Harman D. J. Gerontol. (1956). V. 11. P. 298-300.

2. Sinenko SA, Starkova TY, Kuzmin AA and Tomilin AN. Front. Cell Dev. Biol. (2021). 9:714370. doi: 10.3389/fcell.2021.714370

3. Kasumov E.A., Kasumov R.E., Kasumova I.V. Photosynth Res 123, 1–22 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0043-3>.

4. Alca'ntar-Ferna'ndez J, Gonza'lez-Maciell A, Reynoso-Robles R, Pe'rez Andrade ME, Herna'ndezVa'zquez AdJ, Vela'zquez-Arellano A, et al. PLoS ONE (2019). 14(12): e0226652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226652>

5. Ögünç Keçeci, Y., İncesu, Z. Mol Biol Rep (2022). <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07400-6>

6. Haus J.M., Carrithers J.A., Trappe S.W., Trappe T.A. J. Appl. Physiol., (2007). 103 pp. 2068-2076

7. Kasumov EA, Kasumov RE, Kasumova IV (2015). Organic Chem Curr Res 4:136. doi:10.4172/2161-0401.1000136

8. Kasumov E.A., Kasumov R.E., Kasumova I.V. J. Nov. Physiother. Phys. Rehabil., (2020). 7: 1, pp. 033-035. DOI:

<https://dx.doi.org/10.17352/2455-5487.000075>

Нелинейная динамика клеток при онкологических трансформациях и в условиях микрогравитации

Наймарк О.Б.^{1*}

¹*Институт механики сплошных сред УрО РАН;*
naimark@icmm.ru

Полевая теория дефектов используется для механобиологического исследования клеток в условиях онкологических трансформаций и при действии микрогравитации. В соответствии с определением Шредингера ДНК как биологического кристалла, механизмы трансформации в ДНК и клетки ассоциируются с нелинейной динамикой дефектов («открытых состояний»). Статистическая термодинамика «открытых состояний» в ансамбле ДНК позволила установить вид неравновесной свободной энергии в терминах «параметра порядка», определяющего деформацию, индуцированную «открытыми состояниями». Установлен специальный тип критических явлений (структурно-скейлинговые переходы), связывающий нелинейную динамику параметра порядка с условиями «термализации» - «эффективной температурой», отражающей взаимодействие открытых комплексов, и роль последних в различных сценариях экспрессии генов [1-4]. Коллективные моды «открытых состояний» имеют природу автомодельных решений и могут рассматриваться как механизм, связанный с динамикой экспрессии генов, транскрипции и деления клеток [5, 6]. Разнообразие структурно-скейлинговых переходов и типов метастабильности потенциала (неравновесной свободной энергии), обусловленных «открытыми состояниями», позволяют предложить объяснение ландшафтов Вэдингтона при эволюции клеток [7, 8]. Показано, что динамика «открытых состояний» как дефектов может быть ассоциирована с «пластичными» состояниями нормальных клеток и «квазихрупкими» состояниями раковых клеток с соответствующей динамикой экспрессии. Установленные закономерности «критичности» в поведении «открытых состояний» использованы для интерпретации оригинальных экспериментальных данных прижизненной динамики клеток, полученных методом лазерной (интерференционной) микроскопии [8]. Анализ флуктуаций «фазовых толщин» позволил установить существование мультифрактальных спектров для нормальных (пластичных) клеток и монофрактальный для «охрупченных» раковых клеток [9]. Анализ влияния внешних сил на динамику клеток позволил предложить объяснение изменения фенотипов в условиях микрогравитации. Результаты анализа прижизненной динамики клеток сопоставлены с данными обработки флуктуаций температурного поля, установившими признаки мультифрактальности для здоровой ткани и монофрактальности для ткани с онкологическими патологиями [10].

Исследования поддержаны государственным контрактом АААА-А19-119013090021-5.

References

1. Naimark O. Defect-induced transitions as mechanisms of plasticity and failure in multifield continua, in: *Advances in Multifield Theories for Continua with Substructure*, Springer, 2004, pp. 75–114.
2. Naimark O.B. Structural-scaling transitions and localized distortion modes in the DNA double helix. *Physical Mesomechanics*. 2007. V. 1. № 10. P. 33–45.
3. Nikitiuk A., Bayandin Yu, Naimark O. Statistical thermodynamics of DNA with open states *Physica A*, 607, (2022) P.128-156.
4. Bizzarri M., Naimark O., Nieto-Villa J., Fedeli V., Giuliani A. Complexity in Biological Organization: Deconstruction (and Subsequent Restating) of Key Concepts. *Entropy*. 2020. V. 22. № 8. P. 885. doi: 10.3390/e22080885
5. Naimark O. Nonlinear dynamics and damage induced properties of soft matter with application in oncology. *AIP Conference Proceedings*. 2017. V. 1882. № 1. P. 020052.
6. Goldenfeld N., Woese C. Life is physics: evolution as a collective phenomenon far from equilibrium. *Annu. Rev. Condens. Matter Phys.* 2011. V. 2. № 1. P. 375–399.
7. Waddington C.H. *The strategy of the genes*. Routledge, 2014
8. Naimark O. Mesoscopic cell dynamics in different environment and problem of cancer. *AIP Conference Proceedings*. 2019. V. 2167. № 1. P. 020237
9. Naimark O.B., et al., DNA Transformation, Cell Epigenetic Landscape and Open Complex Dynamics in Cancer Development, *Mathematical Biology and Bioinformatics* 2020. V. 15. № 2. P. 87-104. doi: 10.17537/2020.15.
10. Gerasimova E., Audit B., Roux S.G., Khalil A., Gileva O., Argoul F., Naimark O., Arneodo A. Wavelet-based multifractal analysis of dynamic infrared thermograms to assist in early breast cancer diagnosis. *Frontiers in Physiology*. 2014. V. 5. P. 176. doi: 10.3389/fphys.2014.00176.

Обнаружение специфики воздействия на репродуктивную сферу растений высочайших доз цезия или плутония-америция-стронция (СЭМ-палинотератные данные поверхностных почвенных проб 1988 г. из 30-км зоны Чернобыля)

Левковская Г.М.^{1*}, Тарасевич В.Ф.², Шамаль Н.В.³, Каспаров А.К.¹, Боголюбова А.Н.²

¹*Институт истории материальной культуры РАН;*

²*Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН;*

³*Институт радиобиологии НАН Беларуси;*

* ggstepanova@yandex.ru

Ранее авторами была разработана статистическая палинотератная методика дифференциации геоботанических оптимумов и катастроф на основе количественных данных о вариациях морфологии пыльцы в экологически чистых отложениях многих районов бывшего СССР, поверхностных пробах из Южной Аравии, всех подзон Западной Сибири, и разрезов археологических стоянок с четкой экологией, подтвержденной палеозоологическими данными (библиографические источники приведены в публикациях 2022 года [1, 2]).

Первый этап исследования поверхностных проб из 30-км зоны Чернобыля (ЧАЭС), отобранных в 1988 г., был направлен на решение методического вопроса пригодности использования палинотератной методики для выявления не только природных, но и техногенных экологических катастроф. Были определены палинотератные индикаторы экстремальных экологических обстановок, обусловленных природными или техногенными радиационными факторами: 1. почти полное отсутствие морфологически типичных палиноморф; 2. определяемые формы единичны; 3. доминирование стерильных форм; 4. для природных экстремумов – господство недоразвитых из-за невызревания форм, а в чернобыльском комплексе – неразвите всех или большинства морфологических признаков; 5. только в чернобыльском комплексе – доминирование уродливых форм из-за мутаций; 6. в некоторых типах природных комплексов господство карликовых форм, а в чернобыльских – вариабельность размеров.

В данной статье впервые палинотератные чернобыльские материалы использованы для выявления степени экстремальности воздействия на репродуктивную сферу всех растений радионуклидных комплексов с максимальной концентрацией плутония-америция-стронция ($^{239/240}\text{Pu}$, ^{241}Am , ^{90}Sr) с одной стороны или цезия (^{137}Cs) – с другой. Их периоды полураспада 24 360, 433.2, 28.8, 30.17 лет соответственно.

Максимумы $^{239/240}\text{Pu}=99$, $^{241}\text{Am}=150$, $^{90}\text{Sr}=14\ 000$ Бк/кг зафиксированы в пункте Масаны (12 км от ЧАЭС). Здесь обнаружено также значительное количество $^{137}\text{Cs}=52\ 000$ Бк/кг. МЭД на почве 530 мкР/ч.

Для пробы Масаны на СЭМ-микрографиях задокументирован наиболее экстремальный палинотератный комплекс. Он выглядит как «кладбище пустых внутри форм», т.к. практически у всех палиноморф не сформировались все морфологические признаки, кроме утолщенных оболочек без скульптуры, оконтуривающих пустые внутри зерна. Все формы стерильны. В комплексе встречено лишь одно морфологически типичное зерно с нормально развитой скульптурой – cf. Asteraceae (?). Определены два уродливых зерна Pinaceae: одно – атипично мелкое с асимметричными мешками, а второе – с огромным телом, но карликовыми мешками.

В пробе Крюки (16 км от ЧАЭС) зафиксирован максимум $^{137}\text{Cs}=270\ 000$ Бк/кг (в сравнении с 52 000 Бк/кг в пробе Масаны). МЭД на почве 2200 мкР/ч. Здесь также присутствует значительное количество $^{239/240}\text{Pu}=48$, $^{241}\text{Am}=81$, $^{90}\text{Sr}=4\ 500$ Бк/кг (вместо 99, 150 и 14 000 Бк/кг соответственно в Масанах). Традиционные палинологические и СЭМ-палинотератные исследования комплекса показали отсутствие в нем морфологически типичных пыльцевых зерен. Комплекс Крюки уже не выглядит как «кладбище пустых внутри форм», так как у всех зерен развилось большинство признаков. Но, в результате мутаций каждого признака, комплекс выглядит как скопление монстровидных палиноморф с вариабельностью: 1. контуров пыльцевых зерен, 2. асимметрий, 3. форм или размеров одного и того же признака, 4. толщины экзины от «опухолевидных» разрастаний до эрозий, 5. размеров пыльцевых зерен – от почти нормальных (два пыльцевых зерна Pinaceae) до ультра-карликовых (пыльцевое зерно *Alnus* sp. ~ 10 мкм, в то время как минимальные размеры пыльцы *Alnus glutinosa* и *A. incana* 21.3-21.6 мкм [3: 62]). Все зерна лишены скульптуры, протопласта и стерильны.

В пробе из пункта Лесок (22 км от ЧАЭС), частично защищенного лесом от разноса радиоактивных частиц, концентрация $^{239/240}\text{Pu}=83$, $^{241}\text{Am}=140$, $^{90}\text{Sr}=9\ 100$ и $^{137}\text{Cs}=84\ 100$ Бк/кг. МЭД на почве 890 мкР/ч. Несмотря на значительное загрязнение этой пробы $^{239/240}\text{Pu}$, ^{241}Am , ^{90}Sr (близким к пробе Масаны), здесь почти не встречаются формы с полным неразвитием большинства морфологических признаков, а доминируют формы с разнообразными мутациями, как в комплексе Крюки с максимумом ^{137}Cs . Найдены даже единичные нормально развитые пыльцевые зерна. По-видимому, это связано с защитной ролью лесного массива.

Исследования показали, что наиболее экстремальные условия для репродуктивной сферы всех растений выявлены для местонахождения Масаны с наибольшим загрязнением $^{239/240}\text{Pu}$, ^{241}Am , ^{90}Sr . Этот тип загрязнения приводит не только к полной стерильности комплекса, но и к полному неразвитию большинства морфологических признаков пыльцы – мужских гаметофитов (своеобразных «сперматозоидов») семенных растений.

Комплекс с максимальным загрязнением ^{137}Cs (Крюки) характеризуется также стерильностью и отсутствием скульптуры у большинства форм, хотя уже развиты морфологические признаки с разнообразными монстровидными отклонениями от палиноморфологических норм из-за мутаций.

Данные по местонахождению Лесок показывают, что лес является своеобразным «зонтом» и смягчает воздействие радиации на репродуктивную сферу растений.

Авторы благодарят сотрудников Института радиобиологии НАН Беларуси за предоставление проб и Л.А. Карцеву из БИН РАН за помощь в СЭМ-исследованиях.

1. Левковская Г.М., Каспаров А.К., Боголюбова А.Н. 2022. Дифференциация геоботанических кризисов пошлого и настоящего на основе палинотератной статистики // Актуальные проблемы современной палинологии: Мат. XV Всерос. палинол. конф.. М.: МГУ. С. 201-205. https://doi.org/10.54896/9785891188532_2022_41

2. Levkovskaya G.M., Shamal N.V., Baryshnikov G.F., Bogolyubova A.N. 2022. Types of palynoteralical responses of the plants reproductive sphere to the Chernobyl accident and natural climatic extrema of the Neanderthal epoch // Динамика экосистем в голоцене. Мат. Всерос. конф. СПб. С. 431-437.

3. Куприянова Л.А., Алешина Л.А. 1972. Пыльца и споры растений флоры Европейской части СССР. Т. 1. Л.: Наука. 171 с.

Применение чувствительного к метилированию метода плавления ДНК с высоким разрешением для диагностики заболеваний

Белов Д.А.^{1*}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт аналитического приборостроения Российской академии наук;

belov.da@list.ru

Статус метилирования ДНК является эпигенетическим признаком, широко используемым в качестве биомаркеров для диагностики заболеваний и планирования лечения [1-3]. Одним из наиболее перспективных методов детектирования таких биомаркеров является чувствительное к метилированию метода плавления ДНК с высоким разрешением (MS-HRM), реализующееся на детектирующих амплификаторах после проведения ПЦР-РВ с применением флуоресцентных красителей. Обработка ДНК бисульфитом перед выполнением MS-HRM обеспечивает разный базовый состав между метилированной и не метилированной ДНК, который используется для разделения полученных ампликонов путем плавления с высоким разрешением.

Удобство, низкая стоимость и высокие чувствительность и специфичность делают MS-HRM популярным подходом для решения прикладных задач, из которых наиболее популярной является диагностика онкологических заболеваний и прогнозирование их лечения. Коммерчески доступны наборы для диагностики аутоиммунных и психических заболеваний, онкологических заболеваний: рака молочной железы, толстой кишки, желудка, печени, легких, предстательной железы, меланомы, лейкемии, лимфомы и др. [4-6].

Основным параметром оценки и классификации кривых плавления является температура плавления, на сравнении этого параметра кривых между собой и с эталонными образцами основаны известные методики. Эти методики зачастую не позволяют выявить различия между образцами и адекватно интерпретировать результаты анализа вследствие высоких погрешностей и ограниченного количества определяемых параметров сигналов плавления. Новые методики обработки сигналов плавления ДНК позволят сократить время анализа, обеспечить высокое разрешение и автоматизировать процесс обработки результатов анализа методом плавления ДНК.

Пролонгированное воздействие мм-волн на геном растений

Минасбемян Л.А.^{1*}

¹Ереванский гос. университет;

minlia@ysu.am

С развитием телекоммуникаций и современных цифровых технологий, охватывающих все сферы жизненного пространства человека, изучение тонких механизмов воздействия мм-волн на биологические организмы является важной составляющей проблемы безопасности. Для исследований воздействия мм-волн на

геном организмов, наиболее удобной моделью являются растения, поскольку относительно источника излучения они сохраняют неподвижную ориентацию, а также представляется возможность проводить воздействия в *in vivo* условиях и изучать его пролонгированное действие на ДНК.

Исследования проводились в интервале частот 45-51,8 ГГц. Результаты наших исследований свидетельствуют о понижении температуры плавления ДНК на 2-30°C при воздействии мм-волн на ДНК. В то же время наблюдается увеличение ширины перехода, и выявление пиков как в низкоплавкой, так и в высокоплавких областях ДНК. Это свидетельствует о вытравлении блоков разной величины, которые плавятся кооперативно, что может быть объяснено возрастанием активности ДНК репликации, а также изменением уровня метилирования ДНК. Во всех случаях при воздействии мм-волн наблюдаются конформационные изменения ДНК, которые, как предполагается, носят эпигенетический характер. Для подтверждения этого факта нами также были определены уровни метилирования ДНК для нескольких частот в первом и во втором поколении. Обсуждаются возможные механизмы таких изменений под воздействием мм-волн.

Роль гамма субъединицы в молекулярном механизме синтеза АТФ комплексом АТФ-синтаза

Касумов Э.А.^{1*}, Касумов Р.Э.¹, Касумова И.В.¹
¹ООО Научно-производственный центр «КОРВЕТ» ;
kasumov_eldar@mail.ru

Синтез АТФ комплексом АТФ-синтаза играет фундаментальную роль при окислительном фосфорилировании и фотофосфорилировании в образовании клеточной энергии. Для синтеза одной молекулы АТФ требуется одна молекула АДФ, ион фосфата и протон в активном центре фермента, хотя пути доставки протона и фосфата в классической модели не рассматриваются. В то же время хорошо известно, что связывание иона фосфата и освобождение АТФ являются энергозависимыми процессами. Предполагается, что вращение гамма субъединицы связано с образованием и исчезновением фосфат-связывающего участка [1]. В синтезе и гидролизе АТФ играет важную роль Pi-связывающий положительно заряженный карман P – петли, образующийся из остатков β Lys155, β Arg182 и α Arg376, а также остатки β Thr156, β Glu181, β Glu185, β Asp242 [2,3].

Согласно нашему механо-хемиосмотическому механизму [4], (<https://www.youtube.com/watch?v=48jScej4dl0>), протон и ион фосфата доставляются в связанном состоянии с гамма субъединицей в активные центры АТФ-синтазы против энергетического барьера петли DELSEED, образованной из кислых аминокислотных остатков. При синтезе АТФ фосфорилированный остаток лизина или аргинина на C-конце γ -субъединицы будет взаимодействовать с β Glu181 (при гидролизе АТФ он связывает молекулу воды) Pi-связывающего участка, где при нейтральной области pH β Glu181 будет выступать донором протона для β Arg182.

В каталитическом центре β -субъединицы, по-видимому, протонированный лизин или аргинин гамма субъединицы протонирует β Glu181, а остатки β Lys155, α -Arg376 и β Arg182 разрыхляют структуру иона фосфата, доставленного вместе с протоном гамма субъединицей. В итоге, β Glu181 отрывает OH- группу от HPO₄²⁻ в результате нуклеофильного замещения находящегося в P кармане. Высокоэнергетический PO₃ – радикал (фосфорильная группа) связывается с MgАДФ-, в результате образуются MgАТФ2- и молекула воды (H₂O). Возможно, что, для того, чтобы избежать гидролиза синтезированного АТФ в каталитическом центре, происходит обмен местами MgАТФ2- в β -субъединице и MgАДФ- в α -субъединице.

Таким образом, энергозависимая доставка протонов и ионов фосфата в активные центры АТФ-синтазы происходит с помощью гамма субъединицы против энергетического барьера. В докладе обсуждается также роль β 2-субъединиц в доставке протонов и ионов фосфата в активные центры фермента при вращении гамма субъединицы.

1. Boyer P.D., Catalytic site forms and controls in ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. 1458, 252–262.
2. Menz R.I., Walker J.E., Leslie A.G.W., *Cell* 106. 2001. 331-341. Structure of Bovine Mitochondrial F1-ATPase with Nucleotide Bound to All Three Catalytic Sites: Implications for the Mechanism of Rotary Catalysis.
3. Senior A.S., Nadanaciva S., Weber J. The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2002. V. 1553. P. 188-211.
4. Kasumov E.A., Kasumov R.E., Kasumova I.V. A mechano-chemiosmotic model for the coupling of electron and proton transfer to ATP synthesis in energy-transforming membranes: a personal perspective. *Photosynth Res* 123, 1–22 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0043-3>.

Роль стрессовых факторов в образовании магнитных свойств в живых системах

Халилов Р.И.^{1,2}, Насибова А.Н.^{1,2*}, Фридунбеков И.Ю.²

¹Национальная Академия Наук Азербайджана, Институт Радиационных Проблем;

²Бакинский Государственный Университет;

aygun.nasibova@mail.ru

Методом Электронного Парамагнитного Резонанса (ЭПР) нами изучено влияние стрессовых факторов на живые системы Апшеронского полуострова (Азербайджан). Были исследованы парамагнитные центры исследуемых объектов [1,2,3]. Впервые нами было установлено, что при воздействии стрессовых факторов в живых системах образуются широкие сигналы ЭПР ($g=2,32$; $\Delta H=320$ Гс) характеризующие магнитных наночастиц оксидов железа [1, 4].

В ходе первичных исследований на территории Йодного завода в поселке Рамана Апшеронского полуострова, где радиационный фон колеблется в пределах 4-400 мкР/час, было установлено, что воздействие радиоактивного загрязнения на растения приводит к формированию широкого сигнала ЭПР, характеризующего нанофазные частицы оксида железа, как в листьях, так и в семенах растений. Было обнаружено, что интенсивность этого сигнала выше в листьях, чем в семенах растений [1].

Полученные результаты позволили предположить, что основная ключевая роль в стимуляции образования магнитных наночастиц в листьях растений принадлежит повышенному радиационному фону с высоким содержанием радионуклидов (прежде всего это относится к изотопам ^{226}Ra и ^{238}U). Такие радионуклиды в больших количествах накапливаются в листьях.

Можно считать, что генерация магнитных наночастиц, создающих широкий сигнал ЭПР связана с работой фотосинтетического аппарата в листьях растений [1,5,6].

Действительно, интенсивности широких сигналов ЭПР, которые мы наблюдали в семенах растений, были значительно ниже, чем в листьях. Можно сказать, что явление стимуляции образования магнитных наночастиц у растений, произрастающих на радиоактивно загрязненных территориях, связано с частичным нарушением целостности хлоропластов из-за высокого гамма-излучения. В этом случае будет увеличиваться близость экзогенных источников образования наночастиц (например, ионов железа) к электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) хлоропластов, что будет стимулировать образование наночастиц.

Помимо растений, нами также были изучены некоторые организмы животных. Поведение парамагнитных центров при гамма излучении изучалось также на организмах виноградных улиток (*Helix pomatia*) и лабораторных крысах (*Wistar albino*).

При изучении действия ионизирующего гамма-излучения на виноградные улитки было установлено, что с увеличением дозы облучения интенсивность сигнала свободных радикалов тела и раковины улиток линейно возрастает. Обнаружено, что интенсивность сигнала ЭПР, характеризующего магнитные наночастицы оксида железа, увеличивается с увеличением дозы облучения примерно до 250-350 Гр и линейно снижается при последующем увеличении.

Таким образом, параметры спектров ЭПР тела и раковин улиток могут быть использованы при изучении и биомониторинге экологического состояния окружающей среды.

В ходе исследований методом ЭПР на лабораторных крысах мы впервые показали, что ионизирующее гамма излучение вызывает образование в органах их печени магнитных наночастиц оксида железа.

Обобщая результаты, полученные при исследованиях с живыми системами, можно сказать, что стресс фактор вызывает аномальные магнитные свойства в живых системах.

Литература

1. Khalilov R.I., Nasibova A.N., Serezhenkov V.A., Ramazanov M.A., Kerimov M.K., Garibov A.A., and Vanin A.F. Accumulation of Magnetic Nanoparticles in Plants Grown on Soils of Apsheron Peninsula. *Biophysics*. V.56. I. 2. P. 316-322. 2011.

2. Khalilov R.I., Nasibova A.N., Youssef N. The use of EPR signals of plants as bioindicative parameters in the study of environmental pollution. // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, V. 7. I.9. P.172-175. 2015.

3. Nasibova A.N., Trubitsin B.V., İsmailova S.M., Fridunbekov İ.Y., Qasimov U.M., Khalilov R.I. Impact of stress factors on the generation of nanoparticles in the biological structures. // *Reports of ANAS*. V.71. I.2, P. 35-40. 2015.

4. R.I. Khalilov, A.N. Nasibova, R.J. Gasimov. Magnetic nanoparticles in plants: EPR researchers. *News of Baku University*. I.4. P.55-61. 2011.

5. Aygun Nasibova, Rovshan Khalilov, Uzeyir Qasimov, Boris Trubitsin, Alexander Tikhonov. EPR signals in plant systems and their informational content for environmental studies. // *European Journal of Biotechnology and Bioscience*. V.4. I. 2. P. 43-47. 2016.

6. Khomutov G.B., Potapenkov K.V., Koksharov Y.A., Trubitsin B.V., Tikhonov A.N., Mamedov M.D., Nasibova A.N., İsmailova S.M., Khalilov R.I. Magnetic nanoparticles in biomimetic and biological systems: generation of iron oxide magnetic nanoparticles in DNA complexes, isolated chloroplasts and high plants. / XII International Conference on Nanostructured Materials (Nano-2014). 2014, Moscow, Russia.

Упорядочение белок-индуцированных молекулярных комплексов в водных растворах таблетированных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ

Масленникова О.М.^{1*}, Сибирев А.Л.², Шипко М.Н.², Степович М.А.³

¹*Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента Российской Федерации;*

²*Ивановский государственный энергетический университет им. В.И. Ленина;*

³*Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского;*
o.m.maslennikova@gmail.com

Дисперсные системы, возникающие при разведении в водном растворе белковых наночастиц (в частности, антител к интерферону- γ), являются интересными объектами для наблюдения белок-индуцированных кластеров, а также трансформации их позиционного порядка под влиянием внешних воздействий при изменении концентрации раствора [1]. Так как терапевтическая эффективность многих лекарственных средств лимитируется интенсивностью процессов переноса зарядов ионами и электронами, которые определяются особенностями ближнего порядка молекулярных комплексов, для их изучения может быть использован метод каналирования медленных ионов или электронов [2]. Этот подход реализован в методе газоразрядной визуализации (ГРВ), в котором регистрируются картины свечения воздуха, окружающего каплю раствора, через которую проходят эмитируемые металлическим электродом электроны, имеющие энергию, достаточную для ионизации воздуха – см. [3, 4] и литературу там же. Свечение воздуха представляет картину стереографических проекций следов движения электронов через объемную часть капли раствора и её поверхность. Полученные картины дают возможность оценки геометрических параметров молекулярных комплексов, формирующих каналы облегченного движения, зарядового состояния водных ассоциатов, их ближнего порядка.

В работе методом газоразрядной визуализации изучен характер изменений позиционного порядка в расположенных белок-индуцированных водных ассоциатов в водных растворах таблетированных лекарственных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ . В качестве объектов исследования использовали водные растворы таблетированных форм, которые были получены нанесением растворов антител (концентрацией 10-24 мг/мл) на носитель (89 % сырьевой лактозы, 10 % микрокристаллической целлюлозы, 1 % стеарата магния). Образцы представлены компанией ООО НПФ «Материя Медика Холдинг». Исследования выполнены на приборе «ГРВ-камера» медицинского назначения. Параметрический анализ картин газоразрядного изображения растворов, выполненный с использованием программы GDV Scientific Laboratory [3], позволил определить следующие параметры, характеризующие особенности состояния каналов облегченного движения электронов и, как следствие, параметры молекулярных ассоциатов, образующих стенки каналов: энтропию (по Шенону) S_i , отображающую специфику пространственного расположения и конфигурацию ближнего порядка молекулярных ассоциатов; фрактальность по изолинии F_i , определяемую уровнем пространственного самоподобия, лимитируемого спецификой процессов самоорганизации в растворе; длину изолинии L , пропорциональную свободной энергии Гиббса [5].

Анализ концентрационных зависимостей отклонений перечисленных параметров для растворов, содержащих белковые антитела, от аналогичных параметров для очищенной воды показал следующее. С ростом концентрации вещества таблетированных образцов наблюдается линейное увеличение энтропии. При этом относительные изменения энтропий ΔS_i для образцов с антителами превышают изменения ΔS_i для растворов, их не содержащих. Это указывает на специфическое влияние антител на пространственное расположение водных ассоциатов в растворах, что находится в согласии с концентрационным изменением параметра фрактальности по изолинии F_i . Повышение концентрации антител в растворе обеспечивает интенсификацию кооперативных межмолекулярных взаимодействий между водными ассоциатами. Это может быть связано со специфической структурной организацией раствора на микроуровне, лимитирующей процессы самоорганизации [5]. Следовательно, несмотря на низкую концентрацию антител в растворах (около 10-24 мг/мл), недостаточную для существенных изменений в его материально-энергетическом балансе, наличие молекулярных комплексов растворителя обеспечили формирование специфических водных ассоциатов, изменяющих свободную энергию Гиббса. С учетом изменений энтропии, активация растворов антителами к интерферону- γ связана с интенсификацией ассоциативных процессов, сопровождающихся упорядочением белок-индуцированных

молекулярных комплексов [6]. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении в растворах таблетированных образцов с антителами к интерферону водных ассоциатов, сформированных в процессе сверхвысокого разведения [7].

Литература

1. Epstein Oleg. The Spatial Homeostasis Hypothesis // Symmetry. 2018. Vol. 10. Issue 4. Art. No. 103. DOI: <https://doi.org/10.3390/sym10040103>.

2. Высоцкий В.И., Карлаш А.Ю. Особенности селективного транспорта и каналирования ионов в водной среде в каналах биологических мембран // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейронные исследования. 2010. № 12. С. 64.

3. Коротков К.Г. Принципы анализа ГРВ биоэлектрографии. Санкт-Петербург: Реноме, 2007. 286 с.

4. 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. DOI: 10.31857/S0367676520070273.

5. Эпштейн О.И. Феномен релиз-активности и гипотеза пространственного гомеостаза // Успехи физиологических наук. 2013. Т. 44. № 3. С. 54.

6. Elena Don, Natalie Van der Meide, Valery Egorov, Mikhail Putilovskiy, Sergey Tarasov. The level of natural anionantibodies to IFN-gamma in varicella infection treated with antiviral drug Anaferon for children: A pilot Study // Immunology Letters. 2020. Vol. 222. P. 90. DOI: 10.1016/j.imlet.2019.10.015.

7. Масленникова О.М., Шипко М.Н., Сибирев А.Л., Степович М.А. Особенности белок-индуцированных ассоциатов при сверхвысоком разведении антител к интерферону- γ // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2022. Т. 7. № 3. С. 467.

Этапы зарождения жизни зафиксированные в последовательности выхода бактериальной клетки из анабиоза

Компаниченко В.Н.^{1*}

¹*Институт комплексного анализа региональных проблем ДВО РАН, Биробиджан;*
kompanv@yandex.ru

Согласно инверсионной концепции происхождения жизни (TI concept), промежуточное положение предбиологической системы между неживым и живым состояниями поддерживается в колебательном режиме [1]. Термодинамически такое положение соответствует примерному равенству вкладов энтропии и свободной энергии в системе. В рамках теории анабиоза в микробиологии покоящаяся (спящая) бактериальная клетка занимает аналогичное промежуточное положение между неживым и живым: с одной стороны, она уже не способна противодействовать росту энтропии, а с другой стороны, она сохраняет структурную память о предыдущем живом состоянии. Последовательность формирования метаболизма в первичных живых клетках до сих пор достоверно не установлена исследователями, тогда как последовательность изменения метаболических процессов в простейшей бактериальной клетке, входящей в состояние анабиоза и выходящей из него, хорошо изучена как экспериментально, так и теоретически. В данном докладе обосновывается общая последовательность формирования метаболизма в процессе возникновения жизни, исходя из корреляции этих двух промежуточных состояний между не-жизнью и жизнью (предбиологического и бактериального). Согласно инверсионной концепции, жизнь зародилась в пульсирующем восходящем потоке гидротермального флюида. В целом, этот процесс включал следующие этапы. 1) Накопление рассеянного органического вещества в геосферах через его синтез и поступление из космоса на добиологическом этапе эволюции Земли. 2) Самосборка трехмерных предбиологических микросистем преимущественно липидно-белкового состава в гидротермальном флюиде. 3) Образование протоклеток: переход микросистем в промежуточное состояние между не-жизнью и жизнью посредством активного реагирования на колебания физико-химических параметров в среде (т.е. на периодический стресс - [2]), включая появление в них слабого энергодающего процесса дыхания за счет окислительно-восстановительных реакций и локальное обводнение мембраны. 4) Образование живых субклеток в процессе формирования неферментативной антиоксидантной системы и зарождения белок синтезирующего аппарата. 5) Образование живых клеток (коррелируются с прогенотами по С. Woese [3]) с возникновением ростового цикла клеток и формированием генетического аппарата. В рамках данной реконструкции последовательность формирования метаболизма в этапах 3-5 коррелируется с последовательностью восстановления метаболизма при выходе бактериальной клетки из анабиоза [4].

Литература.

[1]. Kompanichenko V.N. Thermodynamic Inversion: Origin of Living Systems. Springer International Publishing, Cham (Switzerland), 2017, 275p

[2]. Kompanichenko V., Kotsyurbenko O. Role of Stress in the Origin of Life. Life, 12(11): #1930

[3]. Woese CR. (1987) Microbial evolution. Microbiol. Rev 51:221-270

[4]. Kompanichenko V., El-Registan G. Advancement of the TI concept: defining the origin-of-life stages based on the succession of a bacterial cell exit from anabiosis. AIMS Geosciences, 2022, 8(3): 398–437

Благодарность. Автор выражает глубокую благодарность своим соавторам в недавних публикациях Г.И. Эль-Регистан и О.Р. Коцюрбенко.

Полное оглавление

Краткое оглавление	3
Механизмы действия физико-химических факторов на биологические системы	4
Выживаемость клеток A549 при облучении протонным пучком во флэш- и стандартном режимах.....	4
Адаптация микроциркуляции к действию низкоинтенсивного мм-излучения у животных, находящихся в условиях стресса разной продолжительности.....	4
Аикар как потенциальное радиозащитное средство	6
Активность молекулярно-генетических показателей у мышей при воздействии фракционированного облучения в малой дозе с применением экранирования.....	7
Анализ вклада генетической регуляции в эффекты ионизирующего излучения на стрессовые сигналы растений.....	8
Анализ спектральных характеристик гемоглобина крови доноров после воздействия на его растворы антибиотиком "Амфотерицин В"	9
Антиоксидантное и нейропротекторное действие меконовой кислоты в модельных системах	9
Биологическая активность фуллеренолов различной структуры. Роль активных форм кислорода. Биолюминесцентный мониторинг.....	11
Биофизические характеристики уромодулина ин витро в верификации роли метаморфозы его изоформ ин виво	12
Биоцидные свойства наноразмерных потенциально мембранно-активных 1,10-фенантроцианинов (би-1,10-фенантролиленов) редокс-чувствительных Co(II) и Mn(II)..	13
Взаимодействие ДНК с координационными соединениями иридия и рутения	14
Взаимосвязь самоорганизации, флуоресцентных и физико-химических свойств разбавленных систем этанол-вода.....	14
Влияние высокочастотного электромагнитного излучения на распределение супероксиддисмутазы sod1 в мозге медоносной пчелы.....	15
Влияние газов на процессы замораживания-оттаивания и выживаемость клеточных культур при низкотемпературной консервации	16
Влияние гелиевой плазменной модификации на морфо-механические и адгезивные свойства магнитоэлектрических субстратов для инженерии костной ткани	17
Влияние гипоксии на организацию хромосомного аппарата и когнитивные функции у дрозофилы	17
Влияние дегидротермического кросслинкинга на физические, структурные и биологические свойства Корнеопласта	18
Влияние ионов кадмия на активность митохондрий, изолированных из проростков пшеницы (<i>Triticum Aestivum</i> L.).....	19
Влияние миллиметровых электромагнитных волн на перекисное окисление липидов и хемилюминесценцию мембран эритроцитов крови человека in vitro	20
Влияние модулированного магнитного поля на биополимеры	21

Влияние низкоинтенсивных импульсного и непрерывного лазерных излучений и иммуномодуляторов на мышей <i>in vivo</i>	22
Влияние низкочастотного магнитного поля на физическую выносливость лабораторных животных в условиях стрессовой нагрузки.....	23
Влияние постоянного освещения на стресс реактивность гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы у приматов, различающихся по адаптивному поведению, в разные возрастные периоды	24
Влияние реверберации на стратегию локационного поиска дельфинами (<i>Tursiops truncatus</i>) объектов на разных глубинах акватории.....	25
Влияние редкоземельных металлов на кальций-зависимые процессы в миокарде	26
Влияние слабых магнитных полей на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами.....	27
Влияние ультра-короткого воспроизведения невесомости на подвижность сперматозоидов мыши.....	28
Влияние физетина на интенсивность процессов ПОЛ и активность фосфолипазы С в процессе регенерации периферических нервов.....	29
Влияние хронического облучения в малых дозах на механизмы преобразования электрических сигналов в функциональные ответы у растений.....	30
Влияние хронического облучения на индуцированную электрическими сигналами устойчивость к неблагоприятным факторам среды у растений.....	31
Водный режим в клеточных стенках	32
Возможные механизмы влияния низких концентраций дейтерия на живые системы	33
Гематологические показатели мышей при пероральном введении биогенных и синтетических наночастиц ферригидрата.....	34
Гено- и цитотоксическое действие динитрозильного комплекса железа с меркаптосукцинатом на клетки MCF-7	35
Гидрогели на основе пектинов имитируют микроокружение ниши нервных стволовых клеток	36
Дивергенции зарождающихся хемоавтотрофных путей фиксации CO_2 в гидротермальных условиях.....	37
Защитное действие 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина и осмолитов на стабильность и агрегацию глутаматдегидрогеназы при повышении температуры и замораживании-оттаивании	38
Изменение содержания дейтерия в крови и мозге крыс при потреблении обеднённой по дейтерию воды	39
Изменение содержания регуляторов дифференцировки зародышевых стволовых клеток в яичниках <i>d. melanogaster</i> после 79-часовой экспозиции в условиях воспроизведения невесомости	40
Изменения состояний воды в листьях растений в условиях управляемой искусственной засухи	41
Изучение влияния различных режимов сочетания фотобиомодуляции и ионизирующего излучения на опухолевые клетки HeLa Kyoto.....	41

Изучение термостабильности комплекса бычьего сывороточного альбумина с галловой кислотой методами ИК-Фурье спектроскопии	43
Индукция адаптивного ответа у мышей непрямым действием паровоздушной смеси из высоковольтной разрядной камеры	44
Использование биофизических подходов для выявления структуры признаков устойчивости растений к стрессовым факторам	45
Исследование влияния ЭМП низкой частоты на рост и хемилюминесценцию <i>B. subtilis</i>	46
Исследование дефектов структуры ДНК спектральными и гидродинамическими методами	47
Исследование растительных тканей с помощью электроимпедансной спектроскопии.....	48
Исследование реакции организма лабораторных животных на пятикратное повышение концентрации дейтерия в питьевой воде.....	50
Исследование цитотоксичности нитрата серебра и серебряно-цистеиновых комплексов	51
Клеточное дыхание яичников мыши после 4-суточного антиортостатического вывешивания	52
Количественный анализ роста и гибели опухолевых клеток в коллагеновом гидрогеле в ответ на депривацию и терапевтическое воздействие с использованием флуоресцентной визуализации	53
Комбинированные эффекты лучевой и фотодинамической терапии в отношении клеток эпидермоидной карциномы человека A431	54
Коенат калия повышает устойчивость нейронов мозжечка крыс к эксайтотоксическому воздействию глутамата <i>in vitro</i>	55
Криопротективные эффекты дипептида карнозина при длительном криосохранении эксплантов мозга теплокровных негибернирующих животных	57
Лигнинный препарат как потенциальное противолучевое средство.....	58
Липидные детерминанты в регуляции порообразующей активности антимикробных липопептидов	58
Локальное действие комбинации нагрева и освещения вызывает распространение гиперполяризационных электрических сигналов и влияет на физиологические процессы у пшеницы	59
Медленные флуктуации магнитного поля и циркадные биологические ритмы	60
Механизм действия низкочастотного электромагнитного поля на водные растворы биополимеров.....	61
Механизмы УФ-индуцированной клеточной гибели лимфоцитов человека	62
Микроносители на полимерной основе, содержащие селен и золото, для комбинированной фототермической терапии, опосредованной АФК.....	64
Модификация биотехнологии аквакультуры рыб с помощью модификации окислительно-восстановительного потенциала воды. Биофизические аспекты.....	65
О возможной внешней обусловленности спектра околочасовых периодов	66
Определение длительностей криосохранения срезов мозга при использовании замораживающего раствора на основе агара	67

Особенности распределения пространственной частоты изменения электростатического потенциала вокруг геномной ДНК бактериофага T7 в области промоторов, специфичных для нативной фаговой и хозяйской РНК полимеразы E.coli	68
Оценка эффективности антибиотикотерапии при моделировании эшерихиоза у беспородных мышей в результате использования бензилпенициллина натриевой соли после обработки импульсным магнитным полем.....	69
Подходы к изучению фунгистатического действия растительного пептида нигеллина из <i>Nigella sativa</i> на клеточном и молекулярном уровнях.....	70
Поиск новых анти-воспалительных агентов среди тимусных гормонов	71
Получение модели радиорезистентного рака прямой кишки методом последовательного фракционированного облучения клеток линии СТ26-WT	72
Потенциал гидрогелей на основе модифицированных пектинов и настройки их свойств для терапии опухолей головного мозга	73
Преимущество фотодинамического воздействия в импульсном режиме облучения для подавления роста опухолевых сфероидов	74
Проводимость монослоя кардиомиоцитов при влиянии кардиотоксичных веществ	74
Процесс формирования кристаллов льда в криопротекторных средах для криоконсервации клеток	75
Радиомитигаторные свойства α -липоевой кислоты и совместное её применение с метформинном и этилметилгидроксипиридина сукцинатом при рентгеновском облучении мышей	77
Реакция клеток HeLa с аденовирусом на частотно - резонансные воздействия, выявляемая с помощью потенциал – чувствительного флуоресцентного зонда	78
Реологические особенности крови сусликов в негибернационный период.....	79
Рецепция гравитационного поля клеткой: экспериментальные данные и возможный механизм	80
Роль двунитевых разрывов ДНК в радиационно-индуцированном клеточном старении..	81
Свойства композитных материалов на основе матриц полимеров боросилоксана, поли(лактид-ко-гликолида), фторопласта, функционализированных наночастицами оксидов металлов (цинка, железа, алюминия).....	82
Сопряжение обесцвечивания красителей и экзоэлектрогенной активности <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 при электростимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы	83
Спектральные свойства сывороточного альбумина под действием электрического поля высокой напряженности 50 гц.....	84
Спиновая подсистема молекул воды отвечает за динамику изменения ее физико-химические свойств	85
Транскраниальная электротерапия как метод коррекции нарушений ритма сердца у пациентов с инфарктом миокарда.....	86
Транспорт ионов хлора через плазматическую мембрану ооцитов миноги (<i>Lampetra fluviatilis</i>).....	87
Усиление биологического действия ионизирующего излучения с помощью наночастиц золота	88

Ферроптоз зависит от перекисного окисления липидов в митохондриях	89
Физико-химические факторы влияния низкотемпературной плазмы атмосферного давления на одноклеточный организм <i>Paramecium caudatum</i>	89
Функционализированные полидофамином композитные фототермические скаффолды для комплексной модуляции клеточной активности	90
Характер влияния экзогенных фитогормонов на стартовый рост проростков зависит от напряжённости стрессовых факторов.....	91
ЭПР исследование биомагнетизма в делящихся клетках гречихи татарской <i>Fagopyrum tataricum</i>	92
Электрохимическое исследование поведения толуидинового синего в альгинатном гидрогеле с иммобилизованными клетками перитонеального смыва.....	93
Эффективность фотобиомодуляции при онкогенезе в зависимости от уровня окислительной модификации макромолекул и особенностей функционирования центральной нервной системы	94
Экологическая биофизика.....	97
Активизация биоэлектрогенеза в микробных топливных элементах почвенного типа при внесении модельных органических загрязнителей	97
Биологические ритмы – алгоритм устойчивости биологических систем	98
Биологическое окисление промышленных сточных вод высокоэнергетических соединений на примере нитрированной целлюлозы.....	98
Биолюминесцентный метод оценки загрязнения воздушной среды	99
Биолюминесцентный потенциал мезомасштабных вихрей мирового океана	100
Биомониторинг состояния поверхностных вод русла реки Кальмиус с применением метода флуориметрии.....	101
Биофизические показатели производных кожи оленей разных мест обитания	102
Биофизическое исследование кожных производных северных оленей различных зон Якутии.....	103
Влияние гипомагнитных условий, растворенного кислорода и солености воды на продукционные и морфометрические показатели <i>Daphnia magna</i> Straus	103
Влияние лигандов на адсорбцию ионов меди клеточными стенками растений вики посевной (<i>Vicia sativa</i> L.).....	104
Воздействие экстремальных физических факторов стратосферного полёта на модельные биологические объекты в составе микроспутников типа «кубсат».....	106
Динамика внутриклеточных оксидант-антиоксидантных отношений в постэбриональном развитии	107
Изменение биоэлектрогенеза микробных топливных элементов с течением времени под влиянием некоторых тяжёлых металлов	107
Изменение состояния фотосинтетического аппарата зеленой водоросли <i>Scenedesmus obliquis</i> при отдельном и совместном воздействии хлорида меди(II) и растворенного органического вещества	109
Измерение активности радионуклидов в пробах почв города Краснодара	110

Изучение сорбционных возможностей стронций-альгинатных гидрогелей, в том числе армированных углеродными нанотрубками, по данным элементного анализа и электронной микроскопии	110
Исследование влияния углеродных наночастиц на зеленые микроводоросли <i>Scenedesmus quadricauda</i>	112
Исследование действия гербицида раундап (глифосат) на пероксидазу хрена.....	112
Комплекс флуориметрических приборов для диагностики функционального состояния фотосинтезирующих организмов в природной среде	113
Космофизические факторы и биоритмы растений	114
Модель функционирования популяции фитопланктона в краевых арктических морях в летний период	115
Мониторинговые исследования флуоресцентных параметров и биохимических компонентов <i>Hedysarum daghestanicum</i> L	116
О циркуляции высших животных под действием физических условий внешней среды.	117
Определение сезонных вариаций газо-воздушного обмена в семьях пчел в зависимости от их физиологического состояния с использованием стабильных изотопов углерода ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$).....	118
Особенности адаптационных изменений в крови якутских сусликов осенью	120
Оценка сорбционных способностей полисахаридных гидрогелей, сшитых двухвалентными катионами, на основе данных элементного анализа.....	121
Повреждающее действие углеродных наночастиц на клеточные мембраны перитонеальных макрофагов мышей	122
Применение цифровых моделей водных экосистем для устойчивой эксплуатации водных объектов	123
Проксимальное зондирование растений: спектральный анализ и машинное обучение... ..	125
Разнообразие числа повторов белка конденсации льда (INP) в популяции <i>Xanthomonas</i> в отношении активности образования льда	126
Фазовая синхронизация колебаний функции роста фитопланктона с температурой в озерной экосистеме.....	127
Эко-генетическая стресс-устойчивость растений, как стратегия и тактика: супер-молекулярно-протеомного дизайна физико-химической природы биологии развития... ..	127
Экологическая биофизика: пищевые цепи, агентно-ориентированное программирование и построение пирамид Элтона.....	128
Экологическая ниша как гамильтониан, определяющий собственные значения волновой функции живого	129
Медицинская биофизика. Нейробиофизика.....	131
2-Этил-6-метил-3-гидроксипиридин N-ацетилцистеинат предупреждает обусловленную стрессом дисфункцию митохондрий	131
Аберрантные осцилляции и моторная дисфункция в модели болезни Паркинсона на крысах: новые терапевтические стратегии и цели	132
Адаптогенные свойства антиоксидантов.....	133
Адгезия – мишень противоопухолевой терапии.....	134

Активность глутаматных рецепторов в нейронах гиппокампа крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией	135
Анализ активности нейронной сети гиппокампа <i>in vivo</i> у свободно движущейся мыши	136
Анализ гомоцистеин-тиолактон индуцированной эпилепсии в гиппокампе крыс разного возраста	137
Анализ фагоцитарной активности дендритных клеток, сокультивируемых с умирающими и мертвыми клетками глиомы GL261, подвергшихся фотодинамическому воздействию на основе тетрацианотетра(арил)порфиразина (pz IV)	138
Аспекты оценки метрологических характеристик биофизических методов в клинической практике	139
Биомиметические носители биологически активных веществ, чувствительные к внешним физическим воздействиям.....	140
Биофизические закономерности изменений содержания монооксида азота и меди в мозге крыс при моделировании ишемии головного мозга.....	141
Биофизические исследования функционирования нервной клетки	142
Биофизические основы эпилептической активности: гипотеза контаминации мембран.	143
Биохимическая <i>in vitro</i> диагностика и направленная доставка лекарственных препаратов <i>in vivo</i> на основе магнитных наночастиц	144
Блокада электростатических взаимодействий между вирусом и клеткой- новое направление защиты от высокозаразных штаммов SARS-CoV-2 и вируса гриппа	145
Броуновская-но-негауссова диффузия в паренхиме мозга: экспериментальное проявление и математическое моделирование	146
Валидация математических моделей, используемых для оценки тромбогенности сосудистого русла	147
Взаимосвязь между конформацией гема цитохрома C, потенциалом внутренней мембраны митохондрий и активностью дыхательной цепи в норме и при патологии	148
Вклад NOS в увеличение продукции NO в сердце при ограничении двигательной активности	149
Влияние доноров NO, субстратов и ингибиторов его синтеза на ноцицептивную активность тройничного нерва	149
Влияние доноров оксида азота и сероводорода на степень дегрануляции тучных клеток в твердой оболочке мозга крысы.....	150
Влияние инфракрасного излучения на состояние энергетического метаболизма при нейроболовом синдроме в эксперименте	151
Влияние ксилазин-золетиловой анестезии на радиочувствительность мышей при воздействии излучений с разными значениями линейной потери энергии	152
Влияние лактоферрина и витамина D3 на маркеры галогенирующего стресса и нетоза в крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом 2 типа при индуцированной активации нейтрофилов <i>ex vivo</i>	154
Влияние локального нагрева на колебательные процессы в сердечно-сосудистой системе при сахарном диабете 2 типа	155

Влияние модифицированного метилглиоксалем сывороточного альбумина человека на ферментативную активность миелопероксидазы и функции нейтрофилов	156
Влияние полиморфизма гена 8-оксигуанин-ДНК-гликозилазы hOGG1 на чувствительность периферической крови доноров к действию электромагнитного поля	157
Влияние последовательности действия нейтронного и протонного излучений на опухолевый ответ и реакции кожи при облучении солидной карциномы Эрлиха у мышей	158
Влияние ресвератрола на экспрессию функциональных белков аксонов и шванновских клеток при повреждении и регенерации периферического нерва	160
Влияние сублингвального применения аминокислоты глицин на реактивность сосудов головного мозга.....	161
Воздействие протонного излучения высокой энергии на зрительномоторное поведение обезьян	161
Возможности флуоресцентной время-разрешенной микроскопии в дифференцировании глиом от нормальных тканей мозга – пилотное исследование	163
Возрастные изменения кальциевой активности астроцитов <i>in vitro</i>	164
Возрастные изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера крыс, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию	164
Временные паттерны спонтанной активности нейронов слуховой коры мыши в условиях поверхностной анестезии и бодрствования.....	165
Гепатопротекторное действие пероксиредоксин 6 при ренальной ишемии.....	166
Гипотермическая консервация сердца крысы в растворе Кустодиол под давлением газовой смеси монооксида углерода и кислорода	167
Деацетилирование фактора транскрипции E2F1 с участием гистондеацетилазы 1 при аксотомии периферических нервов.....	168
Действие Уридина на физиологическую активность в лимфоцитах крови в Ротеноновой модели болезни Паркинсона у крыс.	169
Диагностика состояния перитуморального белого вещества с помощью оптической когерентной томографии.....	170
Динамика импульсной активности определяет эффективность межмодульной связи в модульных сетях <i>in vitro</i>	171
Еще раз о старении, стабильности и копийности митохондриальной ДНК, уровне активных форм кислорода	172
Защитное влияние закисления внутриклеточной среды в токсических клеточных моделях болезни Паркинсона	173
Изменение конформации белка p53, ацетилированного по лизину 320, но не по лизину 373, способствует его переходу в цитоплазму и защищает нейроны перифокальной области фототромботического инсульта	174
Изменение фазовых и корреляционных взаимосвязей между колебаниями параметров сердечно-сосудистой системы при нагреве у больных сахарным диабетом 2 типа	175

Изменения редокс-состояния митохондрий и белок-липидного состава клеток опухолевой и перитуморальной областей при глиомах высокой и низкой степени злокачественности	176
Изменения секреторной машинерии катехоламин-продуцирующих клеток организма, развивавшегося при воздействии эндокринных дисрапторов.....	177
Изменения структурных характеристик клеток крови у пациентов с COVID-19 и сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями	178
Изменения экспрессии белка предшественника бета-амилоида, ADAM10, BACE1 и компонентов γ -секретазного комплекса пресенилина 1 и никастрина в спинномозговых ганглиях крыс после перерезки седалищного нерва	179
Изучение механизмов гибели нигростриатных дофаминергических нейронов при паркинсонизме	180
Изучение эффективности комбинированной терапии с использованием микрометровых носителей для лечения рака легких	182
Интенсивность продукции NO и сократимость миокарда крыс при гипокинезии	182
Использование псевдотриглицеридного подхода в синтезе новых липофильных производных 3'-азидо-3'-дезокситимидина и 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина	183
Исследование биодоступности новых наноэмульсий модифицированных куркумином и наночастицами диоксида церия.....	184
Исследование влияния клобетазола на проведение возбуждения, изменение содержания белков и фактора роста нервов в поврежденных нервных проводниках	185
Исследование влияния плазменной обработки на морфологию биомедицинских полилактидных матриц и адгезию нейрональных клеток.....	186
Исследование влияния покрытия ЦТАБ на физико-химические свойства наночастиц магнетита	188
Исследование действия веществ фенольной природы при влиянии окислительного стресса на нервное волокно	189
Исследование действия высокоэнергетического протонного облучения в режиме большой мощности на мышцах <i>in vivo</i>	190
Исследование дозовой кривой выживаемости клеток меланомы мыши линии B16/F1 после их облучения пучками протонов в пике Брэгга	191
Исследование и количественная оценка транспорта маркеров в гидрогелевом фантоме, имитирующем паренхиму мозга	191
Исследование массовой концентрации ионов в моче на различных этапах формирования мочекаменной болезни в эксперименте <i>in vivo</i> на мышцах.....	192
Исследование морфометрических показателей тромбоцитов с помощью электронной микроскопии.....	193
Исследование особенностей реструктуризации функциональной архитектоники нейронных сетей головного мозга в условиях гипоксического повреждения и блокады астроцитарных коннексинов 43 (Cx43)	194
Исследование особенностей функциональной активности нейрон-астроцитарных сетей головного мозга в условиях гипоксического повреждения и блокады коннексина 43	195

Исследование периферического звена возникновения боли при мигрени в условиях хронического повышения уровня гомоцистеина у крыс	196
Исследование роли хронической пренатальной гипоксии в функционировании нейрон-глиальных сетей головного мозга и их адаптации при воздействии острого стресса <i>in vitro</i>	197
Исследование синаптического притока в интернейронах париетальных ганглиев оборонительного поведения виноградной улитки	198
Исследование содержания NO в скелетных мышцах крыс при дефиците движений методом ЭПР-спектроскопии	199
Исследование спектрально-корреляционных характеристик ЭЭГ у перенесших COVID-19.....	200
Исследование спектральных свойств эритроцитов доноров, модифицированных воздействием лекарственного препарата «Мексиприм».....	201
Исследование упругих свойств ткани эндометрия при гиперпластических и неопластических процессах с помощью оптической когерентной эластографии	202
Исследование физико-химических свойств грудного молока у пациентки на гемодиализной терапии.....	203
Исследование формирования спиральной волны на сердечной ткани при различных анизотропных свойствах подложки	203
Исследование фракционного состава коллоида мочи экспериментальных животных на различных этапах моделирования нефролитиаза <i>in vivo</i>	205
Исследование цитотоксического и радиосенсибилизирующего влияния наноформуляций оксида висмута, покрытых плюронином, на клеточные культуры фибробластов мыши линии 1929 <i>in vitro</i>	206
Калиевый канал типа 1 и эпилепсия	207
Клеточные нарушения в фибробластах с мутациями, ассоциированными с развитием болезни Паркинсона	207
Кодирование биологически значимых временных интервалов звуковых последовательностей нейронами высших слуховых центров наркотизированных и бодрствующих мышей.....	208
Колориметрический метод определения роста микобактерий и МИК с использованием нового портативного микробиологического анализатора	210
Комплекс низкомолекулярных пептидов коллагена и гликозаминогликанов для профилактики и лечения болезней опорно-двигательного аппарата	210
Лактат в слюне - индикатор физической работоспособности спортсмена	211
Магнитные и золотые наночастицы в живых системах.....	213
Магнитотактические бактерии: магнитные параметры магнитосом внутри <i>Magnetospirillum spp</i>	214
Мембранная активность трех-петельных цитотоксинов кобр зависит от критических аминокислотных остатков в N-концевой и центральной петлях	215
Мембранные корреляты обучения у моллюсков: роль серотонина, глутамата и оксида азота в формировании условных оборонительных рефлексов у виноградной улитки.....	216

Мембранные характеристики премоторных интернейронов оборонительного поведения виноградной улитки после формирования тревожно-подобного состояния	217
Метаболический имиджинг ткани печени в процессе регенерации при сопутствующей патологии	218
Методы машинного обучения для прогнозирования исхода заболевания COVID-19 у детей	219
Механизмы регуляции сократительной активности гладких мышц воздухоносных путей при метаболических нарушениях	220
Механизмы усиления кортикальной депрессии в соматосенсорной коре крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией	220
Митохондриальная мегапора (mPTP) и процесс клеточной гибели	222
Модель организации физиологических функций организма человека на основе спектрального анализа акустоэнцефалограммы	223
Модулирующее действие полифенолов на факторы роста поврежденного соматического нерва	224
Модуляция ноопептом возбудимости нейрональной мембраны виноградной улитки	224
Морфологическое обоснование снижения значений модуля упругости опухолевой ткани на фоне терапии	225
Мультимодальная оптическая когерентная томография для клинической оценки восстановления кожи вульвы после ФДТ терапии склеротического лихена	226
Наличие полового диморфизма в морфо-функциональной организации астроцитов в репликативной модели старения	228
Нейропротекторный потенциал закисления внутриклеточной среды в токсической модели болезни Паркинсона	229
Новая технология оценки метаболического ответа глиом на химиотерапию с использованием время-разрешенной флуоресцентной микроскопии	230
Новые коллоидные системы на основе биомиметических поликомплексов	231
Новый подход для оценки эффективной внутриклеточной концентрации биоактивных молекул на примере модульных нанотранспортеров, способных взаимодействовать с Nrf2-системой клеток	231
О молекулярных механизмах действия оксида азота и аскорбиновой кислоты в перитонеальных макрофагах	233
О радиозащитных свойствах препаратов на основе хлорофилла	234
Обнаружение радиационно-индуцированных изменений оптических свойств белого вещества головного мозга методом оптической когерентной томографии	235
Образование пор в мембранах липосом, в присутствии комплексов цитохрома С с фосфатидной кислотой	236
Объединение методов прижизненной кальциевой визуализации и электрофизиологической регистрации активности нейронов гиппокампа мышей	237
Объяснение молекулярных механизмов гипертермии через цитохром С-зависимые процессы	238

Определение относительной биологической эффективности тонкого сканирующего пучка протонов с энергией 90–150 МэВ при облучении мышей до пика и в пике Брэгга.....	239
Особенности глиотрансмиттерного взаимодействия нейронов и астроцитов при распространении кальциевых сигналов.....	240
Особенности распространяющейся кортикальной депрессии и чувствительность к нитроглицерин-вызванной модели мигрени крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией	241
Отличия морфодинамических процессов в селезенке у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ	242
Оценка влияния температурных рецепторов на активность менингеальных афферентов тригеминального нерва крысы	243
Оценка локомоторной активности вызванной чрескожной электрической стимуляцией спинного мозга у пациентов со спинальной травмой	245
Оценка модуля упругости лимфатических узлов с помощью компрессионной оптической когерентной эластографии.....	246
Оценка связанности в кортико-гиппокампальной сети мозга у крыс-моделей эпилепсии	247
Оценка созревания профессиональных антигенпрезентирующих клеток после сокультивации с фотоиндуцированными тетра(арил)тетрацианпорфиразином клетками мышинной глиомы.....	248
Пациент-специфические 3D модели глиомы с иммунным микроокружением для исследования эффективности иммунотерапии методом FLIM.....	249
Повышенная агрегация эритроцитов и тромбоцитов и ее коррекция в образцах крови больных артериальной гипертензией.....	250
Показатели оксидативного стресса у здоровых беременных женщин и беременных женщин с урогенитальной инфекцией на ранних сроках гестации.....	251
Применение метода корреляционных отношений для сравнения ЭЭГ здоровых испытуемых и пациентов нервно-психического профиля.....	252
Применение транскраниальной электротерапии импульсным током в комбинированном лечении деформирующего остеоартроза.....	253
Программно-аппаратный комплекс для прототипирования зрительных нейропротезов	254
Продукция активных форм кислорода лейкоцитами, стимулированными зимозаном и липополисахаридом у женщин с невынашиванием беременности на ранних сроках гестации	255
Пространственно-временная карта экспрессии серотониновых рецепторов 5-HT4R в мозге мыши на разных стадиях онтогенеза.....	256
Пространственно-временные паттерны кальциевой активности астроцитов: эксперимент и моделирование	257
Противовоспалительное действие полисахарида из <i>Helianthus tuberosus</i> L	257
Разработка комбинационной терапии на основе радионуклидной, фототермической и химиотерапий с использованием золотых наностержней для лечения меланомы	259

Разработка комплексной информационной системы для изучения генетических регуляторов и физиологических механизмов индивидуальной устойчивости к формированию приобретенных нейродегенеративных расстройств.....	260
Разработка нового класса тераностиков для целей адронной терапии	260
Разработка системы доставки радионуклида ²²³ -радия на основе наночастиц аморфного карбоната кальция.....	261
Разработка специализированной платформы для биопечати тканеинженерных эквивалентов структур глаза и компонентов систем орган-на-чипе для применения в экспериментальной офтальмологии.....	262
Рецепторная специфичность и трансмиссивность как элементы количественной оценки пандемического потенциала зоонозных вирусов гриппа.....	263
Роль НАДФН-оксидазы 2 в развитии окислительного стресса и микроглиоза в гиппокампе мышей при индуцированной амилоидной токсичности.....	264
Роль арахидоновой кислоты и её производных в функционировании нейроглиоваскулярной единицы	264
Роль белка теплового шока A1 при биполярном аффективном расстройстве	265
Роль гемолитической резистентности эритроцитов в выявлении нестабильных атером.....	266
Роль гравитационных и мышечных сил в сохранении костной ткани	267
Роль дисфункции митохондриальных систем транспорта ионов кальция и калия в прогрессировании мышечной дистрофии Дюшенна. Пути коррекции.....	268
Роль кальций-проницаемых AMPA и каинатных рецепторов в пластичности	269
Роль микроРНК в механизмах пластичности ЦНС и перспективы их использования для протекции когнитивных нарушений.....	270
Роль микробиоты при нейродегенерации.....	271
Роль микровязкости цитоплазматической мембраны опухолевых клеток при химиотерапевтическом воздействии.....	273
Роль монооксида углерода в регуляции ноцицептивной активности периферического отдела тройничного нерва.....	274
Роль нитроергической системы в механизмах повреждения мозга, вызванного длительным воздействием пестицида ротенона	275
Свободные радикалы и трансдукция сигналов в клетках.....	276
Синтез и применение наночастиц карбоната кальция для комбинированной терапии онкологических заболеваний.....	277
Сопоставление свойств нейронов стволовых и корковых отделов слухового пути	278
Способно ли увеличение содержания дейтерия в организме влиять на функционирование щитовидной железы?	279
Структура коммуникационных сигналов домовой мыши (<i>Mus musculus</i>): анализ параметров и выявление фундаментальных характеристик.....	280
Технология SERPA в диагностике аденокарциномы предстательной железы.....	282
Тканевая инженерия как средство для исследования фундаментальных процессов в кардиологии и биофизических особенностей формирования сердечной ткани.....	283

Транскраниальная нейроморфная стимуляция (tNMS) мозга как наиболее универсальный способ активации нейропластичности головного мозга и приборы для её проведения ..	284
Транскраниальная электротерапия импульсным током нормализует концентрацию фруктозамина у крыс на фоне диеты обогащенной фруктозой и жиром.....	285
Транскриптомный анализ путей репарации ДНК в радиорезистентных сублиниях немелкоклеточного рака лёгкого человека	286
Уровень тревожности и проницаемость гематоэнцефалического барьера у мышей при моделировании синдрома раздраженного кишечника	287
Участие мускариновых рецепторов M1 подтипа в регуляции нейросекреции в моторных синапсах мышцы при изменении уровня внутриклеточных АФК	288
Участие мускариновых холинорецепторов M5 подтипа в регуляции секреции медиатора в моторных синапсах мышцы в норме и в условиях окислительного стресса.....	289
Факторы, обуславливающие эффективность физиологического воздействия оксида азота	290
Физиологическое значение гена <i>white</i> , кодирующего субъединицу ABC-транспортера у <i>Drosophila melanogaster</i> : контроль продолжительности жизни, влияние на ЦНС и другие эффекты мутации в изогенном генетическом окружении	292
Фотобиомодуляция в терапии миофасциального синдрома	293
Фотобиомодуляция микробиоты кишечника человека <i>in vitro</i> с помощью красного и ближнего инфракрасного светодиодного излучения	294
Фотодинамически-индуцируемая иммуногенная клеточная смерть как основа эффективной дендритноклеточной вакцинации против глиомы мышей.....	295
Фотоинаktivация <i>Mycobacterium smegmatis</i> с использованием фотосенсибилизаторов на основе трикарбоцианина	296
Фунги- и цитостатические свойства наноразмерных потенциально мембранно-активных 1,10-фенантроцианинов (би-1,10-фенантролиленов) редокс-инертных Zn(II) и Cd(II)....	297
Функциональное состояние двигательных систем при моделируемой гипогравитации и в реадaptационный период. Эффекты стимуляции спинного мозга	298
Характеристики и интерпретация сигналов ЭМР в ткани СМ через 7 дней после его травматического повреждения	299
Хемилюминесцентный анализ антиоксидантной способности водных экстрактов йерба мате (<i>Pelex paraguariensis</i>).....	301
Хлораминовые производные аналогов аденозина – ковалентные ингибиторы функций тромбоцитов	302
Экзомеры – внеклеточные частицы носители холестерина, не связанного с липопротеинами.....	303
Экспрессия и внутриклеточная локализация HDAC3 и Akt/GSK-3 β в нейронах ганглиев дорсальных корешков после перерезки седалищного нерва.....	304
Эффективность пассивного нацеливания наноразмерных носителей для лечения рака молочной железы	305
Эффективность фотодинамической терапии уropатогенных микроорганизмов.....	306

Эффекты блокатора синтеза NO NO-синтазы L-name на формирование долговременной памяти на обстановку у улитки	307
Эффекты муцина при активации нейтрофилов микрочастицами монтмориллонита in vitro	308
Биофизическое образование	310
Использование информационных технологий в физическом практикуме медицинского вуза	310
Кафедра биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета: научно-образовательные процессы, их организаторы и партнеры.....	311
Компьютерная реконструкция сетей белок-белковых взаимодействий: образовательные и исследовательские аспекты.....	312
Курс “История биологии и биофизики” как инструмент самоопределения студента-биофизика в научной деятельности	313
Методическое обеспечение дистанционных занятий по медицинской и биологической физике	314
Модель интегрированной академической магистратуры-аспирантуры.....	315
Подходы к преподаванию математических дисциплин для биофизиков в Сибирском федеральном университете	317
Проблемы преподавания медицинской техники как составной части дисциплины «Медицинская и биологическая физика» и пути их решения.....	318
Решение задач по физике и биофизике на разных видах занятий в медицинском университете.....	319
Формирование междисциплинарных компетенций в новой программе магистратуры «Медицинская и биологическая физика».....	320
Новые методы в биофизике	322
Дистанционное бесконтактное фунгицидное воздействие электромагнитных волн на развитие грибов <i>Vipolaris sorokiniana</i>	322
Изучение упругих свойств слоев кишечной стенки с помощью компрессионной оптической когерентной эластографии	322
Иммобилизованные ферменты в молекулярной биофизике: расчетные и инструментальные методы оценки их состояния.....	324
Использование неоднородных рациональных В-сплайнов в разрешении перекрывающихся полос поглощения белков	325
Исследование автофлуоресценции НАД(Ф)Н иммунных клеток в лимфоузлах методом FLIM как маркера эффективности иммунотерапии	326
Исследование влияния паракринного эффекта на дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в кардиомиоциты и их доставка в ткань сердца на микроподложках.....	327
Исследование конформационных изменений пептида A β (1-42) методом рамановской спектроскопии	328
Исследование микроволнового излучения лактозы, насыщенной высокими разведениями веществ.....	328

Исследование особенностей клеточных реакций методом аномальной временной зависимости вязкости	329
Мобильность апконверсионных наносенсоров NaF4Yb,Er в организме виноградной улитки.....	331
Неинвазивную идентификация микотоксинов грибов рода Фузариум на семенах озимой пшеницы с помощью микроскопии комбинационного рассеяния и спектроскопии.....	331
Обнаружение и идентификация внутриклеточного микропластика посредством усиленной темнопольной микроскопии, дополненной гиперспектральной визуализацией	332
Оценка транспорта воды по плазмодесмам в корнях растений с использованием градиентного ЯМР с парамагнитным допингом.....	333
Подавление шумов в электронных спектрах поглощения белков с помощью неоднородных рациональных В-сплайнов	334
Проявление действия электрического поля переменного напряжения на семена ячменя	335
Режим лазерного облучения клеточного скаффолда из ПГА определяет клеточный ответ	336
Роль фибриногена во взаимодействии эритроцитов и эндотелия на уровне отдельных клеток: <i>in vitro</i> измерения с помощью лазерного пинцета на крови здоровых доноров ..	337
Слияние соматических клеток с использованием флуоресцентного красителя BioTracker 400 Blue Cytoplasmic Membrane методом фемтосекундной лазерной микрохирургии.....	338
Техника градиентного ЯМР для контроля транспорта воды в растениях в поле одномерного давления.....	338
Ультралокальный термодинамический контроль и управление биологическими процессами с помощью наноалмазного термометра-нагревателя	339
Эффективность проникновения в клетки борсодержащих аптамеров, новых потенциальных агентов доставки бора для бор-нейтронозахватной терапии	340
Дискуссионный клуб	342
Адаптационный механизм действия гипоксии согласно митохондриально-аргининовой теории старения.....	342
Влияние механического и магнитного воздействия на электромагнитное излучение водных растворов иммуноглобулина G.....	343
Изменение в крови собак при поении кавитированной водой	344
Изучение модифицирующего действия сверхвысоких разведений гемоглобина и люминола на модели люминол-зависимой хемилюминесценции с гемоглобином	345
Квантовая биоэнергетика живых клеток и организмов	346
Митохондриально-аргининовая теория старения согласно механо-хемиосмотическому механизму	346
Нелинейная динамика клеток при онкологических трансформациях и в условиях микрогравитации.....	348

Полное оглавление

Обнаружение специфики воздействия на репродуктивную сферу растений высочайших доз цезия или плутония-америция-стронция (СЭМ-палинотератные данные поверхностных почвенных проб 1988 г. из 30-км зоны Чернобыля)	349
Применение чувствительного к метилированию метода плавления ДНК с высоким разрешением для диагностики заболеваний	350
Пролонгированное воздействие мм-волн на геном растений	350
Роль гамма субъединицы в молекулярном механизме синтеза АТФ комплексом АТФ-синтаза.....	351
Роль стрессовых факторов в образовании магнитных свойств в живых системах.....	352
Упорядочение белок-индуцированных молекулярных комплексов в водных растворах таблетированных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ	353
Этапы зарождения жизни зафиксированные в последовательности выхода бактериальной клетки из анабиоза	354
Полное оглавление.....	356
Авторский указатель.....	373

Авторский указатель

- Tran T.Nhai., 263
 Абашева К.Р., 59
 Абдуллаев С.А., 7
 Абдуллаев С.А., 6
 Абрамов А.Ю., 222
 Авдеева Л.В., 98, 112
 Аветисян А., 89
 Аветисян Е.А., 202
 Агапов А.В., 4, 190
 Агеев Э., 259
 Агеева М.Н., 30
 Агладзе К.И., 74, 203
 Агьямова А.Р., 333
 Адамович Б.В., 127
 Адельянов А.М., 231
 Азиева А.М., 186
 Аитова А.А., 283, 327
 Акулов А.Н., 92
 Алексеев А.А., 292
 Алексеева А.О., 238
 Алиева Р.Т., 231
 Алхаддад Л., 286
 Ананьев А.С., 149, 243,
 274
 Анашкина А.А., 312
 Андрианов А.В., 307
 Андрианов В.В., 141, 149,
 198, 199, 245, 331
 Андропова П.Л., 191
 Аникина В.А., 184
 Анисимов А.В., 333, 338
 Анисимов С.И., 18
 Анисимова Н.С., 18
 Антипов С.С., 311
 Антипова В.Н., 17
 Антипова К.Г., 186
 Антонова О.Ю., 90
 Антонян А.П., 19
 Антонян А.Э., 306
 Антуганов Д.О., 261
 Арзуманян Г.М., 328
 Арсенин А.В., 148
 Арсланов А.А., 198
 Арсланов А.И., 217, 331
 Артюхов В.Г., 9, 62, 188,
 311, 324
 Архипова Е.В., 178
 Арынбек Е., 328
 Аскарова К.З., 78
 Асташев М.Е., 48
 Ахатова Ф.С., 332
 Ахи А.В., 25
 Ахметова Д.Р., 261, 277
 Ахтямова Г.А., 333
 Ачкасова К.А., 170, 235
 Бабенкова И.В., 301
 Баврина А.П., 293
 Багдасарян М.Н., 91
 Баграмов Р.Х., 339
 Бадалов А.А., 238
 Бадалян А.Г., 13, 297
 Базан Л.В., 141
 Байжуманов А.А., 112, 148
 Баймлер И.В., 82
 Байрамова С.Д., 107
 Балабушевич Н.Г., 308
 Балакин В.Е., 152, 158,
 239
 Балалаева И.В., 53, 54, 295
 Балтин М.Э., 298
 Балтина Т.В., 267, 298
 Барашкин М.И., 344
 Барашкова А.С., 70
 Барбин Н.М., 344
 Барышев М.Г., 61
 Барышева В.Э., 325, 334
 Басов А.А., 33
 Басырева Л.Ю., 156
 Батальщикова С.А., 179
 Батин М.А., 292
 Бачурин С.С., 174
 Башкатова В.Г., 275
 Башлыкова Л.А., 58
 Бедерина Е.Л., 170, 246,
 322
 Безпрозванный И.Б., 136,
 237
 Бекбулатов Д.А., 292
 Белая О.Л., 233
 Белов Д.А., 350
 Белоногова О.В., 37
 Белослудцев К.Н., 268
 Белотелов А.О., 41
 Белоусов А.С., 36, 73
 Белоусова И.И., 293
 Белько Н.В., 296
 Беляева И.А., 69
 Беляева К.Л., 151
 Беляева Н.Е., 123
 Белякова Т.А., 152, 158,
 239
 Бережнов А.В., 173, 207,
 222, 229
 Бережной А.К., 203, 283
 Беспалова С.В., 101
 Бибииков Н.Г., 278
 Бикеев А.И., 292
 Бирулина Ю.Г., 220
 Бирюков Н.С., 52
 Бирюкова Е.А., 34
 Благова А.В., 236
 Бобров Н.В., 218
 Богатенков Г.Е., 137
 Богданов А.А., 51, 74, 205
 Богданов Ан.А., 51, 74
 Богодвид Т.Х., 141, 307
 Боголюбова А.Н., 349
 Богомолова А.Ю., 225,
 235, 322
 Богомолова Е.В., 13, 297
 Боднарь И.С., 58
 Бойко А.А., 325
 Бойко А.А., 334
 Бокарева М.А., 46
 Борзова В.А., 38
 Борискин В.С., 328
 Бородачева Ю.В., 161
 Бочаров Е.В., 134, 180
 Бочаров Э.В., 70
 Бочарова О.А., 134, 180
 Бочкова Ж.В., 148
 Брагина В.А., 144
 Браже А.Р., 176, 240, 257
 Браже Н.А., 148, 176
 Бражник Е.С., 132
 Брацун Д.А., 117
 Брусков В.И., 77
 Буглинина А.Д., 149, 274

- Будкевич Р.О., 43
 Будруев И.А., 306
 Буздин А.А., 286
 Буйко Е.Е., 220
 Букатин А.С., 171
 Бунин Е.С., 231
 Бурдаков В.С., 72, 192, 205, 303
 Буреев П.А., 306
 Бурмистров Д.Е., 82
 Былино О.В., 292
 Валиева А.И., 92
 Ванин А.Ф., 35
 Ванина А.С., 191
 Вардеванян П.О., 20
 Варфоломеева Е.Ю., 303
 Васильев А.Л., 186
 Васильева Т.И., 69
 Васильцова Н.Н., 263
 Васильчиков П.И., 228
 Васягина Т.И., 293
 Вахтерова Я.В., 112
 Вашанов Г.А., 325, 334
 Ведунова М.В., 138, 164, 194, 195, 197, 203, 248, 256, 295
 Великанова А.В., 292
 Вервейко Д.В., 240, 257, 264
 Верисокин А.Ю., 240, 257, 264
 Верлов Н.А., 72, 303
 Верлов Н.В., 205
 Верхотурова Т.М., 274
 Виноградов И.И., 18
 Виноградова Л.В., 247
 Винокуров Е.К., 237
 Владимирова Ю.А., 238
 Власов И.И., 339
 Власова О.Л., 136, 237, 252
 Внукова Н.Г., 11
 Воденеев В.А., 8, 30, 31, 54
 Войнаровский В.В., 276
 Войтик К.Д., 183
 Волков В.В., 238
 Волков В.С., 148
 Волченко Н.Н., 83, 97, 106, 107
 Вольхина М.О., 220
 Воробьев Н.И., 322
 Воробьева Е.С., 7
 Воробьева М.А., 340
 Воробьева Н.Ю., 81
 Воронин Е.М., 219
 Воронина Н.А., 180
 Воронова Е.Н., 109
 Воронцов А.Ю., 225, 246
 Воронцов Д.А., 225, 246
 Вышедко А.М., 211
 Гаврилов П.В., 191
 Гагаринский Е.Л., 167
 Гагулаева Б.Б., 242
 Гайнутдинов Х.Л., 141, 149, 182, 198, 199, 216, 299, 307, 331
 Галкина Н.В., 154
 Галль И.Р., 41
 Галль Л.Н., 346
 Галова Е.А., 178
 Гамаюнов С.В., 202, 225, 226, 246
 Гапеев А.Б., 94
 Гареев К.Г., 214
 Гаркуша М.В., 343
 Гасюк О.А., 107
 Гатаулина Э.Д., 135, 220
 Гафуров О.Ш., 243
 Гвоздев Д.А., 112
 Генералов Е.А., 257
 Герасимов Е.И., 136
 Герасимова Е.В., 137
 Гладков А.А., 171
 Гладкова Н.Д., 170, 202, 225, 226, 235, 246, 322
 Глушков Е., 339
 Глушкова О.В., 71
 Глущенков В.А., 69
 Глытов И.В., 68, 260
 Голоборщева В.В., 180
 Голубкова М.А., 40
 Гончарова Н.Д., 24
 Горбачева Е.Ю., 52
 Горбунов Н.П., 154, 156
 Гордеева А.Е., 166
 Горелик А.Л., 252
 Горудко И.В., 156
 Горшков Б.Г., 144
 Горшкова Ю.Е., 18
 Господинов А., 172
 Гребнева К.В., 59
 Грехнева Е.В., 191
 Гречканев Г.О., 202
 Гривенникова В.Г., 148
 Григорьев Т.Е., 186
 Григорьева Д.В., 156
 Григорян И.В., 140, 231
 Гринберг М.А., 8, 30, 31
 Гриневиц А.А., 155, 175
 Гринкевич Л.Н., 270
 Гринкевич О.М., 78
 Гринченко А.В., 36
 Грицкова Е.А., 4
 Грищенко А.А., 247
 Громова Е.Н., 31
 Громова Н.В., 29
 Гронина А.Д., 97
 Груздев Г.А., 89
 Груздев Д.С., 214
 Губарькова Е.В., 202, 225, 246, 322
 Гудков Г.В., 282
 Гудков С.В., 48, 82, 203
 Гудымо А.С., 263
 Гузенко В.В., 168, 174, 304
 Гук П.В., 211
 Гулина Л.С., 192, 205
 Гуляев Ю.В., 140
 Гурин А.Е., 167
 Гурия Г.Т., 147
 Гурьев Е.Л., 53
 Гурьянова А.А., 286
 Гусакова С.В., 220
 Гусев С.А., 154, 156
 Гусева Е.А., 197
 Гусева И.Е., 155, 175
 Давыдов Д.И., 228
 Давыдова А.С., 340
 Дадашов М.З., 84
 Данышин Н.А., 33
 Дарвиш А., 277
 Дарнотук Е.С., 183
 Девяткова Н.С., 23
 Дегтярёв Е.А., 91
 Деева А.А., 320
 Демидов В.Н., 13, 297
 Демина Е.М., 328
 Демченко Л.С., 282
 Демьяненко С.В., 174

- Денисов П.А., 176
 Дериглазов В.В., 214
 Дерябина И.Б., 198, 307
 Детгерер А.С., 164
 Джелад С.С., 292
 Желдубаева Э.Р., 4
 Джимаков С.С., 33, 143
 Дзрелян В.А., 168, 179, 304
 Дзя Ш., 122
 Дигуров Р.В., 319
 Дигурова А.И., 314
 Дигурова И.И., 314, 318, 319
 Диденко Н.В., 151
 Дикопольская Н.Б., 182
 Дмитриева Е.М., 265
 Дмитриева Ю.В., 69
 Добровольская К.Э., 292
 Добрынина О.Е., 53
 Догондзе М.З., 210
 Докучаева И.С., 14
 Долгачева Л.П., 269
 Донцова В.Ю., 335
 Дорохова А.А., 33, 50
 Дроботенко М.И., 143
 Дроздов А.В., 50, 85
 Дроздова Л.И., 344
 Дроздова О.Ю., 109
 Дружкова И.Н., 230, 273
 Дубинин М.В., 268
 Дубовский П.В., 215
 Дудаев А.Е., 336
 Дымова М.А., 340
 Дюкина А.Р., 22, 44, 190
 Евстигнеев М.П., 315
 Егорова М.А., 165, 208, 280
 Егупец Л.В., 106
 Елагин В.В., 218, 225, 306
 Емельяненко В.И., 210
 Еникеев Д.Р., 137
 Еремеев А.А., 298
 Ерёмкина Я.В., 238
 Ермаков В.В., 69
 Ермакова А.В., 58
 Ермакова Е.В., 196
 Ермаченко П.А., 123
 Ермолинский П.Б., 250, 337
 Ерофеев А.И., 237
 Ерофеев А.И., 136
 Ефимова С.С., 58
 Жамбалова Б.А., 251, 255
 Жарков Д.К., 331
 Жданкина Ю.С., 28
 Жиганов Л.С., 161
 Жигачева И.В., 131, 133
 Жук В.Ф., 100
 Жукова Г.В., 211
 Жукова Е.С.¹, 94
 Жумабаева Т.Т., 233
 Забелинский С.А., 79
 Завестовская И.Н., 206
 Загайнов В.Е., 218
 Загайнова Е.В., 218, 273, 326
 Заичкина С.И., 22, 44, 190
 Зайцев В.Ю., 202, 225, 246, 322
 Зайцева Т.Н., 298
 Зайцева Ю.В., 29
 Закрытная Д.С., 328
 Залеский М.Г., 12
 Залесский А.Д., 338
 Заломова Л.В., 294
 Зальгин А.В., 176
 Замятина Е.А., 184
 Занин С.А., 285
 Зарипова Р.И., 149, 182, 199
 Засухина Г.Д., 7
 Захарова А.А., 58
 Захарова Н.М., 120
 Зачепило Т., 15
 Здобнова Т.А., 8
 Землянсков М.С., 171
 Зефирова Т.Л., 149, 182, 199
 Зимина Т.М., 214
 Зинченко В.П., 269
 Зиятдинова Н.И., 149, 182, 199
 Золин Ю.А., 59
 Золотавина М.Л., 282
 Зуева О.С., 110, 121
 Зюзин М.В., 259
 Зякун А.М., 118
 Ибрагимова Ж.М., 107
 Иванов В.А., 154, 156
 Иванов В.В., 220
 Иванов В.Е., 82
 Иванов К.Ю., 329
 Иванова А.А., 75
 Иванова А.В., 31
 Иванова Д.Н., 47
 Иванова Э.А., 127
 Иванченко М.В., 194
 Иващенко Л.И., 9
 Ивлев В.А., 50
 Ивлев Д.А., 147
 Игнатов А.Н., 126
 Игнатов М.А., 81
 Игнатова Н.И., 273, 306
 Игнатъева О.В., 29
 Изосимова А.В., 249, 326
 Ильченко Г.П., 61
 Иноземцев А.Н., 89
 Истомина М.С., 305
 Ишмухаметов И.Р., 332
 Июдин В.С., 141
 Кабилова А.А., 196
 Каде А.Х., 86, 253, 285
 Казакова А.С., 335
 Казанцев В.Б., 171
 Кайрат Б.К., 98
 Калаева Е.А., 9, 311
 Калачева Н.В., 114
 Калинин А.И., 203
 Калюжная Ю.Н., 179
 Калюжная Ю.Н., 168, 304
 Калякулина А.И., 194
 Каменский А.А., 89
 Каменский В.А., 306
 Канев И.Л., 90
 Карабут М.М., 218
 Карасёва Э.В., 83
 Карманов А.П., 58
 Карманова Е.Е.¹, 77
 Каровецкая Д.М., 17
 Карпенко А.А., 266
 Карпов Т.Е., 261
 Карпова М.В., 189
 Карпова О.В., 325, 334
 Карпова Р.В., 134
 Карпухина О.В., 89
 Каспаров А.К., 349
 Касумов Р.Э., 342, 346, 351
 Касумов Э.А., 342, 346, 351

- Касумова И.В., 342, 346, 351
 Касьяненко Н.А., 14
 Катюхин Л.Н., 79
 Качанова К.В., 185
 Кашулин П.А., 114
 Киреев И.И., 193
 Киреева А.В., 34
 Кириллова Д.А., 186
 Киселев И.А., 214
 Киселева Е.Б., 163, 170, 322
 Кичеева А.Г., 11
 Клапшина Л.Г., 295
 Клименко В.В., 51, 74
 Клинов Д.В., 308
 Кличханов Н.К., 79
 Князев Н.А., 74
 Ковалев В.В., 36
 Коваленко Н.М., 322
 Коваленко С.Г., 283
 Ковылин Р.С., 178
 Ковязина И.В., 288, 289
 Кодиров С.А., 207
 Козин С.В., 9, 33, 39, 50, 55
 Козлов Д.С., 218
 Козляева Е.В., 228
 Козобкова Н.В., 296
 Козяева В.В., 214
 Кокшаров Ю.А., 231
 Коленчукова О.А., 34, 211
 Колесников Я.А., 340
 Колик Л.В., 48
 Колманович Д.Д., 206
 Колосеева В.С., 260
 Колпаков В.Н., 171
 Колтаков И.А., 188
 Колтовая Н.А., 172
 Комарова А.Д., 163
 Комарова С.А., 102, 103
 Комелина Н.П., 120
 Компаниченко В.Н., 354
 Кондакова Е.В., 203
 Кононова У.А., 41
 Конусова Д.А., 189
 Кончев Е.М., 48
 Конюхов И.В., 113, 115
 Копылова В.С., 161
 Корвякова П.В., 201
 Корепанова Е.П., 17
 Коржов А.Н., 65
 Коржова М.А., 65
 Королева К.С., 150, 274
 Королёва К.С., 149, 196
 Королева М.Ю., 184
 Коротков С.М., 26
 Коротченко С.А., 228
 Корчагина В.М., 260, 264
 Корчагина Е.Е., 188
 Косенко А.О., 126
 Косенко М.Н., 263
 Костарев К.В., 117
 Костевич В.А., 154, 156
 Костина Л.А., 14
 Кочева Л.С., 58
 Кочеткова О.Ю., 90
 Кравцов А.А., 9, 39, 50, 55
 Кравченко С.В., 254, 262
 Краевский С.В., 308
 Кратасюк В.А., 99, 211, 313, 320
 Кривоносов М.И., 164, 195
 Криворотько П.В., 246
 Крикунова Н.И., 131, 133
 Крицкая А.А., 106
 Крицкая К.А., 173, 207, 222, 229
 Кротенко Н.М., 265
 Круглова М.Н., 83
 Крутенко Д.В., 282
 Крыгина М.А., 185
 Крылов В.В., 60, 103
 Крылов Д.П., 218
 Крылова А.К., 106
 Крысько Д.В., 138, 248, 295
 Кудрявцева Т.Н., 191
 Кудряшева Н.С., 11
 Кузеева А.А., 71
 Кузнецов А.В., 128
 Кузнецова А.А., 193
 Кузнецова А.В., 219
 Кузнецова Д.В., 30
 Кузнецова Д.С., 218
 Кузнецова С.М., 210
 Кузьменко Т.П., 185
 Кузьмичев В.Е., 118
 Кузякова О.Ю., 36
 Куимова М.К., 273
 Кулбаева М.С., 200
 Кулемзин С.В., 249
 Кулигина Е.В., 340
 Кульчицкий В.А., 141
 Кумейко В.В., 36
 Курганова Э.А., 166
 Курмашова Е.Д., 135
 Куроптева З.В., 233
 Кучеряну В.Г., 134, 180
 Кушунина М.А., 104
 Кырова Е.И., 126
 Лавриненко И.А., 325, 334
 Лавров И.А., 245
 Лаврова А.И., 146
 Лаврова А.И., 191, 210
 Ладейнова М.М., 8, 30
 Лазукин А.А., 107
 Ланда С.Б., 205, 303
 Ланских Д.В., 36
 Лапшин Р.Д., 293
 Ларионов И.И., 214
 Латанов А.В., 161
 Лауринавичюс К.С., 210
 Левада Е.В., 17
 Левковская Г.М., 349
 Левченко А.А., 9
 Леонов С.В., 286
 Леонтьев А.В., 331
 Лермонтова С.А., 295
 Лизоркина К.И., 120
 Литвинов Н.В., 9
 Лобанова Н.А., 203
 Логинова М.М., 202, 226
 Лоза С.А., 65
 Лопатина Н., 15
 Лопатина О.А., 78
 Лопаткина Н.В., 23
 Лошкарева М.В., 34
 Луговая Е.А., 223
 Луговский А.П., 296
 Луговцов А.Е., 250, 337
 Лукашев Е.П., 112
 Лукин П.О., 264
 Лукина М.М., 163
 Лунин С.М., 71
 Лупанова А.С., 280
 Лысенко Е.П., 310
 Любавина Н.А., 178
 Любанская А.Д., 264
 Лямзаев К.Г., 89

- Лясота О.М., 33, 39, 50
 Макаров А.Ю., 345
 Макарова Е.В., 178
 Максимов Г.В., 142, 148
 Максимов Д.И., 154
 Максимов М.К., 337
 Малькин Г.В., 36
 Малышева Д.О., 340
 Мальцев В.П., 266
 Маматкулов К.З., 328
 Маракушев С.А., 37
 Мартинович Г.Г., 276
 Мартинович И.В., 276
 Мартиросян Д.Ю., 338
 Марченко В.Ю., 263
 Марченко Я.Ю., 214
 Марчукова К.Н., 325, 334
 Масленникова А.В., 41
 Масленникова О.М., 353
 Матвеев Л.А., 226
 Маторин Д.Н., 112
 Матюшевская А.О., 182
 Мачнева Т.В., 314, 318
 Машковцева Е.В., 161
 Медведева А.В., 17
 Медведева В.П., 169
 Медвинский А.Б., 127
 Медяник И.А., 176
 Мейчик Н.Р., 32, 104
 Мелешенко К.А., 14
 Мелконян К.К., 97
 Мельник А.В., 100
 Мельникова А.А., 99
 Мещанинова М.И., 340
 Микаелян М.С., 20
 Милицкова А.Д., 245
 Миль Е.М., 131
 Мильштейн И.М., 344
 Минаев Н.В., 41
 Минасбемян Л.А., 350
 Минский И.А., 100
 Миронова А.Г., 75
 Миронова Г.Д., 169
 Миронюк И.С., 4
 Митенев А.В., 136
 Митрошина Е.В., 164, 256
 Митрухина О.Б., 287
 Митусова К.А., 64, 277
 Митюшкин Е.О., 331
 Михайлова В.В., 38
 Михайлова М.К., 91
 Михальчик Е.В., 156, 308
 Михуткин А.А., 186
 Мицын Г.В., 4, 190
 Мищенко Е.В., 184
 Мищенко Т.А., 164, 194, 195, 197, 295
 Можеров А.М., 163, 218, 230, 249, 326
 Моисеев А.А., 170, 226, 235
 Моисеев А.В., 9, 33, 50
 Моисеенко В.М., 51, 74
 Мокрушин А.А., 57, 67
 Молодцова Д.В., 81
 Молодцова Д.С., 54
 Молчанов М.В., 210
 Молчанова М.Л., 263
 Морозов В.Н., 88
 Морозова Г.М., 78
 Морозова К.И., 176
 Морозова О.В., 308
 Мосенцов А.А., 169
 Московский М.Н., 331
 Мубаракшина Э.К., 71
 Муранова Л.Н., 307, 331
 Мурзакова И.Ф., 47
 Мурзина Г.Б., 224
 Мурина М.А., 302
 Мухаметова Э.Р., 245
 Мухина И.В., 171, 178, 228
 Мухина К.А., 264
 Мухтаров М.М., 107
 Мұстафин М., 200
 Мұстафина Г., 200
 Мясникова В.В., 254, 262
 Нагаев Е.И., 203
 Нагорская М.В., 4
 Надеев А.Д., 229
 Назимова С.В., 177, 242, 279
 Найденов И.Е., 260
 Наймарк О.Б., 348
 Наквасина М.А., 62, 311
 Нарциссов Я.Р., 161
 Насибова А.Н., 352
 Науменко М.В., 18
 Некрасова Е.И., 35
 Немцова Ю.А., 30, 31
 Нечаев А.Н., 18
 Нечипуренко Ю.Д., 143
 Низамиева А.А., 283
 Никельшпартг Э.И., 148
 Никитин М.П., 144
 Никитин П.И., 144
 Никитина Е.А., 17
 Никитина Е.Р., 79, 87
 Никифоров В.Г., 331
 Николаева Т.И., 210
 Николаева Ю.И., 104
 Никушин О.В., 104
 Новаковская М.В., 93
 Новиков В.В., 27
 Новиков Н.И., 132
 Новиков С.М., 148
 Новомлинова О.С., 106
 Новопашина Д.С., 340
 Новоселов В.И., 166
 Новоселова Е.Г., 71
 Новоселова Т.В., 71
 Носарев А.В., 220
 Нуриева Н.И., 127
 Нурмиева Д.А., 150
 Обернихин С.С., 177, 242, 279
 Образцова Е.А., 308
 Обыденный С.И., 193
 Оганян Т.Э., 24
 Огнева И.В., 28, 40, 52, 80
 Олейников В.А., 176
 Олешкевич А.А., 102, 103
 Омельянчик А.С., 17
 Оникиенко С.Б., 145
 Онищук В.В., 253
 Онхонова Г.С., 263
 Орлов А.В., 144
 Орлов Ю.Л., 312
 Орлова М.Н., 18
 Орлова Н.Г., 312
 Осипов А.А., 68, 81, 260, 264, 339
 Осипов А.Н., 81, 236, 238, 251, 255, 286, 290, 301
 Островский Е.М., 154
 Остроумова О.С., 58
 Осыченко А.А., 338
 Отряскин Я.С., 160, 224
 Павлов М.В., 225
 Палагутина Е.Е., 106

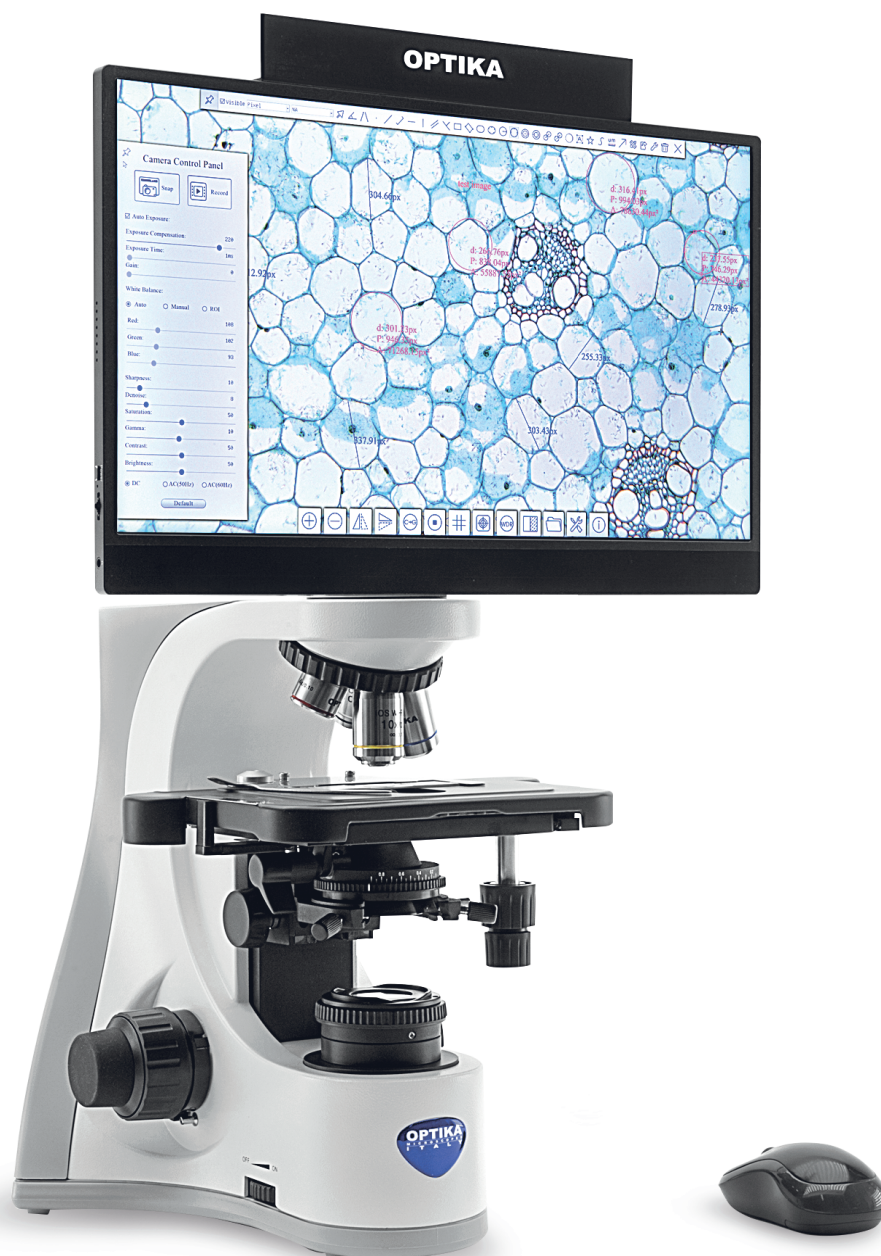
- Панасенко О.М., 154, 156, 308
- Пантелеев М.А., 193
- Пантина Р.А., 303
- Панчелюга В.А., 44, 66
- Панчелюга М.С., 44, 66
- Панченко И.А., 21
- Парфенюк С.Б., 71
- Парчайкина М.В., 185
- Паршина Е.Ю., 176
- Пастон С.В., 47
- Патлай А.А., 73
- Пахомова Т.Б., 13
- Пацаев Т.Д., 186
- Пельтек А., 259
- Перенков А.Д., 195, 256
- Перетягин П.В., 151
- Першин В.И., 228
- Петрова К.А., 150
- Пигарева Я.И., 171
- Пимашкин А.С., 171
- Пиняев С.И., 160, 224
- Пиняскина Е.В., 116
- Пионтковский С.А., 100
- Пирогова П.А., 8
- Пирутин С.К., 122
- Пияев С.И., 189
- Плеханов А.А., 202, 225, 226, 246
- Погосян Г.А., 19, 20
- Погосян С.И., 113, 115
- Подгорная А.А., 325, 334
- Подгурская А.Д., 74
- Подушин Ю.В., 91
- Позябин С.В., 18
- Полякова А.Г., 151
- Пономарев И.А., 147
- Пономаренко А.А., 284
- Попко К.С., 106
- Попов А.В., 176
- Попов А.Л., 191, 206, 260
- Попов И.А., 18
- Попова А.Ю., 59
- Попова И.Ю., 264, 339
- Попова Н.Р., 184
- Попова Э.В., 322
- Поспелов А.Д., 53
- Постников Е.Б., 146, 191, 210
- Постнов Д.Э., 146, 240, 257
- Постовалова А., 259
- Постовалова А.С., 305
- Потапенков К.В., 140, 231
- Потапов А.Л., 226
- Похмельнова М.С., 79
- Поцелуева М.М., 22, 44
- Прибышина А., 15
- Приезжев А.В., 250, 337
- Прокофьев Д.Ю., 292
- Пустовалова М.В., 286
- Путинцева О.В., 201
- Пушин Д.М., 147
- Пчелин П.В., 293
- Пчицкая Е.И., 136
- Пшеничников С.Е., 17
- Пьянзина А.Е., 160
- Пятигорская Н.В., 257
- Раваева М.Ю., 4
- Раденович А., 339
- Раденска-Лоповок С.Г., 226
- Радченко М.С., 62
- Раева Н.Ф., 7
- Райхман Е.В., 90
- Раскоша О.В., 58
- Реброва А.В., 17
- Ревин В.В., 160, 185, 189
- Ревина Э.С., 185
- Редькин Т.С., 138, 248, 295
- Резников И.И., 310
- Реут Е.С., 106
- Рзянина А.В., 4
- Ризниченко Г.Ю., 115
- Римацкая Н.В., 99
- Рихтер В.А., 340
- Рогова А., 64, 259
- Рогова А.С., 182
- Рогожин Е.А., 70
- Роденко Н.А., 69
- Родимова С.А., 218
- Родионова В.В., 17
- Родионова Н.Н., 343
- Рождественский Л.М., 7
- Розанова О.М., 152, 158, 239
- Романов М.В., 191, 260
- Романченко Е.Д., 168
- Ромодин Л.А., 234
- Ромшин А.М., 339
- Рочев Р.Д., 297
- Рошупкин Д.И., 302
- Рубин А.Б., 148
- Рудникова Н.А., 161
- Румянцева Н.И., 92
- Русина И.Ф., 131
- Рыбченко А.Ф., 223
- Рыжиков А.Б., 263
- Рыжкина И.С., 14
- Рыжов В.А., 214
- Рыльцева Г.А., 336
- Рябков М.Г., 322
- Рябов Е.И., 93
- Савватеева-Попова Е.В., 17
- Савина Е.А., 312
- Савинков А.В., 69
- Савинов В.П., 89
- Савицкий А.П., 296
- Савицкий М.А., 128
- Савюк М.О., 138, 195, 248, 295
- Салеева Д.В., 7
- Салеева Д.В., 6
- Салихова Т., 147
- Салмина А.Б., 320
- Самитова Э.Р., 219
- Самков А.А., 83, 97, 107
- Самойлова А.А., 313, 317
- Самцов М.П., 296
- Саратовских Е.А., 98, 112
- Саргсян Э.Г., 19
- Саримов Р.М., 203
- Сафарова Д.Д., 17
- Сахнов С.Н., 254, 262
- Саченков О.А., 267
- Сачкова А.С., 11
- Сачкова Д.А., 230, 249, 326
- Свекло Л.С., 9
- Свентицкая М.А., 52
- Свитко С.О., 149, 274
- Седов В.С., 339
- Седова Е.С., 226
- Семенов А.Н., 250
- Семенова А.А., 148
- Семенова Е.В., 139
- Семьянов А.В., 176, 257

- Сенча Л.М., 53
 Сергиенко В.И., 302
 Серегин А.А., 265
 Середин Д.С., 123
 Сериев И.Р., 54
 Серикова И.М., 100
 Сибирев А.Л., 353
 Сизов Д.А., 103
 Сизова А.А., 103
 Силантьев В.Е., 73
 Силантьева Д.И., 198, 217
 Симакин А.В., 82
 Симоненко Е.Ю., 75
 Симонян Р., 89
 Сироткина М.А., 202, 225, 226, 246
 Ситдикова Г.Ф., 137, 149, 150, 196, 220, 241, 274, 287
 Ситков Н.О., 214
 Скамницкий Д.В., 54
 Скирда А.М., 144
 Сластникова Т.А., 231
 Слепцова Е.Е., 138, 248, 295
 Слотвицкий М.М., 203, 283
 Смирнов А.В., 158, 239
 Смирнова Е.Н., 152, 158, 239
 Смирнова Л.П., 265
 Соболев А.С., 231
 Соболев К.В., 17
 Соболев М.Е., 252
 Соболев К.В., 26, 271
 Советский А.А., 202, 225, 246, 322
 Соколов А.В., 154, 156
 Соколова Л.О., 9, 201
 Соловченко А.Е., 125
 Соловьева А.Г., 151
 Сорокин М.И., 286
 Сорокина Д.М., 287
 Сорокина Е.А., 86
 Сороко С.С., 54
 Сосновцева О., 148
 Спиридонов В.В., 140, 231
 Старобор Н.Н., 58
 Стельмашук О.А., 222
 Степанов Г.О., 236, 238
 Степанов С.В., 260
 Степанова Л.В., 211
 Степин Е.А., 11
 Степович М.А., 353
 Столяр С.В., 34
 Стрельникова Н.С., 152, 158, 239
 Стрельцова О.С., 306
 Стригин М.Б., 129
 Суглобов А.С., 128
 Суковатая И.Е., 317, 320
 Суковатый Л.А., 320
 Суковатый Л.А., 317
 Сулейманова Е.М., 247
 Сунгатуллина М.И., 149, 182, 199
 Сунцова М.В., 286
 Суслов М.А., 333, 338
 Сутормин О.С., 211, 317, 320
 Сухов В.С., 59
 Сухова Е.М., 59
 Сушко Е.С., 11
 Сысоев Д.С., 261
 Сысоев И.В., 247
 Сычев А.В., 191, 210
 Сюсин И.В., 160, 189
 Танканаг А.В., 155, 175
 Таранов И.В., 140, 231
 Тарасевич В.Ф., 349
 Тарасов Д.С., 296
 Тарасов Я.В., 282
 Таскаев С.Ю., 340
 Татьяначенко И.С., 335
 Текуцкая Е.Е., 21, 61, 157
 Телина Э.Н., 243
 Теплов А.Ю., 289
 Теплова П.О., 120
 Теплухина К.А., 14
 Терещенко Л.В., 161
 Теселкин Ю.О., 301
 Тесёлкин Ю.О., 251, 255
 Тешич С., 126
 Тимин А.С., 64, 182, 259, 261, 277
 Тимохина Е.П., 177, 242, 279
 Тимошенко В.Ю., 89
 Тимошенко Н.В., 24
 Титов В.Ю., 290
 Тихонова И.В., 155, 175
 Ткачев Н.А., 35
 Тодоренко Д.А., 112
 Токальчик Ю.П., 141
 Толмачев С.Ю., 322
 Точило У.А., 338
 Тронов В.А., 35
 Трофименко А.И., 86, 253, 285
 Тулеуханов С.Т., 98
 Туркина В.А., 312
 Туровецкий В.Б., 122
 Турубанова В.Д., 138, 248, 295
 Уваров О.В., 82
 Углова С.С., 4
 Уграйская С.В., 16
 Узлова С.Г., 147
 Усачева А.М., 77
 Уткин Ю.Н., 215
 Фаниев М.В., 282
 Фахруллина Г.И., 332
 Федоренко Т.В., 282
 Федорина А.И., 243
 Федоров В.И., 103
 Федоров В.С., 214
 Фёдорова М.М., 345
 Фёдорова М.Ф., 328
 Федорова Н.Д., 303
 Федорцов Н.М., 43
 Федотов Ю.А., 81, 338
 Федотова А.А., 257
 Федотова Е.И., 173, 207, 229
 Федулов Ю.П., 45, 91
 Федянин А.О., 298
 Фесенко (мл.) Е.Е., 167, 294
 Фесенко Е.Е., 16, 27
 Филатов М.В., 303
 Филатова Л.Ю., 308
 Филатьева А.Е., 203
 Филипович Т.А., 141
 Филиппов В.В., 110
 Филиппов Е.Ф., 282
 Филоненко В.П., 339
 Фирова Р.Х., 308
 Фирсова Е.Л., 78
 Фокина Е.Д., 126
 Фридунбеков И.Ю., 352

- Фурсова П.В., 115
 Хабиб З.С., 307
 Хаертдинов Н.Н., 332
 Хаир Т., 110, 121
 Халилов Р.И., 352
 Хамидуллина А.А., 289
 Харитонов Д.В., 238
 Хлынова А.Э., 273
 Хмиль Н.В., 169
 Холявка М.Г., 324
 Хомутов Г.Б., 140, 213, 231
 Хорунжий Г.Д., 165
 Храмов Р.Н., 294
 Храмушина И.А., 246
 Храмцов Ю.В., 231
 Хренов М.О., 71
 Христова Р., 172
 Худокормов А.А., 83, 97, 107
 Худякова Ю.Е., 106
 Хундерякова Н.В., 169
 Цай А.А., 69
 Цвеляя В.А., 203, 283
 Цееб В.Э., 339
 Цораев Г.В., 112
 Чабанец Е.А., 285
 Чаусов Д.Н., 82
 Чеботарева М.А., 79, 87
 Чеботарева Н.А., 38
 Черенков И.А., 93
 Черепенин В.А., 140
 Черетаев И.В., 4
 Черкасова Е.И., 41, 53
 Черников А.В., 77
 Черников А.М., 38
 Чернов В.В., 94
 Чернов Я.В., 178, 228
 Черняев П.С., 325, 334
 Черняк Б., 89
 Чигарова О.А., 24
 Чигасова А.К., 81
 Чугунова Ю.А., 83
 Чуканов В.С., 136
 Чумарина А.И., 217
 Чурилов Г.Н., 11
 Чуфицкий С.В., 101
 Чуян Е.Н., 4
 Шабанов Г.А., 223
 Шайдуллин А.И., 110
 Шакиров В.Е., 344
 Шамаль Н.В., 349
 Шамсиев И.Д., 161
 Шанк М.А., 122
 Шанько Ю.Г., 141
 Шаповалов В.В., 12
 Шарапов М.Г., 71
 Шариков Р.В., 186
 Шарикова Н.А., 186
 Шаройко В.В., 297
 Шаронов Г.В., 326
 Шастина Н.С., 183
 Шатский И.В., 325, 334
 Шахматова В.И., 220
 Швед Н.А., 36
 Швецова Е.В., 98, 200
 Шевцов М.А., 214
 Шемяков А.Е., 158, 190, 191, 206, 239, 260
 Шерстобитов А.О., 87
 Шестопалова М.С., 176
 Шеховцов П.В., 210
 Шидловский Ю.В., 292
 Шилкин А.Г., 18
 Шилова Е.В., 188
 Шилягина Н.Ю., 54
 Шимолина Л.Е., 273
 Шипко М.Н., 353
 Шипулин К.Н., 4, 190
 Ширманова М.В., 163, 230, 249, 273, 326
 Широких А.Д., 184
 Широкова О.М., 178, 228
 Шихаб А., 198
 Шишов В.В., 317
 Шлеева М.О., 296
 Шмелёв Г.Г., 331
 Шмелев М.Е., 73
 Шпаков И.А., 21
 Шуколюкова Е.П., 79, 87
 Шульман А.А., 298
 Шурыгин Б.М., 125
 Шутиков А.А., 328
 Щегловитова О.Н., 337
 Щелчкова Н.А., 228, 293
 Щербатюк Т.Г., 94
 Щербина С.А., 203, 283
 Щеславский В.И., 163, 230, 326
 Щечкин И.Д., 218
 Эмануэль В.Л., 192, 205, 303
 Эрнандес-Касерес Х., 143
 Юдаев И.В., 335
 Юдина Л.М., 59
 Южакова Д.В., 230, 249, 326
 Юртаева С.В., 92, 299
 Юсубалиева Г.М., 249
 Юсупов В.И., 22, 41
 Яблокова Е.В., 27
 Яглов В.В., 177, 242, 279
 Яглова Н.В., 177, 242, 279
 Яковенко С.А., 75
 Яковлев А., 135
 Яковлев А.В., 137, 164, 220, 287
 Яковлева А.В., 12
 Яковлева Е.И., 245
 Яковлева О.В., 287
 Якубова А.А., 277
 Якубовский Д.И., 148
 Якунин В.Г., 89
 Янушевская Я.С., 121
 Ярков Р.С., 164, 194, 195
 Ярославов А.А., 140, 231
 Яруллин Р.Н., 98
 Ястребова Е.С., 266
 Ястремский Е.В., 186
 Яфарова Г.Г., 141, 149, 199, 299
 Яцык И.В., 92, 299
 Яшин К.С., 163, 170, 176, 230, 249
 Яшкина Е.И., 81

Высокое качество стало доступным

ОПТИКА
MICROSCOPES
I T A L Y



Микроскопы серии В-500, ОПТИКА (Италия)

Характеристики оптической системы, цифровой камеры и сенсорного дисплея позволяют наблюдать за образцами с точностью 4К, которая до недавнего времени была невообразимой.

Stormoff®

МО, г. Красногорск, б-р Строителей, 4/1
+7 495 780 07 95, 495 956 05 57
lab@stormoff.ru, www.stormoff.ru