



Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
Российская академия наук
ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОФИЗИКА

14–16 февраля 2023 года



Издательство
Синхробук
(Synchrobook™)

ПУЩИНО
2023

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

Российская академия наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт теоретической и экспериментальной биофизики

Российской академии наук

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ
БИОФИЗИКА

14–16 февраля 2023 года

Издательство Синхробук (Synchrobook™)

Пушино

2023

Теоретическая и экспериментальная биофизика : Материалы конференции «Теоретическая и экспериментальная биофизика», 14–16 февраля 2023 года. — Пушкино : Синхробук (Synchrobook™), 2023. — 118 с.

ISBN 978-5-91874-911-1

Под ред. чл.-корр. РАН Иваницкого Г.Р., д.ф.-м.н., проф. Медвинского А.Б., д.ф.-м.н., проф. Акатова В.С., к.х.н. Шляпникова Ю.М., д.б.н. Архипова В.И., д.б.н. Кичигиной В.Ф., д.б.н. Косенко Е.А., к.б.н. Круглова А.Г., д.б.н. Вихлянцева И.М., д.б.н., проф. Погорелова А.Г., д.м.н., проф. Маевского Е.И., д.б.н. Куликова А.В., к.б.н. Фадеева Р.С., к.б.н. Ермакова А.М.

Настоящий сборник составлен по материалам, отражающим наиболее значимые результаты научных исследований, представленных сотрудниками ИТЭБ РАН в 2023 г. на ежегодной отчетной конференции. Сборник содержит работы в области изучения нелинейных процессов в биосистемах, исследований структурно-функциональных свойств различных биомолекул, математического моделирования, разных разделов нейробиологии, исследования различных аспектов воздействия ионизирующего излучения на живые объекты, разработки инновационных терапевтических подходов для лечения различных заболеваний, а также методов их диагностики.

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	3
<i>Абдуллаев С.А.</i> РАДИОЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА АИКАР.....	8
<i>Алилова Г.А., Тихонова Л.А., Косенко Е.А.</i> НОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ АММИАКИНДУЦИРОВАННОЙ ГЕПАТОЭНЦЕФАЛОПАТИИ	9
<i>Аникина В.А., Сорокина С.С., Замятина Е.А., Шемяков А.Е., Попова Н.Р.</i> РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ОСТРОГО РАДИАЦИОННОГО ДЕРМАТИТА НА МЫШАХ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ЛОКАЛЬНЫМ ПРОТОННЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ	11
<i>Аракелян А.Г., Микулинская Г.В., Прохоров Д.А.</i> СТРУКТУРНО- ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОЛИЗИНА БАКТЕРИОФАГА RB49.....	14
<i>Артюх Р.И., Антипова В.Н., Перевязова Т.А., Юнусова А.К.</i> СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ НИКУЮЩЕЙ ЭНДОНУКЛЕЗЫ Cys free Nt.VspD61	16
<i>Бобылёва Л.Г., Урюпина Т.А., Молочков Н.В., Тимченко А.А., Тимченко М.А., Пеньков Н.В., Галзитская О.В., Вихлянцев И.М., Бобылёв А.Г.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ АМИЛОИДНОЙ АГРЕГАЦИИ МУЛЬТИДОМЕННОГО ГИГАНТСКОГО БЕЛКА ТИТИНА.....	18
<i>Бражник Е.С., Шубина Л.В., Мысин И.Е., Попова Л.Б., Новиков Н.И.</i> ВКЛАД НАРУЖНОЙ ЧАСТИ БЛЕДНОГО ЯДРА В ОСЦИЛЛЯТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ МОТОРНЫХ НЕЙРОСЕТЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА	21
<i>Галзитская О.В., Бобылёва Л.Г., Глякина А.В.</i> АНАЛИЗ РАСПОЛОЖЕНИЯ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ БЕЛКА АКТИНА, ПРИВОДЯЩИХ К НЕМАЛИНОВОЙ МИОПАТИИ	24
<i>Глухов С.И., Абдуллаев С.А., <u>Газиев А.И.</u></i> САМОПОДДЕРЖИВАЮЩИЙСЯ ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У ОБЛУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ ЯВЛЯЕТСЯ ФАКТОРОМ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПОСТРАДИАЦИОННОЙ ЛЕТАЛЬНОСТИ	26
<i>Давыдова Г.А., Форысенкова А.А., Фадеева И.В.</i> КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ КАТИОН-ЗАМЕЩЕННЫХ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ	27

<i>Дюкина А.Р., Заичкина С.И., Поцелуева М.М., Юсупов В.И.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ F1 ПОКОЛЕНИЯ МЫШЕЙ, ОБЛУЧЕННЫХ ФЕМТОСЕКУНДНЫМ ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ <i>IN VIVO</i>	30
<i>Жуйкова Н.С., Михеева И.Б., Павлик Л.Л., Архипов В.А.</i> ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ТЕСТЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ НАРУШЕНИЙ ВЕСТИБУЛЯРНОЙ ФУНКЦИИ У МЫШЕЙ.....	32
<i>Журавлева З.Н.</i> УЧАСТИЕ АСТРОЦИТАРНОЙ ГАМК В РАЗВИТИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ НЕОКОРТИКАЛЬНЫХ НЕЙРОТРАНСПЛАТАТОВ	35
<i>Звягина А.И., Минайчев В.В., Пятина К.В., Менухов В.О., Фадеева И.С.</i> ВЫЯВЛЕНИЕ РОЛИ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В ИНИЦИАЦИИ АСЕПТИЧЕСКОГО КАЛЬЦИНОЗА КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ БИОМАТЕРИАЛОВ.....	37
<i>Иваницкий Г.Р.</i> ЧЕЛОВЕК И АНДРОИДНЫЙ РОБОТ. МОЖЕТ ЛИ РОБОТ ИМЕТЬ СОЗНАНИЕ?	40
<i>Ломовский А.И.*, Бабурина Ю.Л., Фадеев Р.С., Ломовская Я.В., Кобякова М.И., Крестинин Р.Р., Сотникова Л.Д., Крестинина О.В.</i> МЕЛАТОНИН МОЖЕТ УСИЛИВАТЬ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЛЕЙКЕМИИ.....	43
<i>Карманова Е.Е., Черников А.В., Иванов В.Е., Усачева А.М., Брусков В.И.</i> СРАВНЕНИЕ ГЕНОПРОТЕКТОРНЫХ И РАДИОЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ МЕТФОРМИНА, МЕКСИДОЛА И АЛЬФА-ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ РЕНТГЕНОВСКОМ ОБЛУЧЕНИИ	46
<i>Коломбет В.А., Лесных В.Н.</i> МЕНТАЛЬНЫЙ РАСТР	48
<i>Корчагина В.М., Оситов А.А.</i> ЗАВИСИМОСТЬ СИЛЫ МУТАНТНЫХ ПРОМОТОРОВ ГЕНА <i>RRNV</i> РИБОСОМАЛЬНОЙ РНК <i>E. COLI</i> ОТ ПАРАМЕТРОВ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА UP-ЭЛЕМЕНТА.....	50
<i>Краснов К.С., Сенотов А.С., Кобякова М.И., Ломовская Я.В., Краснова О.А., Захаров К.Е., Акатов В.С., Фадеев Р.С.</i> АКТИВАЦИЯ ИНТЕРФЕРОНОВОГО СИГНАЛИНГА, КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ МНОГОКЛЕТОЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ.....	52
<i>Краснова О.А., Минайчев В.В., Краснов К.С., Акатов В.С., Фадеева И.С.</i> БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОЭМУЛЬСИИ НА ОСНОВЕ ТЕРПЕНОИДОВ.....	54
<i>Кузнецова Е.А., Розанова О.М., Смирнова Е.Н., Глухов С.И., Сирота Т.В., Белякова Т.А.</i> ВАРИАЦИИ УРОВНЕЙ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ МЫШЕЙ В РАЗНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ УГЛЕРОДА В ПИКЕ БРЭГГА ИЛИ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ	56

<i>Куликов А.В., Глазкова П.А., Глазков А.А., Куликов Д.А., Гаврилюк В.Б., Брусков В.Б., Архипова Л.В.</i> УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ ЖИВОТНЫХ НА МОДЕЛИ УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ.....	59
<i>Маевский Е.И., Гришина Е.В., Васильева А.А., Закаров А.М., Богданова Л.А., Учитель М.Л.</i> КОРРЕКЦИЯ ТЯЖЕЛОГО СТРЕССА У ЖИВОТНЫХ С ПОМОЩЬЮ МЕТАБОЛИТНОЙ ТЕРАПИИ — ИНИЦИАЦИИ РЕАКЦИЙ «АКТИВАЦИИ»	61
<i>Минайчев В.В., Смирнов И.В., Тетерина А.Ю., Фадеев Р. С., Михеева П.В., Менухов В.О., Кобякова М.И., Звягина А.И., Пятин К.В., Акатов В.С., Фадеева И.С.</i> ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ НА ИХ БИОЛОГИЧЕСКУЮ СОВМЕСТИМОСТЬ И СПОСОБЫ ЕЁ ПОВЫШЕНИЯ	63
<i>Мысин И.Е.</i> МОДЕЛЬ ФАЗОВЫХ ОТНОШЕНИЙ ИНТЕРНЕЙРОНОВ ОТНОСИТЕЛЬНО ТЕТА-РИТМА В ПОЛЕ СА1 ГИППОКАМПА.....	66
<i>Осипов А.А.</i> БИОИНФОРМАТИКА, НЕЙРОБИОЛОГИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ И ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ	68
<i>Осипов А.А., Любанская А.Д., Мухина К.А., Иваненко А., Никифорова А.Б., Попова И.Ю.</i> БЛОКАДА НАДФН-ОКСИДАЗЫ 2 ПРЕДОТВРАЩАЕТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И МИКРОГЛИОЗ В ГИППОКАМПЕ МЫШЕЙ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ АМИЛОИДНОЙ ТОКСИЧНОСТИ.....	69
<i>Панчелюга В.А., Панчелюга М.С.</i> УНИВЕРСАЛЬНЫЙ СПЕКТР ПЕРИОДОВ И ИРРАЦИОНАЛЬНЫЕ ФРАКТАЛЬНЫЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ: ВОЗМОЖНАЯ СВЯЗЬ.....	72
<i>Панчелюга В.А., Панчелюга М.С., Заичкина С.И., Дюкина А.Р., Поцелуева М.М., Ларюшкин Д.П., Степанов И.Н., Зателепин В.Н., Баранов Д.С.</i> ОБНАРУЖЕНИЕ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ ПОСЛЕ НЕПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ ПАРА, ПРОШЕДШЕГО ЧЕРЕЗ ВЫСОКОВОЛЬТНУЮ РАЗРЯДНУЮ КАМЕРУ	75
<i>Першина Е.В., Михеева И.Б., Павлик Л.Л., Черноморец И.Ю., Федоров Д.А., Архипов В.И.</i> ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ В НЕОКОРТЕКСЕ И ГИППОКАМПЕ КРЫС ПОСЛЕ ИНТОКСИКАЦИИ ХЛОРИДОМ ТРИМЕТИЛОЛОВА	77
<i>Погорелов А.Г., Макарова Н.П., Погорелова В.Н., Сухих Г.Т.</i> ЛАЗЕРНАЯ МИКРОТОМОГРАФИЯ ИЗОЛИРОВАННОГО ООЦИТА ЧЕЛОВЕКА.....	80
<i>Поздняков Н.В., Молчанов М.В., Пономарёва Т.И., Рыков В.А., Лукин А.М., Шилов С.В., Согорин Е.А.</i> ВЛИЯНИЕ ГИДРОЛИЗАТА ИЗОЛЯТА БЕЛКА СОИ НА АДАПТАЦИЮ К ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ У КРЫС	82

<i>Пятина К.В., Звягина А.И., Минайчев В.В., Менухов В.О., Даль А.И., Акатов В.С., Фадеева И.С.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ ОСМОТИЧЕСКИМ ШОКОМ И ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТОМ НАТРИЯ НА БИОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ФИКСИРОВАННЫХ КСЕНОПЕРИКАРДИАЛЬНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ СЕРДЕЧНО- СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ	84
<i>Ромшин А.М., Осипов А.А., Попова И.Ю., Цеев В.Э., Власов И.И.</i> ПРЯМОЕ ИЗМЕРЕНИЕ АЛМАЗНЫМ МИКРОТЕРМОМЕТРОМ ТЕМПЕРАТУРНОГО ПРОФИЛЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА МЫШЕЙ	87
<i>Сенотов А.С., Кобякова М.И., Краснов К.С., Фадеев Р.С.</i> ВЫЯВЛЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ОМЛ К TRAIL-ИНДУЦИ- РОВАННОЙ ГИБЕЛИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАНСКРИПТОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	90
<i>Самохвалова Т.В., Корыстова А.Ф., Кублик Л.Н., Шапошникова В.В., Корыстов Ю.Н.</i> (+)-КАТЕХИН И ГАЛЛАТ ИНИЦИИРУЮТ ОКИСЛИТЕЛЬ- НЫЙ СТРЕСС В АОРТЕ КРЫС	92
Смолянинов В.В. , <i>Потапова Т.В., Асланиди К.Б.</i> ПРИНЦИПЫ УПРАВЛЕНИЯ В СИСТЕМЕ КЛЕТОК, СВЯЗАННЫХ ПРОНИЦАЕМЫМИ КОНТАКТАМИ	93
<i>Соловьева М.Е., И. Одиноква И.В., Крестинина О.В., Бабурина Ю.Л., Ломовская Я.В., Шаталин Ю.В., Акатов В.С.</i> МОЖНО ЛИ АКТИВИРОВАТЬ ВЗАИМНОЕ УНИЧТОЖЕНИЕ РАКОВЫХ КЛЕТОК?.....	95
<i>Тараховский Ю.С.</i> АВТОСТОПОМ В КЛЕТКУ: КОМПЛЕКСЫ ФЛАВОНОИДОВ С ПЕРЕХОДНЫМИ МЕТАЛЛАМИ МОГУТ ПРОНИКАТЬ СКВОЗЬ МЕМБРАНЫ В ЦИТОПЛАЗМУ	97
<i>Фомкина М.Г., Литвинова Е.Г.</i> ИЗУЧЕНИЕ РАБОТЫ ПРОТОЧНОЙ МОДЕЛЬ- НОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЧИСТКИ КРОВИ ОТ МОЧЕВИНЫ	99
<i>Хижняк Е.П. и Хижняк Л.Н.</i> ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИНИА- ТЮРНЫХ МАТРИЧНЫХ ИК КАМЕР, РАБОТАЮЩИХ ПОД УПРАВЛЕ- НИЕМ СМАРТФОНОВ, В МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ. ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ.....	102
<i>Хмель Н.В., Павлик Л.Л., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д., Миронова Г.Д.</i> УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МИТО- ХОНДРИЯХ СЕРДЦА КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ.....	104
<i>Храмов Р.Н., Заломова Л.В., Фесенко Е.Е.(мл.)</i> ФОТОБИОМОДУЛЯЦИЯ МИКРО- БИОТЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА <i>IN VITRO</i> С ПОМОЩЬЮ КРАСНОГО И БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ.....	108
<i>Чуев Г.Н., Федотова М.В., Морозов Д.</i> МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ С БИОМАКРОМОЛЕКУЛАМИ МЕТОДОМ ФУНКЦИОНАЛА ПЛОТНОСТИ: <i>QUO VADIS?</i>	111

<i>Шаталин Ю.В., Шубина В.С., Соловьева М.Е., Акатов В.С.</i> РАЗЛИЧИЯ В РЕДОКС РЕАКЦИЯХ АКВА- И ЦИАНОКОБАЛАМИНОВ С ТИОЛАМИ И АСКОРБАТОМ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ	112
<i>Шаталин Ю.В., Шубина В.С., Шацаускас А.Л., Черненко С.А., Костюченко А.С., Фисюк А.С.</i> НОВЫЙ КЛАСС ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ОКРАШИВАНИЯ ТКАНИ	114
<i>Шляпников Ю.М., Малахова Е.А., Шляпникова Е.А.</i> УЛЬТРАЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ РАКОВО-СЕТЧАТОЧНЫХ АНТИГЕНОВ ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ УРОЛОГИЧЕСКИХ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ	116

РАДИОЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА АИКАР

Абдуллаев С.А.^{1,2}

¹ ФГБУН ИТЭБ РАН, Пушкино, Россия.

² ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия.

e-mail: 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 удастся достичь с помощью фармакологических соединений разного класса. Среди них значительный интерес представляет 5-аминоимидазол-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.

В исследовании использовались самцы мышей линии Balb/c 2-х месячного возраста и самцы крыс линии Fisher-344 3-х месячного возраста, полученные из питомника филиала Института биоорганической химии РАН (Пушино,

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 внутривентрально 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 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-яДНК 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).

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

НОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ АММИАК-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГЕПАТОЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Алилова Г.А., Тихонова Л.А., Косенко Е.А.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: i@alilova-g.ru

Болезни печени находятся на одном из первых мест по распространенности и в настоящее время являются пятой по частоте причиной смерти во многих развитых странах [1, 2]. Общим осложнением острых и хронических забо-

леваний печени является гепатоэнцефалопатия (ГЭ), которая характеризуется умственными расстройствами различной степени: от смятения и замешательства до агнозии и деменции [3]. Конечной стадией ГЭ является кома, которая, как правило, приводит к смерти.

Доказано, что пусковым механизмом в развитии ГЭ является накопление аммиака в крови (гипераммониемия) вследствие нарушения детоксикационной функции печени или образования портокавальных анастомозов, позволяющих крови, оттекающей из желудочно-кишечного тракта, минуя печень (то есть без очищения в печени) попадать в общую циркуляцию, что позволяет аммиаку беспрепятственно проникать в мозг и накапливаться в разных его структурах. Патогенетические механизмы дисфункции головного мозга при ГЭ, вызванной накоплением аммиака, до сих пор полностью не выяснены.

В нашей лаборатории впервые было показано, что токсическое действие аммиака на мозг опосредовано гиперактивацией глутаматных НМДА-рецепторов (НМДА-Р) [4], запускающих каскад патологических биохимических реакций в головном мозге, который в частности связан с развитием окислительного стресса. Долгое время считалось, что функциональные глутаматные НМДА-рецепторы характерны только для клеток центральной нервной системы. Однако сравнительно недавно эти рецепторы были обнаружены во многих тканях и органах (и соответственно проведена экспрессия генов, ответственных за их синтез), что давало возможность предположить, что ГЭ, сопровождающаяся гипераммониемией, является системным заболеванием, а не только болезнью мозга.

Чтобы подтвердить это предположение мы провели сравнительное исследование на различных тканях, имеющих глутаматные НМДА-рецепторы, таких как поджелудочная железа, сердце и печень гипераммониемированных крыс в присутствии мощного неконкурентного антагониста НМДА-рецепторов МК-801.

Было показано, что повышенный уровень аммиака в митохондриях, выделенных из печени, поджелудочной железы и сердца крыс с гипераммониемией, вызывает тканеспецифический окислительный стресс (определяемый по усиленной скорости образования O_2^- и H_2O_2 , и сниженной активности антиокислительных ферментов), который полностью предотвращается введением антагониста НМДА-Р МК-801.

Эти результаты подтверждают точку зрения о том, что патогенез ГЭ является многофакторным и что индуцированный аммиаком полиорганный окислительный стресс, опосредованный гиперактивацией НМДА-Р, является неотъемлемой частью заболевания, и, следовательно, токсические эффекты

аммиака при ГЭ являются генерализованными и более опасными, чем это считалось ранее.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богомолов П.О., Буеверов А.О., Мацевич М.В., Петраченко М.Ю., Воронкова Н.В., Коблов С.В., Кокина К.Ю., Безносенко В.Д., Федосова Е.В. Эпидемиология гепатита С в Московской области: данные регионального регистра и скрининга на антитела к HCV. // Альманах клинической медицины. 2016, 44 (6): 689—696.
2. Немцов А.В., Давыдов К.В., Разводовский Ю.Е. // Наркология. 2009. № 1. С. 52—60.
3. Munoz S.J. Hepatic encephalopathy // Med Clin North Am. 2008. V. 92. № 4. P. 795—812, viii.
4. Kosenko E., Tikhonova L., Alilova G., Montoliu C. Is NMDA-receptor-mediated oxidative stress in mitochondria of peripheral tissues the essential factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy? // J Clin Med. 2022. V. 11, № 3. P. 827.

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ОСТРОГО РАДИАЦИОННОГО ДЕРМАТИТА НА МЫШАХ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ЛОКАЛЬНЫМ ПРОТОННЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

Аникина В.А.¹, Сорокина С.С.¹, Замятина Е.А.¹, Шемяков А.Е.^{1,2}, Попова Н.Р.¹

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.

² Физический институт имени П. Н. Лебедева РАН, Протвино, Россия.

e-mail: viktoriya.anikina@list.ru

Источники ионизирующего излучения широко применяются в различных отраслях промышленности, медицины, науки и военных целях. Зачастую это может стать причиной развития радиационно-индуцированных повреждений кожи — радиационного дерматита (РД). К настоящему моменту нет специальных средств профилактики и лечения РД [1]. Поэтому актуальной задачей современной радиационной биомедицины является разработка специальных средств для профилактики и лечения радиационно-индуцированного поражения кожи. Однако для оценки эффективности таких средств нужна валидированная модель РД, индуцированного разными видами ионизирующего излучения (рентген, гамма, нейтроны, протоны), имеющие разную относительную биологическую эффективность в отношении кожи. Для рентгеновского и гамма-излучений подобные модели уже были разработаны и валидированы в других исследованиях [2, 3]. В случае с протонным излучением, валидированная модель радиационного дерматита отсутствует. В связи с чем, целью данного

исследования является разработка и валидация модели острого радиационного дерматита на мышах, индуцированная локальным протонным излучением.

Валидированная модель радиационного дерматита должна учитывать следующие требования:

- 1) воспроизводимость не менее 90%;
- 2) расположение пика энерговыведения моноэнергетического пучка протонов непосредственно на коже животного;
- 3) отсутствие долгого латентного периода (менее 2 недель);
- 4) стадийность формирования радиационного дерматита.

Для разработки экспериментальной модели радиационного дерматита использовали самцов белых мышей SHK (8–9 нед). Эксперименты проводились в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Животные были разделены на 6 групп по 15 голов (таблица).

Таблица

Экспериментальные группы

<i>№ группы</i>	<i>Количество голов, n</i>	<i>Доза, Гр</i>	<i>Энергия пучка, МэВ</i>	<i>Площадь пучка, мм</i>	<i>Депиляция</i>
1	15	0	—	—	—
2	15	0	—	—	+
3	15	30	87,8	8×8	—
4	15	30	87,8	8×8	+
5	15	40	88,5	8×8	—
6	15	40	88,5	8×8	+

За сутки до облучения животным в группах № 2, 4 и 6 удаляли волосяной покров (2×2 см) с дорсальной стороны тела с помощью бритвенного станка (кожные реакции не выявлены). Для обездвиживания, непосредственно перед облучением, животные были наркотизированы внутрибрюшинным введением комбинации препаратов «Золетил 100» и «Ксила». Далее животных фиксировали на специально подготовленной конструкции из медицинского термопластика и подвергали однократному локальному протонному излучению с дорсальной стороны тела в дозе от 30 до 40 Гр (энергия — 87,5 МэВ; площадь пучка — 0,8 см; длительность облучения — 2 мин). Облучение проводили в комплексе протонной терапии «Прометеус» ФТЦ ФИАН (г. Протвино), который представляет собой высокотехнологическую медицинскую установку российского производства для лечения новообразований у онкологических больных с использованием методики дистанционной радиационной терапии.

Клинический осмотр каждого животного проводили ежедневно в течение 90 суток с момента облучения с целью фотофиксации и регистрации клинических

проявлений радиационного дерматита. Для оценки тяжести радиационно-индуцированного повреждения кожи использовали классификацию The Radiotherapy Oncology Group (RTOG). Так же велась фиксация основных жизненных показателей экспериментальных животных, а именно двигательная активность, динамика веса, изменения основных показателей крови (WBS, Lym, Gran, Mid и PLT) и выживаемость, по которым можно судить о состоянии жизненно важных систем и (или) функций организма в ответ на локальное протонное излучение.

Было оценено влияние наличия или отсутствия волосяного покрова у животных. В группах с сохранением волосяного покрова (№ 3, 5), после облучения наблюдалась алопеция. В группах № 3 и № 5 было отмечено увеличение латентного периода в 2 раза по сравнению с группами № 4 и № 6, у которых волосяной покров был удалён. Кроме того, в группах № 3 и № 5 отмечали более лёгкую степень радиационного дерматита (II—III) по сравнению с группами № 4 и № 6, у которых были выявлены тяжёлые кожные реакции в ответ на протонное излучение соответствующие IV степени согласно классификации RTOG.

Проверку фактического положения пика и оценку поглощенной дозы оценивали при помощи радиохромной пленки EBТ3 и комплекса дозиметрического оборуования РТW. Пик энерговыделения должен был приходиться непосредственно на кожу животного (0,5 мм) и не затрагивать жировую клетчатку. Таким требованиям соответствовала энергия пучка 87,8 МэВ, при большой энергии пик приходился на более глубокие слои кожи, что приводило к формированию радиационного дерматита последней IV степени, лечение которой без хирургического вмешательства невозможно.

После однократного локального облучения в дозе от 30 до 40 Гр и энергии пучка от 87,8 до 88,5 МэВ в группах № 3—6 у всех животных (100%) было отмечено радиационно-индуцированное поражение кожи, соответствующее II—IV степени, согласно классификации RTOG. Кроме того, во всех группах отмечена 100% выживаемость и изменения жизненных показателей экспериментальных групп (№ 3—6) не отличаются от таковых у контрольных групп (№ 1, № 2), что говорит о том, что после воздействия однократного локального протонного излучения не были затронуты жизненно важные органы и системы. Латентный период во всех группах не превышал 2 недели (6—12 суток). Таким образом, разработанная модель радиационного дерматита соответствует всем требованиям, предъявляемым к валидированной модели, и может быть использована для исследования специальных средств профилактики и лечения радиационного дерматита.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-63-00082.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стандарт медицинской помощи больным с радиационным дерматитом лучевым утвержден приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 6 июля 2006 года № 523.
2. *Brunchukov V., Astrelina T., Uzupzhanova D. et.al.* Evaluation of the Effectiveness of Mesenchymal Stem Cells of the Placenta and Their Conditioned Medium in Local Radiation Injuries // *Cells* 2020, vol. 9(12), p.2558.
3. *Гребенюк А.Н., Легеза В.И., Заргарова Н.И., Владимирова О.О.* Способ моделирования сочетанных радиационных поражений, включающих общее гамма- и местное бета-облучение / Патент # 2534802 С1 Российская Федерация, МПК G09В 23/28 (2006.01): № 013136243/14: заявл. 01.08.2013: опубликовано 10.12.2014 — 9 с.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОЛИЗИНА БАКТЕРИОФАГА RB49

Аркаелян А.Г.¹, Микулинская Г.В.², Прохоров Д.А.¹

- ¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.
- ² Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ФИБХ РАН), Пушкино, Россия.

e-mail: arkatsachndir@gmail.com

Пептидогликангидролазы — ферменты, способные разрушать основной компонент клеточных стенок бактерий (пептидогликан), устойчивый к другим ферментам благодаря присутствию в составе пептидогликана неканонических аминокислот. Эндолизин бактериофага RB49 (EndoRB49) из подсемейства пептидаз M15_C представляет собой термоустойчивый белок и выдерживает прогрев до 90 °С, ренатурируя при последующем охлаждении 77% вторичной структуры [1]. Кроме того, он обладает широкой бактериоспецифичностью: способен успешно разрушать клеточные стенки не только *Escherichia coli*, являющейся хозяином фага, но и клеточные стенки бактерий родов *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Cellulomonas*, которые имеют различное строение пептидогликана и его химические модификации (амидирование) [2]. Таким образом, EndoRB49 может рассматриваться в качестве деградирующего бактерии агента для использования в биотехнологии. Изучение структуры белка в растворе и механизма его функционирования поможет расширить возможности его практического применения.

Структура EndoRB49 на данный момент не установлена. Единственный структурно охарактеризованный в нашей лаборатории [3] гомолог — эндолизин фага T5 — имеет кальций связывающую петлю, а уровень сходства с

EndoRB49 по аминокислотной последовательности не превышает 40% [4]. Между тем, установление структуры белка в растворе в условиях естественного для функционирования фермента окружения поможет не только понять закономерности сворачивания и поддержания функционально активной формы EndoRB49, но и выяснить механизм катализа и основы субстратной и бактериоспецифичности пептидаз этой группы. Исследуемый эндолизин является глобулярным ферментом. Интересно, что в отличие от эндолизинов модулярной структуры, где связывание субстрата и катализ выполняют разные домены белка, у EndoRB49 обе функции осуществляются одной глобулой, конкретные механизмы такого функционального совмещения не установлены.

Целью настоящей работы является исследование структуры эндолизина бактериофага RB49. Для решения этой задачи был проведен ряд ^1H , ^{13}C , ^{15}N многомерных ЯМР-экспериментов. В результате анализа полученных данных для фермента EndoRB49 с помощью программы CARA [7] было выполнено отнесение более 90% сигналов ^1H ; ^{13}C ; ^{15}N . С помощью программ CYANA 2.1 [5—6] и MolMol [8] была рассчитана и визуализирована предварительная пространственная структура, изображенная на рисунке 1 и имеющая характерный для подсемейства пептидаз M15_C мотив укладки полипептидной цепи. EndoRB49 представляет собой преимущественно альфа-спиральный белок; отдельные участки полипептидной цепи имеют вид бета-листов.

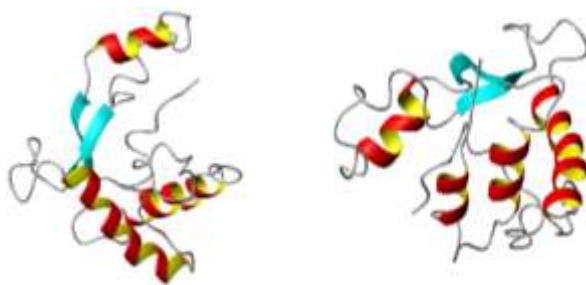


Рисунок. Предварительная пространственная структура эндолизина бактериофага EndoRB49

Анализ совокупности данных показал, что стандартного ЯМР-эксперимента для отнесения ароматических аминокислотных остатков (2D CBHDar) недостаточно для однозначного отнесения сигналов радикалов ароматических остатков Phe, Trp и His, что ухудшает качество предварительной структуры. В дальнейшем для получения однозначного отнесения резонансов радикалов ароматических остатков в EndoRB49 планируется провести допол-

нительные ЯМР-эксперименты: 2D (H)CB(CGCC-TOCSY)Har и 3D Har(CC-TOCSY-CGCBACSO)NH.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИТЭБ РАН № 075-01025-23-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Mikoulińska G.V., Chernyshov S.V., Shavrina M.S., Molochkov N.V., Lysanskaya V.Y., Zimin A.A.* Two novel thermally resistant endolysins encoded by pseudo T-even bacteriophages RB43 and RB49 // *J Gen Virol.* 2018 Mar; 99 (3): 402—415. doi: 10.1099/jgv.0.001014.
2. *Shadrin V.S., Machulin A.V., Dorofeeva L.V., Chernyshov S.V., Mikoulińska G.V.* (2020) Lysis of cells of diverse bacteria by 1,d -peptidases of Escherichia coli bacteriophages RB43, RB49 and T5 // *Journal of Applied Microbiology*, <https://doi.org/10.1111/jam.14910>.
3. *Prokhorov D.A., Mikoulińska G.V., Molochkov N.V., Uversky V.N. and Kutysenko V.P.* High-resolution NMR structure of a Zn²⁺-containing form of the bacteriophage T5 L-alanyl-D-glutamate peptidase // *RSC Adv.*, 2015, 5, 41041—41049. <https://doi.org/10.1039/C5RA05993C>.
4. *Kutysenko V.P., Prokhorov D.A., Mikoulińska G.V. et al.* 2020. Comparative analysis of the active sites of orthologous endolysins of the Escherichia lytic bacteriophages T5, RB43, and RB49 // *International Journal of Biological Macromolecules*, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.264>.
5. *Güntert P.* Automated NMR structure calculation with CYANA // *Methods Mol Biol.* 2004; 278:353—378. doi:10.1385/1-59259-809-9:353.
6. *Güntert P., Buchner L.* Combined automated NOE assignment and structure calculation with CYANA // *J Biomol NMR*, 2015, 62, 453—471. <https://doi.org/10.1007/s10858-015-9924-9>.
7. *Keller, Rochus* (2004): *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial* ISBN 3-85600-112-3, first edition.
8. *Reto Koradi, Martin Billeter, Kurt Wüthrich.* MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures // *Journal of Molecular Graphics*, V. 14, Issue 1, 1996, P. 51—55, ISSN 0263-7855, [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00009-4](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00009-4).

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ НИКУЮЩЕЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ Cys free Nt.*Bsp*D6I

Артюх Р.И., Антипова В.Н., Перевязова Т.А., Юнусова А.К.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.
e-mail: sernur@mail.ru

Никующая эндонуклеаза Nt.*Bsp*D6I (никаза) относится к ферментам системы рестрикции–модификации. Узнает на дцДНК специфическую последовательность 5'-GAGTC и вносит разрыв только в одну цепь ДНК, с образова-

нием ника на расстоянии 4-х нуклеотидов от сайта [Perevyazova et al., 2003, Rogulin et al., 2004]. Никаза является большой субъединицей (70 кДа) гетеродимерной эндонуклеазы рестрикции *R.BspD6*, которая относится к новому типу гетеродимерных эндонуклеаз рестрикции, впервые выявленная нами [Yunusova et al., 2006].

В данной работе представлен структурный анализ молекулы никазы Cys free Nt.BspD6I, в которой четыре остатка цистеина заменены на серин. Два остатка цистеина (Cys11 и Cys160) расположены в N-узлающем домене и два (Cys508 и Cys578) в C-каталитическом домене [Качалова, 2008]. Расположение цистеинов в структуре никазы позволяет определить их влияние как на связывание дцДНК, так и на её гидролиз. Белок Cys free Nt.BspD6I был закристаллизован методом диффузии паров сидячей капли и определена его пространственная структура.

Сопоставление структур wt никазы и Cys free Nt.BspD6I путем их наложения выявило заряженные аминокислотные остатки в молекуле Cys free Nt.BspD6I, боковые группы шести аминокислотных остатков значительно изменили свою конформацию. В результате чего возникли четыре новых электростатических взаимодействия, три из которых в C-омеде, что проявляется в изменении электростатического поля в этой области молекулы.

В результате замен C508S и C578S в C-каталитическом домене возникают заметные конформационные изменения в области этих мутаций, которые проявляются в изменении электростатического поля в этой области молекулы.

В кристаллической структуре Cys free Nt.BspD6I отсутствует электронная плотность N-концевого аминокислотного остатка 1 и остатков 59—67 и 212—221, локализованных в петлях.

Наложение кристаллических структур wt никазы и ее мутантной формы демонстрирует их хорошее совпадение (RMSD (C α) = 0.256), однако присутствует значительный всплеск RMSD (до 2.5 Å) в области N-концевого узлающего домена, преимущественно в субдомеде D2. В остальной части структур смещения атомов не превышают 0.5 Å.

Смещение атомов привело к образованию новых контактов в Cys free Nt.BspD6I, что отслеживалось по изменению площади междоменных контактов.

Разворот и смещение NH₂-групп некоторых аминокислотных остатков относительно их положения в wt никазе привел к образованию дополнительных водородных связей, тем самым увеличивая площадь контакта между доменами. Кроме смещения атомов наблюдается и поворот карбоксильных групп вокруг связи C₇—C₈. Положения OH-групп Ser11 и Ser160 практически совпадают с положением SH-групп Cys11 и Cys160 в wt nickase.

Сравнительный структурный анализ показал, что замена цистеинов индуцирует заметные конформационные изменения в области N-домена (узнающего) и C-домена (каталитического), в результате которых образуется три новых водородных связи и изменяется электростатическое поле в этих областях по сравнению с wt Nt.BspD6I.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kachalova G.S., Rogulin E.A., Yunusova A.K., Artyukh R.I., Perevyazova T.A., Matvienko N.I., Zheleznyaya L.A., Bartunik H.D.* 2008. Structural analysis of the heterodimeric type IIS restriction endonuclease R.BspD6I acting as a complex between a monomeric site-specific nickase and a catalytic subunit // *J. Mol. Biol.* 384,489—502.
2. *Perevyazova T.A., Rogulin E.A., Zheleznyaya L.A., Matvienko N.I.* 2003. Cloning and Sequencing of the Gene of Site-Specific Nickase N.BspD6I // *Biochemistry (Mosc)*. 68, 984—987.
3. *Rogulin E.A., Perevyazova T.A., Zheleznyaya L.A., Matvienko N.I.* 2004. Plasmid pRARE as a Vector for Cloning to Construct a Superproducer of the Site-Specific Nickase N.BspD6I // *Biochemistry (Mosc)*. 69, 1123—1127.
4. *Yunusova A.K., Rogulin E.A., Artyukh R.I., Zheleznyaya L.A., Matvienko N.I.* 2006. Nickase and a protein encoded by an open reading frame downstream from the nickase BspD6I gene form a restriction endonuclease complex // *Biochemistry J.* 71, 815—820.
5. *Artyukh R.I., Fatkhullin B.F., Kachalova G.S., Antipova V., Zheleznyaya L.A., Yunusova A.K., Perevyazova T.A.* Structural Analysis of Cysteine free Nt.BspD6 Nicking Endonuclease and Its Functional Features // *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2022. Mar 1; 1870(3):140756.

ИССЛЕДОВАНИЕ АМИЛОИДНОЙ АГРЕГАЦИИ МУЛЬТИДОМЕННОГО ГИГАНТСКОГО БЕЛКА ТИТИНА

*Бобылёва Л.Г.¹, Урюпина Т.А.¹, Молочков Н.В.¹, Тимченко А.А.²,
Тимченко М.А.¹, Пеньков Н.В.³, Галзитская О.В.^{1,2}, Вихлянцев И.М.¹,
Бобылёв А.Г.¹*

- 1 ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино.
- 2 ФГБУН Институт белка РАН, Пушкино.
- 3 Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

e-mail: bobylev1982@gmail.com

Накопление агрегированных форм белков в органах и тканях организма животных и человека приводит к нарушению функционирования клеток и последующей их гибели. Неправильное сворачивание белков и дальнейшая их агрегация — хорошо известный патологический процесс, который ассоцииро-

ван с такими заболеваниями как амилоидозы [1, 2]. К наиболее известным заболеваниям, связанным с амилоидной агрегацией белков, относятся амилоидозы почек, печени, селезенки, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, диабет II типа, прионные заболевания, а также системные амилоидозы [3—6]. Характерной чертой амилоидных фибрилл являются наличие четвертичной кросс- β -структуры [7, 8]. Благодаря этому амилоидные агрегаты имеют высокую прочность, приобретают устойчивость к воздействию различных химических растворителей, а также устойчивость к протеолитическому расщеплению. Исследовать структурные изменения белков при агрегации возможно только *in vitro*, однако при этом исследователи сталкиваются с методическими ограничениями при использовании разных методов для изучения амилоидных агрегатов, имеющих относительно большие размеры. Поэтому для получения наиболее полной информации о структурных изменениях в белках при их агрегации необходимо использовать максимально большой набор биофизических методов и подходов.

Открытие функциональных амилоидов несколько усложнило понимание роли процесса амилоидной агрегации. Функциональные амилоиды созданы природой для выполнения определенных биологических функций. Известны следующие белки, формирующие функциональные амилоидные агрегаты: курлин (curli, *E. Coli*), тафи (tafi, *Salmonella spp.*), чаплины (chaplins, *Streptomyces coelicolor*) [9—12], а также прионная форма белка СРЕВ [13]. Функциональные амилоиды обнаружены и в организме млекопитающих. Показано, что белок Ма (компонент Pmel17) человека формирует в меланосомах амилоидные агрегаты — каркас для связывания с меланином, что защищает клетки от повреждающего ДНК УФ-излучения [14, 15]. Чем патологические амилоидные агрегаты отличаются от функциональных остается загадкой. Высказывается предположение, что имеются различия на структурном уровне.

Объектом нашего исследования является мультидоменный гигантский белок титин (тайтин/коннектин) поперечно-полосатых и гладких мышц. Его наиболее высокомолекулярная изоформа, синтезируемая в саркомерах скелетных мышц, содержит 283 домена, большая часть которых (до 90%) является повторяющимися иммуноглобулин-подобными (Ig) и фибронектин III-подобными (FnIII) доменами с β -складчатой структурой. Известно, что данный белок склонен к агрегации. Ранее нами показана амилоидная природа этих агрегатов. Однако исходя из большого размера молекулы данного белка (около 1 микрометра), наличия S—S связей, маловероятным представляется полное раскрытие его доменов, что свойственно для многих белков при формировании четвертичной кросс- β -структуры в процессе амилоидной агрегации. Учи-

ывая это, мы предположили, что формирование амилоидных агрегатов титина происходит при частичном раскрытии отдельных его доменов. С целью проверки этого предположения, а также для выяснения структурных особенностей агрегатов мультидоменного мышечного белка титина был исследован процесс агрегации этого белка с использованием электронной, атомно-силовой микроскопии и различных методов структурного анализа: рентгеновской дифракции, синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния, кругового дихроизма, инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье, дифференциальной сканирующей калориметрии, а также динамического светорассеяния. Обнаружено, что титин в течение относительно коротких временных интервалов (менее одного часа) агрегирует с образованием крупных агрегатов (частицы с гидродинамическим радиусом 1000 нм), имеющих четвертичную кросс- β структуру. Показана обратимость амилоидной агрегации титина, что не свойственно для других амилоидов. Еще одной особенностью агрегатов титина является отсутствие изменений во вторичной структуре, что показано методами инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье и кругового дихроизма. По данным электронной и атомно-силовой микроскопии амилоидные агрегаты титина представляли аморфные структуры. Это интересно с той точки зрения, что до недавнего времени считалось, что аморфные агрегаты белка не могут являться амилоидными. Только недавно появились работы, свидетельствующие о возможности формирования аморфных амилоидных агрегатов [16,17]. Показано, что при таком типе агрегации происходит не полный, а частичный анфолдинг. Таким образом, литературные данные и наши результаты подтверждают предположение, что при агрегации титина происходит частичный анфолдинг отдельных его доменов. По-видимому, такой путь формирования амилоидов является единственно возможным для титина.

Наши данные расширяют представления о механизмах амилоидной агрегации белков, что имеет большое фундаментальное значение. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 22-24-00805).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Dobson C.M.* Protein folding and misfolding // *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):884-90.
2. *Rousseau F., Schymkowitz J., Itzhaki L.S.* (2012) Implications of 3D domain swapping for protein folding, misfolding and function // *Adv. Exp. Med. Biol.*, 747, 137—152.
3. *Knowles T.P., Vendruscolo M., Dobson C.M.* (2014) The amyloid state and its association with protein misfolding diseases // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15(6), 384—396.

4. *Dobson C.M.* (2004) Experimental investigation of protein folding and misfolding // *Methods.*, 34(1), 4—14.
5. *Buxbaum J.N. Linke R.P.* (2000) A molecular history of the amyloidosis // *J. Mol. Biol.*, 421(2-3), 142—159.
6. *Dobson C.M.* (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin // Cell Dev. Biol.*, 15(1), 3—16.
7. *Sunde M. Serpell L.C. Bartlam M. Fraser P.E., Pepys M.B., Blake C.C.* (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction // *J. Mol. Biol.*, 273(3), 729—739.
8. *Nelson R. Eisenberg D.* (2006) Recent atomic models of amyloid fibril structure // *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 16(2), 260-265.
9. *Olsen A., Jonsson A. and Normark S.* (1989) Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli* // *Nature*, 338, 652—655.
10. *Rçmiling U., Bian Z., Hammar M., Sierralta W.D. and Normark S.* (1998) Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to open structure and regulation // *J. Bacteriol.*, 180, 722—731.
11. *Otzen D., Nielsen P.H.* (2008) We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid // *Cell Mol. Life Sci.*, 65(6), 910—27.
12. *Claessen D., Rink R., de Jong W., Siebring J., de Vreughd P., Boersma F.G.H., Dijkhuizen L. and Wçsten H.A.B.* (2003) A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils // *Genes Dev.* 17, 1714—1726.
13. *Si K., Lindquist S.L. and Kandel E.R.* (2003) A neuronal isoform of the alypsia CPEB has prion-like properties // *Cell*, 115, 879—891.
14. *Fowler D.M., Koulov A.V., Alory-Jost C., Marks M.S., Balch W.E. and Kelly J.W.* (2005) Functional amyloid formation within mammalian tissue // *PLoS Biol.* 4, 1—8.
15. *Berson J. F., Theos A.C., Harper D.C., Tenza D., Raposo G. and Marks M.S.* (2003) Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis // *J. Cell. Biol.* 161, 521—533.
16. *Krebs M.R.H., Devlin G.L., and Donald A.M.* Amyloid fibril-like structure underlies the aggregate structure across the pH range for beta-lactoglobulin. // *Biophys. J.*, vol. 96, № 12, p. 5013–9, Jun. 2009.
17. *de Jongh H.H.J., Gröneveld T., de Groot J.* Mild isolation procedure discloses new protein structural properties of β -lactoglobulin // *J. Dairy Sci.* 2001; 84:562—571.

ВКЛАД НАРУЖНОЙ ЧАСТИ БЛЕДНОГО ЯДРА В ОСЦИЛЛЯТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ МОТОРНЫХ НЕЙРОСЕТЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Бражник Е.С.¹, Шубина Л.В.¹, Мысин И.Е.¹, Попова Л.Б.², Новиков Н.И.¹

¹ ФГБУЦ, Институт Теоретической и экспериментальной биофизики, Пущино, Россия.

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

e-mail: nikolay_novikov@hotmail.com

Болезнь Паркинсона (PD) — прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, обусловленное утратой дофаминергической иннервации базальных ганглиев, что приводит к нарушениям контроля мышечной активности, движений и баланса тела. Аберрантную синхронную осцилляторную активность (бета-осцилляции) в моторных нейросетях при дефиците DA связывают с возникновением двигательных нарушений при PD, а так же в экспериментальных моделях паркинсонизма [1—4]. Источники и механизмы развития двигательных нарушений не ясны. Внешний отдел бледного шара (GPe) является ключевым ядром нейросети BG, контролирующей локомоторную функцию. Несмотря на клиническую значимость GPe в контроле движений, информация о его вкладе в аномальную активность нейронных сетей и моторную дисфункцию при PD ограничена [5, 6].

На экспериментальной модели PD нами изучено участие GPe в процессах возникновения и распространения аномальной синхронизированной осцилляторной ЛПП активности в моторных нейросетях, которая появляется после повреждения DA-синтезирующих клеток SNc. Показано, что активность MCx и ядер BG, включая GPe, в норме не синхронизована, что обеспечивает координированную работу моторных нейросетей, контролирующую локомоцию. Утрата DA при PD сопровождается появлением аберрантных когерентных осцилляций в MCx, GPe и других ядрах BG и приводит к нарушению локомоции. Установлено, что активность ЛПП в GPe у животных с DA-дефицитом представлена по крайней мере двумя частотными диапазонами — бета (30—36 Гц) и гамма (50—56 Гц), что указывает на наличие в GPe отдельных групп нейронов, контролирующих движение в норме и при развитии аномальной активности в моторных нейросетях при PD [7]. Бета-осцилляции, которые предположительно связаны с развитием брадикинезии и мышечной ригидности при PD, имеют наибольшую мощность в MCx и SNr, а в GPe и dStr их мощность существенно ниже, что предполагает минимальную роль последних двух ядер в передаче бета-ритма в моторных нейросетях. Патологиче-

ская когерентная 50—56 Гц гамма-активность, регистрируемая в GPe, dStr и mPFC, но не в MCx и SNr, может быть характеристикой состояния PFC-стриопаллидарной моторной нейросети, и связана с развитием специфических двигательных симптомов при PD (акинезия, застывание). Стимуляция DA-рецепторов леводопой устраняла синхронизацию в нейросетях полушарий с DA-дефицитом и восстанавливала нормальную локомоцию, что указывает на возможную связь этих ритмов с нарушением двигательной функции у животных с PD. Наличие бета- и гамма-осцилляторной ЛПП активности в полушариях с DA-дефицитом свидетельствует о сложной организации моторных нейросетей, контролирующих в норме различные аспекты локомоции. Представленные результаты показывают, что при дефиците дофамина меняется баланс в функционировании отдельных элементов нейронных сетей, включающих различные отделы неокортекса и ядер BG, что ведет к возникновению и распространению аберрантных когерентных осцилляций.

Нами также исследованы эффекты локальной блокады синаптических входов GPe и торможение активности GPe агонистом GABA-A-рецепторов, мусцимолем, на выраженность аномальных ритмов и способность к восстановлению двигательной функции у крыс в экспериментальной модели PD. Установлено, что торможение активности GPe, мусцимолем или ее повышение пикротоксином, а также блокада глутаматергических входов GPe вызывали длительное снижение мощности ЛПП в бета-частотном диапазоне в MCx и SNr и восстановление нормальной локомоции. Выявление критических компонентов моторных нейросетей, участвующих в развитии двигательных нарушений при PD, и модуляция их активности при микроинъекциях специфических антагонистов/агонистов или хемотропическими методами позволит в перспективе разработать новые подходы к лечению болезни Паркинсона.

Сокращения: PD — Болезнь Паркинсона; DA — дофамин; GPe — наружное ядро бледного шара; BG — базальные ганглии; SNC, SNr — черная субстанция; MCx — моторная кора; dStr — дорсальный отдел полосатого тела; PFC — медиальная префронтальная кора; GABA-A — ГАМК_A-рецептор; ЛПП — локальный полевой потенциал.

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. *Kita H.* (2007). Globus pallidus external segment // *Prog. Brain Res.* 2007. 160: 111—133.
6. *Hegeman D.J., Hong E.S., Hernández V.M., Chan C.S.* The external globus pallidus: progress and perspectives // *Eur J Neurosci.* 2016 May;43(10):1239-65.
7. *Morozova M.V., Brazhnik E.S., Mysyn I.E., Popova L.B., Novikov N.I.* The Contribution of the external globus pallidus to the basal ganglia oscillatory activity in an experimental model of Parkinson's disease // *Neurosci. Behavior. Physiol.* 2022. 52(7): 1061-72.

АНАЛИЗ РАСПОЛОЖЕНИЯ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ БЕЛКА АКТИНА, ПРИВОДЯЩИХ К НЕМАЛИНОВОЙ МИОПАТИИ

Галзитская О.В.^{1,2}, Бобылёва Л.Г.², Глякина А.В.^{1,3}

- ¹ Институт белка РАН, Пущино, Россия.
- ² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.
- ³ Институт математических проблем биологии РАН — филиал Института прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН, Пущино, Россия.

e-mail: ogalzit@vega.protres.ru

Было рассмотрено 78 мутаций белка актина, которые вызывают заболевание немалиновая миопатия. Эти мутации были взяты из базы данных uniprot (<https://www.uniprot.org>, P68133 ACTS_HUMAN). Оказалось, что эти мутации расположены по всему белку. Тогда мы проанализировали, как эти мутации распределены в важных областях структуры актина (ядро сворачивания, остов филамента, амилоидогенные области, неупорядоченные области, области, участвующие во взаимодействии с другими белками). А также посмотрели, повлияет ли введение точечных одиночных мутаций на амилоидогенность актина.

Ядро сворачивания (Ф-величины), амилоидогенные и неструктурированные области были рассчитаны с помощью программ FoldNucleus (<http://bioinfo.protres.ru/foldnucleus/>) [1, 2], FoldAmyloid (<http://bioinfo.protres.ru/fold-amyloid/>) [3] и IsUnstruct (<http://bioinfo.protres.ru/IsUnstruct/>) [4], соответственно. Аминокислотные остатки, входящие в остов филамента и участвующие во взаимодействиях с другими белками, были определены согласно работам [5] и [6].

Из анализа следует, что 54 мутации (43 остатка) попадают в ядро сворачивания ($\Phi \geq 0.5$), 11 мутаций (10 остатков) — в остов филамента, 14 мутаций (11 остатков) — в амилоидогенные области, 14 мутаций (9 остатков) — в не-

структурированные области, 24 мутации (22 остатка) — в области, участвующие во взаимодействии с другими белками. Также было показано, что только 20 точечных одиночных мутаций из 78 изменяют амилоидогенность актина: 13 увеличивают, а 7 уменьшают. Стоит отметить, что одиночные мутации G44V, V45F, T68I, P72R, K338I и S350L приводят к появлению нового амилоидогенного участка, которого нет в нативном белке. А одиночная мутация R374S приводит к полному исчезновению амилоидогенного участка, который есть в нативном белке.

Таким образом, наибольшее количество мутаций (54 из 78) попадает в ядро сворачивания белка. Из этого следует, что эти мутации важны, так как могут влиять на скорость сворачивания белка. Также было показано, что почти все рассмотренные мутации (кроме четырёх H75L, H75R, D156N и A172G) входят в одну или сразу в несколько областей (ядро сворачивания, остов филамента, амилоидогенные области, неупорядоченные области, области, участвующие во взаимодействии с другими белками) в структуре белка актина [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Galzitskaya O.V., Finkelstein A.V. (1999) A theoretical search for folding/unfolding nuclei in three-dimensional protein structures. *Proc Natl Acad Sci* 96:11299–11304.
2. Pereyaslavets L.B., Sokolovsky I.V., Galzitskaya O.V. (2015) FoldNucleus: web server for the prediction of RNA and protein folding nuclei from their 3D structures // *Bioinformatics* 31:3374—3376.
3. Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Yu., Galzitskaya O.V. (2010) FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence // *Bioinformatics* 26:326—332.
4. Lobanov M.Y., Sokolovskiy I.V., Galzitskaya O.V. (2013) IsUnstruct: prediction of the residue status to be ordered or disordered in the protein chain by a method based on the Ising model // *J Biomol Struct Dyn* 31:1034—1043.
5. Glyakina A.V., Surin A.K., Grishin S.Yu., Selivanova O.M., Suvorina M.Yu., Bobyleva L.G., Vikhlyantsev I.M., Galzitskaya O.V. (2020) New Model for Stacking Monomers in Filamentous Actin from Skeletal Muscles of *Oryctolagus cuniculus* // *Int J Mol Sci* 21:8319.
6. Tikhomirova T.S., Ievlev R.S., Suvorina M.Yu., Bobyleva L.G., Vikhlyantsev I.M., Surin A.K., Galzitskaya O.V. (2018) Search for Functionally Significant Motifs and Amino Acid Residues of Actin // *Mol Biol* 52:118—135.
7. Glyakina A.V., Galzitskaya O.V. Structural and functional analysis of actin point mutations leading to nemaline myopathy to elucidate their role in actin function // *Biophysical Reviews*, 14:1527—1538 (2022).

САМОПОДДЕРЖИВАЮЩИЙСЯ ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У ОБЛУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ ЯВЛЯЕТСЯ ФАКТОРОМ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПОСТРАДАЦИОННОЙ ЛЕТАЛЬНОСТИ

Глухов С.И.^{1,2*}, Абдуллаев С.А.^{1,3}, Газиев А.И.¹

¹ ФГБУН ИТЭБ РАН, Пушкино, Россия.

² ФГБУН ИЯИ РАН, Троицк (Москва), Россия.

³ ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия.

* e-mail: serglukhovmb@gmail.com

Выяснение природы радиорезистентности живых организмов актуально в области радиологии и космобиологии для целей развития лучевой терапии, организации пилотируемых миссий при освоении космоса, а также для защиты населения от последствий радиационных катастроф. **Целью** данной работы была оценка роли мелатонина в качестве радиозащитного/радиомитигаторного агента. Было проведено облучение лабораторных животных (мышей) рентгеновскими лучами в дозах 5 и 9 Гр. В качестве радиопротектора (однократное, превентивное пероральное введение) или радиомитигатора (продолжительное пострадиационное введение) был использован мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин), — гормон сна, сигнальная молекула и митохондриальный антиоксидант. Уровень окислительного стресса в коре головного мозга и селезенке бы оценен по флуоресценции окисленного дигидрохлорфлуоресцеина (DCHF-DA) в гомогенатах тканей облученных мышей и сопоставлен с выживаемостью животных. **Результаты.** Было обнаружено, что при облучении в дозе 5 Гр мелатонин полностью подавляет повышение уровня активных форм кислорода и азота (АФК/А) в тканях мозга и селезенки при его пострадиационном введении. При введении мелатонина в режиме радиопротектора (превентивно, однократно) некоторое увеличение АФК/А наблюдалось в более радиочувствительной ткани селезенки на 24 час после облучения, но к 48-му часу уровень окислительного стресса возвращался к нормальному (контрольному). При облучении в летальной дозе 9 Гр — независимо от режима введения мелатонина — развивался сильный окислительный стресс к 24-му часу после облучения и сохранялся на неизменном уровне к 48-ому часу. При облучении в дозе 5 Гр при использовании мелатонина в роли радиопротектора на 30 день выживало 50% животных, а в качестве радиомитигатора — 80% животных, соответственно. При облучении в дозе 9 Гр при использовании мелатонина в роли радиопротектора на 30 день выживало 20% животных, а в каче-

стве радиомитигатора — 50% животных, соответственно. Было установлено, что существенным фактором в радиационной гибели животных является устанавливающийся после облучения высокий самоподдерживающийся уровень окислительного стресса в тканях облученных животных.

Финансирование. Работа была выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00381-21-00, частичная поддержка РФФИ № 17-29-01007 офи_м.

Благодарности: авторы выражают искреннюю благодарность д.б.н. М.Г. Шарапову, ИБК РАН, за консультации по методическим особенностям детекции АФК/А.

КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ КАТИОН-ЗАМЕЩЕННЫХ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ

Давыдова Г.А.¹, Форысенкова А.А.², Фадеева И.В.²

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

² Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН.

e-mail: davidova_g@mail.ru

Переломы костей происходят ежегодно у миллионов людей по всему миру. Костная ткань обладает способностью к регенерации, однако в ряде случаев при потере больших объемов кости, остеопорозе, после резекции опухолевых образований восстановление костных дефектов естественным путем весьма затруднено. Известно, что только в США ежегодно регистрируется в среднем 15 млн пациентов с переломами костей, из которых в 1,6 млн случаев для лечения требуется применение костных трансплантатов. Поэтому, одной из актуальных проблем современной медицины является получение биологически активных костных имплантатов, покрытий и др., которые способны оказывать необходимое биологическое действие на ткани живого организма, а также адаптироваться к форме костного дефекта.

Одним из важных требований к матриксу становится скорость его биорезорбции, приближенная к скорости образования новой костной ткани. Поскольку скорость резорбции фосфатов кальция в организме человека существенно меньше, по сравнению со скоростью формирования новой костной ткани, в их структуру для дестабилизации кристаллической решетки вводят допирующие ионы. Кроме того, установлено, что проведение изоморфных

замещений в структурах ГА и ТКФ приводит к повышению их растворимости в жидкостях, моделирующих жидкости организма.

Были разработаны и исследованы новые керамические биоматериалы на основе наноразмерных цинкзамещенного [1] и стронцийзамещенного [2] бруштитового цемента и медьзамещенной керамики [3]. Продемонстрированы хорошая адгезия, распластывание и высокая пролиферативная активность стволовых клеток пульпы зуба человека на поверхности металлзамещенной керамики. Показано, что добавление ионов Cu, Zn и Sr к β -ТКФ улучшает антибактериальные свойства материалов без уменьшения биосовместимости, что делает их более привлекательным, чем чистый β -ТКФ для замены и восстановления кости при умеренных и ненагруженных дефектах, которые склонны к инфекции в ортопедических и травматологических условиях. Несмотря на эти многообещающие свойства, количество замещающего иона следует тщательно оптимизировать, чтобы усилить антибактериальную активность, сохранив при этом положительный эффект на клетках.

Для регенерации тканей необходимо оптимизировать каждый этап заживления кости с последующим применением методов визуализации, таких как рентгенография, компьютерная томография (КТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ). Однако даже при использовании этих методов трудно проследить процессы регенерации костной ткани и контролировать деградацию синтетических заменителей кости без каких-либо контрастирующих веществ.

Разработаны способы получения керамических биоматериалов на основе стронций-, висмут-, гадолиний- и барийзамещенных трикальцийфосфатов [4, 5]. Установлено влияние методов синтеза на фазовый состав полученных порошков, их физико-химические характеристики, цитотоксичность и антибактериальные свойства. Данные материалы могут быть использованы в качестве керамики, цементов и композитов для костных имплантатов и покрытий для ортопедических имплантатов, обладающих антибактериальными свойствами и контрастных агентов для различных методов биовизуализации.

Были разработаны способы получения композиционных минерал-полимерных материалов, на основе биосовместимых и биорезорбируемых полимеров с медь-, цинк-, марганец-замещёнными трикальцийфосфатами [6—8]. Полимерная матрица представляет собой смесь поливинилпирролидона и альгината натрия и обладает достоинствами обоих полимеров. Альгинат обеспечивает возможность химического сшивания ионами поливалентных металлов для контроля растворимости и резорбируемости, а также плёнообразование и механическую прочность материала, поливинилпирролидон

придаёт плёночным материалам эластичность и повышает биосовместимость. β -ТКФ возможно допировать ионами меди, цинка, марганца, стронция, что, с одной стороны, увеличивает скорость его биорезорбции, а с другой — придаёт материалу антибактериальные свойства, что актуально, поскольку со временем наблюдается возрастающая резистентность распространённых госпитальных штаммов бактерий к антибиотикам и применение альтернативных средств для борьбы с внутрибольничными инфекциями, что открывает перспективы их использования в хирургии для замещения как костных, так и мягких тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fadeeva I.V., Goldberg M.A., Preobrazhensky I.I., Mamin G.V., Davidova G.A. et al.* Improved cytocompatibility and antibacterial properties of zinc-substituted brushite bone cement based on β -tricalcium phosphate // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2021, 32(9):99.
2. *Rau J.V., Fadeeva I.V., Forsyenkova A.A., Davydova G.A. et al.* Strontium Substituted Tricalcium Phosphate Bone Cement: Short and Long-Term Time-Resolved Studies and In Vitro Properties // *Advanced Materials Interfaces*, 2022, June, 2200803 (1 of 17).
3. *Fadeeva I.V., Lazoryak B.I., Davidova G.A. et al.* Antibacterial and cell-friendly copper-substituted tricalcium phosphate ceramics for biomedical implant applications // *Materials Science & Engineering C*, 2021, 129, 112410,
4. *Fadeeva I.V., Fomin A.S., Barinov S.M., Deyneko D.V., Lazoryak B.I., Barbaro K., Davydova G.A. et al.* Influence of Synthesis Conditions on Gadolinium-Substituted Tricalcium Phosphate Ceramics and Its Physicochemical, Biological, and Antibacterial Properties // *Nanomaterials (Basel)*, 2022 Mar 3;12(5):852.
5. *Фадеева И.В., Рыжов А.П., Тутов Д.Д., Филиппов Я.Ю., Тюткова Ю.Б., Давыдова Г.А., Баринов С.М.* Керамика из барийзамещенных трикальцийфосфатов // *Неорганические материалы*. 2022. Т. 58. № 3. С. 333—340. DOI: 10.31857/S0002337X22030034.
6. *Fadeeva I.V., Trofimchuk E.S., Forsyenkova A.A., Ahmed A.I., Gnezdilov O.I., Davydova G.A. et al.* Composite Polyvinylpyrrolidone—SodiumAlginate—Hydroxyapatite Hydrogel Films for Bone Repair and Wound Dressings Applications // *Polymers* 2021, 13, 3989.
7. *Форысенкова А.А., Слукин П.В., Трофимчук Е.С., Давыдова Г.А., Фадеева И.В.* Композиционные минерал-полимерные материалы, содержащие катион-замещенные фосфаты кальция // *Перспективные материалы*, 2022. № 7. С. 35—48.
8. *Фадеева И.В., Форысенкова А.А., Трофимчук Е.С., Гафуров М.Р., Ахмед И.А., Давыдова Г.А., Антонова О.С., Баринов С.М.* Пористые матрицы на основе поливинилпирролидона, содержащие фосфаты кальция, для медицинских применений // *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2022. № 3. С. 543—548.

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ F1 ПОКОЛЕНИЯ МЫШЕЙ, ОБЛУЧЕННЫХ ФЕМТОСЕКУНДНЫМ ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ *IN VIVO*

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

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.

² Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, г. Троицк, Россия.

e-mail: dyukina@rambler.ru

Несмотря на широкое применение в медицинской практике приборов электромагнитного излучения оптической части спектра, данные об их генотоксических эффектах немногочисленны, противоречивы и не систематизированы по какому-либо одному критерию или источнику излучения. При применении подобных приборов важным является оценка как их генотоксичности, которая регистрирует повреждения в ядерном аппарате клетки (хромосомные aberrации, микроядра, повреждения ДНК), так и канцерогенного риска. В настоящее время фемтосекундные (ФС) лазеры являются наиболее перспективными в таких областях как физика, биология, медицина и другие прикладные сферы. Характерными чертами ФС лазеров является малая длительность и высокая средняя интенсивность импульса. Понимание закономерностей действия ФС лазера на живые системы и необходимых условий для их медицинской адаптации является крайне важным.

Изученные ранее нами источники неионизирующих излучений (инфракрасный свет (850 нм), красный свет He-Ne-лазера (632,8 нм)) и ФС лазерное излучение (525 нм, 200 фс) при всех дозах не вызывали увеличения естественного спонтанного фона молекулярных и цитогенетических повреждений, что косвенно указывало на их генетическую безопасность. Однако при дополнительном облучении этих животных в повреждающей дозе 1,5 Гр рентгеновского излучения была обнаружена индукция адаптивного ответа, которая зависела от величины адаптирующей дозы, времени между адаптирующей и выявляющей дозами и коррелировала по динамике с уровнем продукции АФК. Защитный эффект имел место только в том случае, если доза лазерного света не превышала 16 мДж, что соответствует дозе 0,4 Гр ионизирующей радиации, выше которой адаптивный ответ не индуцировался [1, 2]. В последние десятилетия в связи с быстро изменяющимся экологическим состоянием окружающей среды кроме задач, связанных с изучением мутационных процессов, вызванных различными физическими и химическими факторами, обсуждается проблема изменчивости или нестабильности генома, проявляющаяся во многих поколениях.

Цель исследования заключалась в определении свойств потомков первого поколения от самцов, облученных низкоинтенсивным неионизирующим импульсным ФС лазерным излучением, по тесту «радиочувствительность» и по схеме радиационного адаптивного ответа в цельной крови, костном мозге и лимфоидных органах, скорости роста опухоли и выживаемости животных для выявления возможной трансгенерационной геномной нестабильности.

Эксперименты проводили на двухмесячных самцах мышей линии SHK. Для изучения возможности индукции трансгенерационной геномной нестабильности в первом поколении животные были разделены на две группы. Экспериментальную группу облучали в область носа ФС лазерным излучением (525 нм, 200 фс, 70 МГц, Авеста, РФ, г. Троицк) при мощности 0.5 мВт в течение 10 с или рентгеновским излучением в дозе 0.1 Гр (0.1 Гр/мин, 200 кВ, 8 мА, ЦКП «Источники излучения ИБК РАН», Пушкино) в качестве положительного контроля. Вторая группа необлученных животных была взята в качестве естественного радиационного контроля. Для получения первого поколения самцов, облученных ФС лазерным излучением или рентгеном в дозе 0.1 Гр, через 2 недели спаривали с необлученными самками. Полученное потомство в возрасте 2 месяцев было подвергнуто облучению в дозе 1.5 Гр для определения радиочувствительности или по схеме индукции радиационного адаптивного ответа (0.1 Гр + 1.5 Гр) [3]. На экспериментальную точку использовали не менее 5 мышей. Определяли уровни цитогенетических повреждений с помощью микроядерного теста в костном мозге, продукции АФК в цельной крови методом люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции (Chemilum-12, Россия) и индексы масс тимуса и селезенки. Динамику роста солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) и выживаемость мышей при облучении в дозе 6.5 Гр оценивали по стандартным методикам, при этом на каждую экспериментальную точку использовали не менее 15 мышей. Для оценки статистической достоверности различий между группами использовали t-критерий Стьюдента.

В костном мозге с помощью микроядерного теста было обнаружено, что потомки облученных родителей более радиоустойчивы по сравнению с родителями. При облучении их по схеме адаптивного ответа этот феномен отсутствовал как в костном мозге, так и лимфоидных органах в отличие от родителей, при этом величина спонтанного фона была одинаковой. Поскольку в биологических процессах основную сигнально-регуляторную роль играют АФК, изменение их продукции в организме может влиять на его адаптацию к повреждающим воздействиям различных видов излучений. При исследовании уровня продукции АФК в крови потомков мышей, предоблученных ФС лазерным и рентгеновским излучениями, было обнаружено, что фоновое значение индекса

активации у облученных потомков в несколько раз выше, чем у контрольных потомков. При облучении всех потомков в дозе 1.5 Гр индекс активации был одинаковым, а при облучении по схеме радиационного адаптивного ответа наблюдалось значительное его повышение у потомков облученных родителей, что говорит об активации резервной возможности нейтрофилов. У потомков предоблученных самцов скорость роста АКЭ была такой же, как у потомков необлученных животных, в отличие от родителей, у которых наблюдалось торможение скорости опухоли. Выживаемость потомков, облученных в дозе 6.5 Гр, была такая же, как у родителей и в контрольной группе.

В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что первое поколение мышей от адаптированных ФС лазерным и рентгеновским излучениями характеризуется в отличие от родителей повышенной радиоустойчивостью клеток костного мозга и лимфоидных органов, что коррелирует с изменением уровня продукции АФК и отсутствием адаптивного ответа. Полученные данные свидетельствуют о возможности трансгенерационной передачи адаптированного состояния самцов, индуцированного низкими дозами ФС лазерного и рентгеновского излучений и может иметь значение при оценке рисков отдаленных последствий у поколений для выявления повреждений от различных экологических факторов. Подобные комплексные исследования на потомках важно проводить при тестировании новых приборов электромагнитного излучения биомедицинского назначения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заичкина С.И., Дюкина А.Р., Розанова О.М. и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины 161 (5), 621 (2016).
2. Дюкина А.Р., Заичкина С. И., Розанова О.М. и др. // Мед. физика 64 (4), 37 (2014).
3. Заичкина С.И., Клоков Д.Ю., Розанова О.М. и др. // Генетика, 1998, Т. 34, № 7. С. 1013—1016.

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ТЕСТЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ НАРУШЕНИЙ ВЕСТИБУЛЯРНОЙ ФУНКЦИИ У МЫШЕЙ

Жуйкова Н.С., Михеева И.Б., Павлик Л.Л., Архипов В.А.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: nat.zhuikova@mail.ru

Дисфункция вестибулярных ядер приводит к нарушению равновесия, пространственной дезориентации, головокружению, вегетативным и эмоциональным расстройствам. Четверть взрослого населения испытывают симптомы головокру-

жения и нарушения равновесия, которые сопровождаются риском падения. Фармакологические средства для защиты или восстановления вестибулярной функции направлены на облегчение симптомов, сопровождающих вестибулярные расстройства или противодействие причинам, которые, однако, не всегда известны. Недостаток информации об этиологии вестибулярных расстройств и фармакологических мишенях являются одними из основных проблем, которые еще предстоит решить [2].

Цель нашей работы заключается в изучении пластических перестроек нейронов вестибулярных ядер при гиперстимуляции вестибулярной системы у мышей. Ранее нами были исследованы ультраструктурные нейрональные изменения в мозге мышей в условиях депривации вестибулярных стимулов после космического полета [3, 4]. Необходимым этапом настоящей работы является оценка вестибулярных нарушений у животных по поведенческим коррелятам. У млекопитающих четыре вестибулярных ядра — медиальное (*medial vestibular nucleus*), латеральное (*lateral vestibular nucleus*), верхнее (*superior vestibular nucleus*) и нижнее ядро (*inferior vestibular nucleus*) расположены на дне ромбовидной ямки в четвертом желудочке, обеспечивая поддержание равновесия и ориентации в пространстве.

Предложенные модели вестибулярной гиперстимуляции на животных основаны на создании условий, при которых животное помещается в контейнер, совершающий вращательные или колебательные движения в разных плоскостях относительно земной гравитации. При этом животное может быть иммобилизовано, или свободно в своих движениях. Длительность и скорость перемещения являются основными факторами, влияющими на состояние животного. После пилотного опробования нескольких вариантов мы применили способ гиперстимуляции, при которой мыши подвергались вращению со скоростью 80 об/мин в вертикальной плоскости в течение 8 часов. Контролем служили животные, помещенные в такие же контейнеры, что и подопытные, но без стимуляции.

Для оценки состояния животных после вестибулярной гиперстимуляции изучают их моторные, сенсорные и когнитивные функции, которые взаимосвязаны между собой. Наиболее распространенные тесты характеризуют моторные функции, а именно локомоторную активность, мышечную силу, баланс, особенности походки, а также ориентацию в пространстве. Нами апробированы: «открытое поле», «ходьба по сетке (решётка)», «ходьба по сужающейся дорожке», «переворачивание при свободном падении», «удерживание на вертикальном стержне», «вращающийся стержень — ротарод», «ходьба по приподнятой перекладине», «анализ походки по следам» [1]. Применение двух тестов — «открытое поле» и «сужающаяся дорожка» под наклоном 80 градусов в наших условиях выявило нарушения в поведении подопытных мышей по ряду параметров. Достоверность

различий, измеренных параметрой, оценивали с помощью GraphPadforPrizma 5, применяя тест U-критерия Манна—Уитни. Тест «открытое поле» показал снижение двигательной активности у подопытных животных, как вертикальной, так и горизонтальной, а также увеличение длительности груминга (см. таблицу).

Таблица

Влияние длительной вестибулярной стимуляции на ориентировочно-исследовательское поведение и двигательную активность животных при тестировании с помощью «открытого поля» в течении 10 мин

Группа животных	Число пересечения ячеек	Число пересечения центральных ячеек	Число стоек	Кол-во грумингов	Средняя длительность глуминга, с
Контроль N = 17	96,4 ± 6,3	10,9 ± 2,1	27,9 ± 3,7	10,6 ± 1,4	6,9 ± 0,8
Вестибулярная стимуляция N = 6	47,6 ± 8,1*	2,8 ± 0,4*	5,5 ± 1,6*	12,3 ± 2,1	47,2 ± 12,4*

* $P < 0,05$ отличие от контроля; U — критерий Манна—Уитни; N — количество животных.

Тест «сужающаяся дорожка» показал, что у подопытных мышей скорость прохождения по дорожке снижалась ($3,2 \pm 1,3$ см/с) по сравнению с контролем ($5,9 \pm 0,6$ см/с) при $P = 0,0290$, причем, не все подопытные животные смогли пройти до конца дорожки.

Таким образом, использованные поведенческие тесты доказали наличие нарушения моторных функций у мышей после вращения при скорости 80 об/мин в вертикальной плоскости в течение 8 часов, что позволяет поставить задачу изучения механизмов мозга, ответственных за нарушение и восстановление вестибулярных функций.

Работа поддержана Государственным заданием № 075-01025-23-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каркищенко В.Н. и др. Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине // Биомедицина. 2012. № 4. С. 15—21.
2. Chabbert C. Principles of vestibular pharmacotherapy // Handbook of clinical neurology. 2016. V. 137. P. 207—218.
3. Mikheeva I. et al. Studying the structure of the nucleus of the trochlear nerve in mice through 7 days of readaptation to earth gravity after spaceflight // Brain Research. 2022. V. 1795. P. 148077.
4. Mikheeva I. et al. Influence of a 30-day spaceflight on the structure of motoneurons of the trochlear nerve nucleus in mice // Brain research. 2021. V. 1758. P. 147331.

УЧАСТИЕ АСТРОЦИТАРНОЙ ГАМК В РАЗВИТИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ НЕОКОРТИКАЛЬНЫХ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАТОВ

Журавлева З.Н.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: zhuravleva@iteb.ru

Нейротрансплантация является перспективным нейрохирургическим методом для клеточного и функционального восстановления поврежденного мозга при травмах и неврологических заболеваниях. Важным условием использования нейротрансплантатов является предотвращение нарушения баланса между возбуждающими и тормозными процессами и формирования эпилептического очага. Однако мы ранее обнаружили значительное снижение количества тормозных нейронов, содержащих гамма-амино масляную кислоту (ГАМК), в неокортикальных трансплантатах [1—3]. В то же время есть данные о том, что кроме фазического торможения, которое генерируется высвобождением тормозного нейромедиатора из синаптических везикул ГАМК-ергических нейронов, существуют тонические тормозные токи, образованные внеклеточной ГАМК. При этом наличие ГАМК в экстраклеточном пространстве в основном создается за счет поступлений из астроцитов [4, 5]. Целью настоящей работы было ультраструктурное иммуноцитохимическое изучение ГАМК в интранеокортикальных трансплантатах с особым вниманием к астроцитарной глии.

Работа выполнена на крысах породы Вистар. Все процедуры с животными проводили под общим нембуталовым наркозом. В качестве донорского материала для трансплантации использовали небольшие кусочки эмбриональной закладки неокортекса 17-дневных плодов. Гомотопическую аллотрансплантацию производили в острую полость в коре взрослых крыс-самцов ($n = 5$). Трансплантаты развивались в течение 4 мес. После этого животных транскардиально перфузировали физраствором и фиксатором (смесь параформальдегида и глутарового альдегида). Затем выделяли область мозга, содержащую нейротрансплантат, и разрезали на 50 мкм коронарные срезы, на которых проводили выявление ГАМК с помощью пре-имбеддинг иммуноцитохимического метода [6]. Все реагенты, а также первичные антитела против ГАМК и вторичные антитела, конъюгированные с коллоидным золотом, приобретали в корпорации Sigma-Aldrich. Контрольные образцы обрабатывали теми же реагентами за исключением инкубации в растворах антител. Для дальнейшего электронно-микроскопического исследования материал постфиксировали в растворе четырехоксида осмия и заливали в эпоновые блоки. Ультратонкие срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-100B.

Визуальный анализ мозга взрослых реципиентов через 4 мес. после трансплантации показал наличие трансплантатов у всех пяти экспериментальных животных. В некоторых случаях трансплантированная ткань полностью заполняла операционную ямку, в других — несколько выступала над поверхностью мозга. На гистологических срезах четко распознавались ткани, принадлежащие неокортексу реципиента и неокортикальному трансплантату. Трансплантированная ткань представляла собой клеточное образование, в котором нервные и глиальные клетки были распределены диффузно, без какой-либо ориентации и не формировали слоистую организацию, характерную для неокортекса.

Изучение ультраструктуры трансплантатов после иммуноцитохимической обработки, показало, что условия проведения реакции существенно не отразились на сохранности ткани. При оценке иммунореактивности ГАМК в нейротрансплантатах интенсивная метка была обнаружена в протоплазматических астроцитах. ГАМК-позитивные астроциты имели светлую цитоплазму и небольшое количество клеточных органелл. Иммунометка в виде электронно-плотных глобул размером от 20 до 60—80 нм была равномерно распределена по цитоплазме. Большинство частиц не имело четкой пространственной привязки к мембранам или органеллам, однако над отдельными митохондриями наблюдались скопления до 8—10 гранул. Только редкие гранулы располагались в области астроцитарных ядер. В цитоплазматических отростках астроцитов распределение реакционного продукта было аналогично такому в клеточных телах. Кроме того, иммуномеченные профили перерезанных астроцитарных отростков наблюдались повсюду в нейропиле. Астроцитарные концевые ножки, покрывающие кровеносные капилляры в нейротрансплантатах, также активно реагировали на ГАМК окрашивание.

Известно, что в мозге имеется два пула ГАМК, которые синтезируются разными изоформами глутаматдекарбоксилазы (ГДК). ГАМК, синтезированная ГДК65, рассматривается как синаптический пул и ассоциируется с экзоцитозом нейротрансмиттера из синаптических везикул и физическим торможением нейронов, а ГАМК, синтезированная ГДК67, имеет отношение к метаболическому пулу, локализуется в цитоплазме и ассоциируется с тоническим торможением [7]. При некоторых неврологических заболеваниях и в развивающейся нервной системе было обнаружено транзитное присутствие ГАМК в астроцитах [8, 9]. Выявленная нами иммунометка в астроцитах свидетельствует о высокой активности метаболического пула ГАМК в нейротрансплантатах. По-видимому, астроцитарная ГАМК в неокортикальных трансплантатах, не только поддерживает дифференцировку и созревание имплантированной ткани, но и усиливает тонические тормозные процессы для сохранения баланса между возбуждением и торможением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Журавлева З.Н. Гиппокамп и нейротрансплантация // Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. 2004. Т. 54(2): 149—162. doi: 10.1007/s11055-005-0031-3.
2. Журавлева З.Н., Хуцян С.С., Журавлев Г.И. Особенности фенотипической дифференцировки нейронов в интраокулярных трансплантатах // Онтогенез. 2016. Т. 47(3): 181—188. doi: 10.7868/S0475145016030083.
3. Bragin A., Takács J., Vinogradova O., Zhuravleva Z., Hamori J. Number of GABA-immunopositive and GABA-immunonegative neurons in various types of neocortical transplants // Exp. Brain Res. 1991. V. 85(1): 114-128. doi: 10.1007/BF00229992.
4. Glykys J., Mody G.I. The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus // J. Physiol. 2007. V. 582 (3): 1163—1178. doi: 10.1113/jphysiol.2007.134460.
5. Semyanov A., Walker M.C., Kullmann D.M., Silver R.A. Tonically active GABA A receptors: Modulating gain and maintaining the tone // Trends Neurosci. 2004. V. 27(5): 262—269. doi.org/10.1016/j.tins.2004.03.005.
6. LeMeur K., Mendizabal-Zubiaga J., Grandes P., Audinat E. GABA release by hippocampal astrocytes // Front. Comp. Neurosci. 2012. V. 6, Article 59. doi: 10.3389/fncom.2012.00059.
7. Obata K., Hirono M., Kume N., Kawaguchi Y., Itohara S., Yanagawa Y. GABA and synaptic inhibition of mouse cerebellum lacking glutamate decarboxylase 67 // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. V. 370 (3): 429—433. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.03.110.
8. Muller J., Timmermann A., Henning L., Muller H., Steinhauser C., Bedner P. Astrocytic GABA accumulation in experimental temporal lobe epilepsy // Front. Neurol. 2020. V. 11, Article 61. doi: 10.3389/fneur.2020.614923.
9. Bolneo E., Chau P.Y.S., Noakes P.G., Bellingham M.C. Investigating the role of GABA in neural development and disease using mice lacking GAD67 or VGAT genes // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23: 7965. <https://doi.org/10.3390/6>.

ВЫЯВЛЕНИЕ РОЛИ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В ИНИЦИИ АСЕПТИЧЕСКОГО КАЛЬЦИНОЗА КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ БИОМАТЕРИАЛОВ

Звягина А.И.¹, Минайчев В.В.¹, Пятин К.В.^{1,2}, Менухов В.О.^{1,2}, Фадеева И.С.¹

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

² Пущинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» на базе ПушГЕНИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: alennazvyagina@gmail.com

Целью данной работы являлось выявление роли структурных изменений внеклеточного матрикса фиксированных глутаровым альдегидом (ГА) биоматериалов на основе ксеногенного перикарда, в инициации их необратимых постимпланта-

ционных дегенеративных изменений, а также выявление основных паттернов развития асептического кальциноза данных материалов в зависимых (*in vivo*) и независимых (*in vitro*) от клеток реципиента условиях. Для этого были проведены сравнительные исследования ряда экспериментальных материалов (ЭМ), полученных из ксеноперикарда, обработанных с использованием стандартных и авторских предимплантационных обработок. В качестве контрольных групп сравнения использовались нативный перикард и используемый в хирургической практике материал, разработанный в НЦССХ им. А.Н. Бакулева.

Для морфологической оценки изменений структуры ЭМ до и после обработки были проведены электронно-микроскопическое исследование (СЭМ) серозной поверхности (*p. serosum*) материалов, а также гистохимические исследования фибриллярной структуры матрикса с использованием дифференциальных окрасок отдельных компонентов ВКМ.

Было выявлено, что использование таких распространенных для предимплантационной обработки агентов, как додецилсульфат натрия и спирты в высоких концентрациях (изопропиловый спирт в частности), оказывает выраженное повреждающее воздействие на структуру ЭМ, проявляющееся в прободении или полном истощении гликозаминогликанового слоя *p. serosum*, разволокнении, дезорганизации и образовании микроразрывов подлежащих коллагеновых волокон, общем обезвоживании и растрескивании основной толщи матрикса материалов, а также появлении признаков его выраженной фуксинофилии. ЭМ, обработанные в условиях нефизиологичных температур (38 °С и выше) также демонстрировали признаки повреждения как серозной поверхности, так и основного коллагенового матрикса. Также обнаружилось, что использование ГА «маскирует» поверхностные повреждения материалов за счет восстановления общей архитектоники матрикса, при этом глубокие повреждения молекулярной структуры коллагена и целостности коллагеновых фибрилл сохраняются. Одновременно с вышесказанным было определено, что использование ГА в концентрации выше 0,2% вызывает общую дезорганизацию нормальной структуры и архитектоники коллагенового матрикса.

Выявление паттернов развития активного асептического кальциноза проводили в модели гетеротопической имплантации крысам с последующими гистологическим и гистохимическим анализом эксплантированных (с захватом тканей периимплантного ложа) образцов. Было обнаружено, что глубокие деструктивные изменения в первую очередь поверхности материалов, вызванные критическим обезвоживанием, кросс-фиксацией или температурной денатурацией ВКМ, приводят к инициации процессов интенсивной резорбции их ВКМ, сопровождающихся активной миграцией гистиолиmfоцитарных клеток в по-

граничные зоны матрикса. При этом в случае свободной миграции клеток реципиента в срединную часть матрикса ЭМ, области, которые не могли быть напрямую утилизированы за счет протеолитической активности клеток и тканевой жидкости, подвергались интенсивной минерализации после 2-х месяцев имплантации. Такой клеточно-резорбтивный процесс, сопровождающий развитие кальцификации неподдающихся протеолитической резорбции структур матрикса, указывает на утилизационный характер процессов кальциноза. При этом выявлено, что зависимый от клеток кальциноз развивался последовательно, начиная с формирования центров нуклеации кальциноза в месте наиболее интенсивной миграции лимфоцитов (как правило со стороны *p. fibrosum*), распространяясь по мере продвижения клеток в более глубокие слои матрикса. Использование длительных сроков имплантации (5 мес. и более) позволило определить, что контактная цитотоксичность материалов в некоторых случаях отсрочивает зависимый от клеток кальциноз до момента полного вымывания токсичных агентов и предоставления доступа клеткам реципиента к толщине матрикса. При этом, равномерное насыщение матрикса соединениями кальция некоторых, обладающих цитотоксическим действием материалов, без видимых признаков формирования депозитов кальция и при полном отсутствии клеточной миграции (даже на поздних сроках) в материалы, указывало на пассивный механизм развития асептического кальциноза для данного типа ЭМ.

Для определения паттернов развития пассивного асептического кальциноза использовалась *in vitro* модель длительной (40 сут.) инкубации материалов в растворах, имитирующих условия нормофосфато- и -кальциемии. По завершении инкубации количество депонированного кальция измерялось методом адсорбционной спектрофотометрии. Также проводилось исследование морфологических особенностей локализации кальциевых депозитов с использованием гистохимических методов исследования. Данный блок исследований подтвердил предположенный ранее пассивный механизм развития асептического кальциноза и позволил выявить корреляцию между степенью повреждения поверхности и интенсивностью пассивного осаждения минерализованного кальция на компонентах ВКМ. Более того, было обнаружено, что используемый для консервации некоторых материалов пропиленоксид, может способствовать дополнительному повреждению ВКМ, а также способствует осаждению фосфатов кальция на компонентах ВКМ, по-видимому, за счет образования дополнительных реакционных групп, что требует отдельных детализированных исследований. Практически равномерная кальцификация всей площади матрикса ЭМ и формирование большого количества ядер минерализации указывает на быстрый и лавинообразный характер развития пассивного кальциноза.

Проведенная работа позволяет сделать вывод, что, в зависимости от предимплантационной обработки кардиохирургических биоматериалов процесс асептического кальциноза может развиваться либо по активному (зависимому от клеток реципиента), либо по пассивному (физико-химическому) механизму. При этом степень интенсификации как пассивного, так и активного кальциноза напрямую зависит от степени повреждения и структурных изменений матрикса материалов, вследствие их предимплантационной обработки. Повреждения серозной поверхности в ходе предимплантационной обработки могут играть решающую роль в инициации процессов кальцификации. При этом отсутствие каких-либо признаков развития кальциноза в неповрежденных материалах, изготовленных по авторскому протоколу матрикс-сберегающей обработки, свидетельствует, что сохранение структуры ВКМ может способствовать резистентности кардиохирургических биоматериалов к развитию патологического асептического кальциноза.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИТЭБ РАН, при финансовой поддержке гранта президента РФ в рамках работы по проекту СП-1813.2021.4.

ЧЕЛОВЕК И АНДРОИДНЫЙ РОБОТ. МОЖЕТ ЛИ РОБОТ ИМЕТЬ СОЗНАНИЕ?

Иваницкий Г.Р.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.
e-mail: ivanitsky@iteb.ru

Одним из существенных результатов *творчества людей* в XXI веке стало создание андроидных роботов, снабженных искусственным интеллектом. Уровень совершенства этих роботов становится столь высоким, что по внешним признакам и по поведению установить их отличие от живых людей вскоре будет невозможно.

Цели Робота и Человека — похожи. Это — обеспечение динамической стабильности в условиях изменения внешней среды. Однако эта похожесть может приводить к логической ошибке: нельзя ставить знаки равенства между людьми и андроидными роботами, наделяя тех и других *сознанием*. Причина возникновения подобных ошибок связана с неопределенностью самого термина *сознание человека*. Было предпринято много попыток определить его с позиции физики. Например, гипотеза о голографической основе *сознания*, которую сформулировал К. Прибрам. Использование идеи Х. Эверетта о парал-

лельном существовании множества миров. Эту идею использовал М.Б. Менский, попытавшись объяснить феномен *сознания*. Существует, по крайней мере, двенадцать физических и гуманитарных наук, пытающихся внести свою лепту в понимание термина *сознание* (см. рисунок).



Спросите психолога: что такое сознание? Многие ответят, что это нечто тождественное моему «Я», или «моей душе», или иной подобной сущности. Сразу возникает второй вопрос: что такое *душа* с позиции физики? На этом для материалиста обсуждение закончится, поскольку *душа* — это нематериальная сущность и не может рассматриваться без привлечения теологии, поскольку её существование основано на вере. Термин *сознание* не поддавался содержательному определению, которое могло бы удовлетворить и физиков, и нейробиологов.

Надо отметить гипотезу М.И. Рабиновича и М.К. Мюезинолу. Ими была предложена модель эмоциональной и когнитивной активности мозга на основе исследования переходных процессов в фазовом пространстве. Однако идею этих авторов нам пришлось дополнить автоволновой моделью с кросс-диффузией и кросс адвекцией В точке эта модель соответствует осцилятору Ван дер Поля [1]. Сегодня научные исследования расширили понимание феномена *сознания*, но проблемы с его определением не исчезли.

Тем не менее, в работе [2] нами было показано, что приложение термина *сознания* к андроидным роботам является ошибкой, которая может привести к серьезным последствиям. Человеческий мозг по сравнению с компьютерным «мозгом» робота имеет многоуровневую иерархическую организацию, в которой обработка информации происходит на всех уровнях — от квантового до социального [3]. Человек сам ставит цель, совершенствуя виртуальную модель

внешней среды, которая синтезируется его мозгом. Мозг человека может одновременно работать не только на основе классической детерминированной логики, но и использовать диалектическую вероятностную логику.

При сравнении различных современных Креативных Андроидных Роботов с Человеком в статье [2] были сформулированы и доказаны пять положений.

1. Сознание нельзя однозначно определить даже для людей, поскольку сознание одного человека не тождественно сознанию другого. Отсюда вытекает многообразие определений термина сознание. Оценивать похожесть сознания можно только в относительных единицах при сравнении похожих его носителей, например, для однойцовых близнецов. При сравнении людей с внешне похожими на них андроидными роботами нахождение их отличий зависит от того, какие существенные признаки различия положены в основу распознавания. Недостаток признаков, используемых для классификации, приводит к парадоксам, поэтому решение задачи описывается в терминах вероятности.

2. Согласно давно известному негэнтропийному принципу, информация есть негэнтропия. Объединение теории информации с эмоциями позволяет мыслящему человеку создавать новую информацию. Исследование связей между людьми и андроидными роботами, возможно, изменит социальную структуру общества, но к каким последствиям это приведёт, пока предсказать невозможно.

3. Развитие живой и неживой материи — это две стороны одного процесса. Здесь уместно вспомнить, что нередко наиболее плодотворными оказываются приложения математического формализма, о которых никто и не подозревал в начале их создания для описания процессов, происходящих в информационных системах. Тем не менее, не стоит преувеличивать, а тем более абсолютизировать значение предложенных нами в статье [2] физических идей и математических сценариев. Они используются сегодня для описания живых систем, в том числе в виде обобщённой теории информации с эмоциональной окраской. Время покажет, нужно ли их совершенствовать, существенно дополняя новыми признаками, или лучше заменить на нечто другое. Это обычная ситуация. Она возникла в прошлом и периодически повторяется.

4. Человек работает с тремя характеристики информации: *синтаксической, семантической и прагматической*. *Синтаксическая* связана с техническими проблемами хранения и передачи информации, *семантическая* имеет отношение к смыслу и значению истинности сообщений, *прагматическая* — это влияние информации на поведение воспринимающих информацию систем. У робота *синтаксическая характеристика* существует, *целевая, прагматическая функция* задается программистом, а *семантическая* принципиально отличается от подобной функции человека.

5. С широким развитием цифровых технологий и андронидной когнитивной робототехники возможен пессимистический прогноз, поскольку человечество, погрузившись в виртуальный мир, создаваемый компьютерными программами, вступило в новую, весьма опасную, фазу своего развития, когда виртуальный мир вытесняет реальный мир. Ложь (фейки) стали существенной частью этого мира. При этом открывается возможность нарушения устойчивости человеческой популяции в силу изменения сознания людей. Однако, можно надеяться, что люди приспособятся к этой новой ситуации и найдут из нее оптимистический выход.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Zemskov E.P., Tsyganov M.A., Ivanitsky G.R. and Horsthemke W.* Solitary pulses and periodic wave trains in a bistable FitzHugh-Nagumo model with cross diffusion and cross advection // *Physical Review E*, 105.014207(2022).
2. *Иваницкий Г.Р.* Неопределенности сравнения человека и андронидного робота // Успехи физических наук (УФН), принята к публикации. *Ivanitskii G.R.* Uncertainties in comparing a human and an android robot // *Phys. Usp.*, accepted; DOI: 10.3367/UFNe.2022.12.039299.
3. *Иваницкий Г.Р.* Робот и Человек. Где находится предел их сходства? // *УФН* 188 965—991 (2018). *Ivanitskii G.R.* The robot and the human. Where's their similarity limit? // *Phys. Usp.* **61** 871—895 (2018).

МЕЛАТОНИН МОЖЕТ УСИЛИВАТЬ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЛЕЙКЕМИИ

*Ломовский А.И.**, *Бабурин Ю.Л.*, *Фадеев Р.С.*, *Ломовская Я.В.*, *Кобякова М.И.*,
Крестинин Р.Р., *Сотникова Л.Д.*, *Крестинина О.В.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.

* *e-mail: lomovskyaalex@gmail.com*

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой прогрессирующее гематологическое злокачественное новообразование, характеризующееся повышенной продукцией бластных клеток в костном мозге и периферической крови [1]. В основе консервативного лечения этого заболевания лежит применение химиотерапевтических ДНК-тропных препаратов, таких как цитарабин (ЦИТ), доксорубицин, этопозид и других [2]. Кроме того, в настоящее время применяется таргетная терапия, направленная на различные мишени внутриклеточных механизмов выживания опухолевых клеток и одним из таких препаратов, является АВТ-737 [3]. Главной проблемой применения данных пре-

паратов является их побочное (неспецифическое) действие, которое связано с индукцией клеточной гибели не только лейкозных клеток, но и здоровых, в первую очередь клеток костного мозга. Таким образом, одним из направлений развития терапии данного заболевания направлено на поиск эффективных препаратов, не имеющих при этом негативного побочного действия.

Одним из перспективных препаратов для применения в терапии ОМЛ является производное биогенного амина серотонина, эпифизарный гормон — N-ацетил-5-метокситриптамиин или мелатонин (МЛТ). Исследования последних лет показали, что МЛТ обладает многочисленными онкостатическими эффектами. Так, противоопухолевая активность МЛТ была показана при раке кожи [4] желудочно-кишечного тракта [5] и молочной железы [5, 6], а также глиоме [7] и лейкемии [8]. Так же показано, что МЛТ может усиливать токсическое действие противоопухолевых препаратов в отношении клеток рака легкого [9], меланомы [10] и др.

В настоящей работе, мы исследовали влияние МЛТ совместно с низкими концентрациями ЦИТ или АВТ-737 на пролиферативную активность, изменение митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), цитозольного Ca^{2+} , продукцию АФК, а также изменения экспрессии маркеров ЭПР стресса, таких как связывающий белок иммуноглобулина (ВІР) и протеиндисульфидизомеразы (PDI), а также на изменение содержания моноклонального гомологичного белка С/ЕВР (СНОР), участвующем в ЭПР-стресс индуцированном апоптозе, в клетках MV4-11.

Мы показали, что при инкубации клеток с МЛТ в концентрации 1 мМ в течение 24ч происходит снижение числа живых клеток на 30%, а при инкубации с ЦИТ (0,4 мкМ) и АВТ-737 (20 нМ) снижение не более чем на 5%. Однако обработка клеток МЛТ совместно ЦИТ и АВТ-737 привела к снижению числа живых клеток на 50%. Анализ изменения уровня содержания маркеров ЭПР — стресса в клетках показал, что МЛТ снижал уровень ВІР на 40% и PDI на 20%. Действие ЦИТ и АВТ-737 на клетки привело к повышению ВІР и PDI на 50%. Совместное действие МЛТ с ЦИТ снижало уровни ВІР на 40% и PDI на 10%, а совместно с АВТ-737 к снижению ВІР на 20% и PDI на 50% относительно контроля. Стоит отметить, что МЛТ вызывал повышение уровня СНОР в клетках на 20%, а при действии ЦИТ и АВТ-737 уровень СНОР уменьшался на 50 и 60% относительно контроля. Интересно отметить, что МЛТ вызывает повышение уровня цитозольного Ca^{2+} при этом $\Delta\Psi_m$ снижался в 2 раза, а продукция АФК повышалась в 4 раза относительно контроля. При действии только ЦИТ и АВТ-737 на клетки MV4-11 мы наблюдали повышение уровня цитозольного Ca^{2+} на 10% относительно контроля. ЦИТ и АВТ-737 не оказывали

влияния на изменение $\Delta\Psi_m$ и продукцию АФК в клетках. Стоит отметить, что при совместном применении МЛТ с ЦИТ и АВТ-737 уровень цитозольного Ca^{2+} увеличивался на 45% и сопровождался снижением $\Delta\Psi_m$ в 2 раза и повышением продукции АФК более чем в 5 раз.

Таким образом, МЛТ способен усилить цитотоксическое действие противоопухолевых препаратов на клетки ОМЛ через активацию развернутого белкового ответа на ЭПР — стресс. Полученные результаты позволяют предположить, что МЛТ может быть использован в качестве средства, усиливающего цитотоксическое действие препаратов, применяемых при лечении лейкозов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-315-90014) и Государственным заданием 075-01027-22-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shafabakhsh R., Mirzaei H., Asemi Z.* (2020) Melatonin: A promising agent targeting leukemia // *J Cell Biochem.*, 121, 2730—2738.
2. *Lowenberg B., Downing J.R., Burnett A.* (1999) Acute myeloid leukemia // *N Engl J Med.*, 341, 1051—1062.
3. *Guerra V.A., DiNardo C., Konopleva M.* Venetoclax-based therapies for acute myeloid leukemia // *Best Pract Res Clin Haematol.* 2019;32(2):145-53.
4. *Pourhanifeh M.H., Mahdavinia M., Reiter R.J., Asemi Z.* Potential use of melatonin in skin cancer treatment: A review of current biological evidence // *J Cell Physiol.* 2019;234(8):12142-8.
5. *Pourhanifeh M.H., Mehrzadi S., Kamali M., Hosseinzadeh A.* Melatonin and gastrointestinal cancers: Current evidence based on underlying signaling pathways // *Eur.J. Pharmacol.* 2020;886:173471.
6. *Ram P.T., Dai J., Yuan L., Dong C., Kiefer T.L., Lai L. et al.* Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer // *Cancer Lett.* 2002;179(2):141-50.
7. *Anderson G.* The effects of melatonin on signaling pathways and molecules involved in glioma: Melatonin and glioblastoma: pathophysiology and treatment // *Fundam Clin Pharmacol.* 2020;34(2):189-91.
8. *Buyukavci M., Ozdemir O., Buck S., Stout M., Ravindranath Y., Savasan S.* Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect // *Fundam Clin Pharmacol.* 2006;20(1):73-9.
9. *Plaimée P., Weerapreeyakul N., Barusrux S., Johns N.P.* Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells // *Cell Prolif.* 2015;48(1):67—77.
10. *Yi C., Zhang Y., Yu Z., Xiao Y., Wang J., Qiu H. et al.* Melatonin enhances the anti-tumor effect of fisetin by inhibiting COX-2/iNOS and NF-kappaB/p300 signaling pathways // *PLoS One.* 2014;9(7):e99943.

СРАВНЕНИЕ ГЕНОПРОТЕКТОРНЫХ И РАДИОЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ МЕТФОРМИНА, МЕКСИДОЛА И АЛЬФА-ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ РЕНТГЕНОВСКОМ ОБЛУЧЕНИИ

Карманова Е.Е., Черников А.В., Иванов В.Е., Усачева А.М., Брусков В.И.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: bruskov_vi@rambler.ru

С началом развития ядерных технологий и до сегодняшнего дня существует проблема защиты человека от облучения ионизирующими излучениями. Поиск и создание идеальных радиозащитных препаратов остается актуальной проблемой. В настоящее время существует несколько групп радиомодулирующих веществ: радиопротекторы, радиомитигаторы, терапевтические агенты и радиосенсибилизаторы [1]. Из этих групп наиболее изученной являются радиопротекторы, которые уменьшают повреждающие действие ИИ в момент облучения и вводятся незадолго до него. Радиомитигаторы и терапевтические соединения применяются для нейтрализации и компенсации повреждений после облучения. Радиомитигаторов гораздо меньше, чем радиопротекторов, а большинство из них проходит начальные клинические испытания, недостаточно эффективны или имеют побочные эффекты [1]. Актуальным направлением исследований является поиск радиомитигаторов — радиозащитных терапевтических средств, среди лекарственных препаратов, которые уже широко применяются в медицинской практике для лечения различных заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом. Такие препараты не требуют дополнительных исследований на токсичность и отдаленные последствия, а также для них известны терапевтические концентрации и противопоказания.

Одним из наиболее перспективных кандидатов на роль радиомитигатора является метформин. Метформин (1,1-диметилбигуанидина гидрохлорид, МФ) — препарат первой линии для лечения сахарного диабета 2 типа, обладающий антиоксидантными, противоопухолевыми, иммуномодулирующими и противовоспалительными свойствами. В настоящее время МФ предлагают для комплексной терапии ряда других заболеваний, в первую очередь онкологических [2]. Вторым кандидатом — «Мексидол» (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат, ЭМГПС), который в течение длительного времени успешно используется в медицинской практике, при комплексной терапии различных заболеваний. ЭМГПС — это российский препарат с широким спектром фармакологических терапевтических эффектов. Известно о его нейропротекторных, противогипоксических, противоишемических, ноотропных, антистрессорных, ге-

ропротекторных и других лечебных свойствах [3]. Третий препарат — алиповая кислота (ЛК, тиоктовая кислота, (R-5-(1,2-дитиолан-3-ил)пентановая кислота) — антиоксидант, митохондриальный метаболит и нейропротектор. ЛК используется в терапии многих заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом. Среди них — диабетическая и алкогольная нейропатия, сахарный диабет, болезни Альцгеймера и Паркинсона, заболевания печени, ожирение и рассеянный склероз [4]. Целью данной работы было исследование генопротекторных и радиозащитных свойств МФ, ЭМГПС и ЛК как потенциальных радиомитигаторов при летальном рентгеновском облучении животных.

Для оценки генотоксичности у мышей *in vivo* использовали микроядерный тест — выявление повреждений в ДНК клеток красного костного мозга мышей Kv:SHK с образованием микроядер (МЯ) в полихроматофильных (ПХЭ) эритроцитах. Микроядерный тест красного костного мозга (МЯ-тест) позволяет *in vivo* определить повреждения ядерной ДНК после облучения животных. МЯ-тест является одним из классических методов изучения генотоксичности ионизирующего излучения [5].

Метформин, введенный внутрибрюшинно 3 мг/кг и 30 мг /кг после облучения в дозе 1,5—2 Гр снижал частоту образования МЯ в ПХЭ на 65% и 75% соответственно. МФ 300 мг/кг снижает процент образования МЯ в ПХЭ сразу после облучения на 70%, через 6 ч — на 30%, но до и через 24 ч после облучения не оказывает аналогичен с концентрацией 300 мг/кг. Установлено, что ЭМГПС в дозах 50 мг/кг и 150 мг/кг снижает частоту образования МЯ в ПХЭ костного мозга мышей после облучения в дозе 1,5 Гр на 73% и 80% соответственно. В дозе 5 мг/кг ЭМГПС не оказывает статистически значимого влияния на частоту образования МЯ. ЭМГПС 50 мг/кг снижает процент образования МЯ в ПХЭ до и сразу после облучения в дозе 1,5 Гр на 85%, через 6 ч — на 60% и через 24 ч после облучения не оказывал статистически значимого эффекта. Установлено, что ЛК в дозах 5 мг/кг и 40 мг/кг снижает частоту образования МЯ в ПХЭ при введении мышам после облучения в дозе 1,5 Гр костного мозга мышей на 70 и 75% соответственно. В дозе 100 мг/кг ЛК не оказывает статистически значимого влияния на частоту образования МЯ. ЛК 40 мг/кг снижает процент образования МЯ в ПХЭ сразу после облучения в дозе 1,5 Гр на 65%, до облучения и через 6 ч — на 40% и через 24 ч после облучения не оказывает статистически значимого эффекта.

По результатам исследований МЯ-тестов все исследованные нами лекарственные препараты обладают генопротекторными свойствами *in vivo*. Однако они имеют различные эффективные дозировки. ЭМГПС обладает как радиопротекторными, так и радиомитигаторными свойствами. ЛК обладает аналогичными свойствами, но радиопротекторный эффект слабее радиомитигатор-

ного. МФ обладает только радиомитигаторными свойствами. Полученные результаты заслуживают дальнейших исследований при совместном использовании этих соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Obrador E., Salvador R., Villaescusa J.I., Soriano J.M., Estrela J.M., Montoro A.* Radiomitigators (minimize toxicity even after radiation has been delivered). *Radioprotection and Radiomitigation: From the Bench to Clinical Practice.* // *Biomedicines.* 2020. V. 8. P. 461.
2. *Piskovatska V., Storey K.B., Vaiserman A.M., Lushchak O.* The Use of Metformin to Increase the Human Healthspan // *Reviews on New Drug Targets in Age-Related Disorders.* 2020. V. 1260. P. 319—332.
3. *Воронина Т.А.* Пионер антиоксидантной нейропротекции. 20 лет в клинической практике. // *Российский медицинский журнал.* 2016. Т. 24(7). С. 434—438.
4. *Усачева А.М., Черников А.В., Карманова Е.Е., Брусков В.И.* Фармакологические аспекты применения липоевой кислоты // *Химико-фармацевтический журнал.* 2021. Т. 55(11). С. 9—17.
5. *Vral A., Fenech M., Thierens H.* The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure // *Mutagenesis.* 2011. V. 26(1) P. 11—17.

МЕНТАЛЬНЫЙ РАСТР

Коломбет В.А., Лесных В.Н.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: v.kolombet@rambler.ru

В процедуре мышления проявляется аналог телевизионного растра. Ортогональные оси в ментальном растре — это наше внимание (аналог строчной развертки) и наши эмоции (аналог кадровой развертки). Строчку в этом растре создает последовательное перечисление ассоциаций, возникших к объекту внимания. Строчка завершается ассоциацией, которая теперь выступит в роли синхроимпульса, запускающего следующую строку развертки. В экспериментальном алгоритме т.н. вербальной трассировки это та «последняя ассоциация», которая приводит к смене объекта внимания.

Писатели в процессе создания литературных сюжетов конструируют линейные цепи рубрик, отражающих перипетии сюжета. Это пример уже кадровой развертки — сканирование диапазона положительных и отрицательных эмоций в форме полного колебания от нулевой фазы до следующей нулевой фазы (один период синусоиды). При возникновении «вязи сновидения» это любая ассоциация, вызывающая у сновидца непреднамеренную смену объекта внимания.

При смене объекта внимания возникает автоматическое смещение настроения на $1/8$ периода вдоль оси эмоций. С возрастом, по мере увеличения требований к мышлению, это смещение может испытывать, например, лишь каждая четвертая строка, а следующие три просто повторяют ее смещение, не привнося ничего нового. В итоге 32 строки в таком ментальном растре скомпонованы в восемь 4-строчных блоков, и эти блоки последовательно смещены друг относительно друга на $1/8$ периода. Мы наблюдали также редкие случаи, когда у здорового человека в каждом блоке было по 8 или даже по 10 строк.

Особенным примером отклонения от стандартного ментального растра является аномальный 12-блочный растр левши (или переученного левши).

Мании и депрессии возникают при устойчивых фазовых смещениях начала ментального растра на два $1/8$ -периодных блока в каждом из направлений. На телеэкране это выглядело бы как заворот растра снизу или сверху на четверть максимальной величины.

Эпилепсии можно поставить в соответствие скачок фазы эмоциональной волны на полпериода (от грани засыпания к грани пробуждения), восстанавливающий ментальное равновесие больного после соответствующего периода длительного, иногда многодневного накопления специфической усталости в работе мозга.

Заболеваниям шизофренией могли бы отвечать нестабильности фаз и/или частот ментального растра. Так в одном из 132 суточных самонаблюдений больного добровольца мы зарегистрировали скачок ментального растра на половину периода кадровой развертки. Это выглядело как переход в состояние аномального бодрствования в глубоком сне. И действительно, в своем ежедневном отчете этот волонтер тогда написал: «Слабость. Болею гриппом. Ночью снились осознанные сны с голосами. Переставлял предметы во сне. Странно, я не занимаюсь осознанными сновидениями довольно долго, но они все равно продолжают сниться». Этим частным наблюдением мы подтвердили своеобразный антагонизм между эпилепсией и шизофренией и даже отметили ортогональность направлений скачков фазы в них: условно говоря, «поперечного» — от грани засыпания к грани пробуждения и «продольного» — из бодрствования в самую глубину сна.

Описание посредством ментального растра основных ментальных аномалий обещает новые возможности в контроле психики, а также перспективы ее коррекции, в том числе безмедикаментозной. Например, через сайт golosavgolove.ru уже сейчас получают бесплатные консультации по индивидуальному ментальному растру; эта деятельность способствует дальнейшему накоплению экспериментального материала и инициализации прикладных работ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коломбет В.А. Ментальные миры. — Сознание и физическая реальность. 1997, т. 2, № 4, с. 15—24.
2. Коломбет В. Трансфизические миры. // В кн.: В. Коломбет. Трансфизические миры. Происхождение имен. — М.: КРОН-ПРЕСС, 2001. 864 с.
3. Коломбет В.А. «Синдром Стендаля» в свете гипнографии. // Прикладная психология и психоанализ. 2003, № 2, с. 11—27.
4. Коломбет В.А. ВММ — вычислительная машина мозга. // Вестник Калужского университета. 2006, № 2, с. 21—29.
5. Коломбет В.А. Введение в гипнографический психоанализ. — М. : ООО Мэйлер, 2008. 240 с.
6. Коломбет В.А. Реальный психоанализ в примерах. 2022. 288 с. (Подготовлено к печати).

ЗАВИСИМОСТЬ СИЛЫ МУТАНТНЫХ ПРОМОТОРОВ ГЕНА *rrnB* РИБОСОМАЛЬНОЙ РНК *E.COLI* ОТ ПАРАМЕТРОВ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА UP-ЭЛЕМЕНТА

Корчагина В.М.¹, Осипов А.А.^{1,2}

- 1 Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.
- 2 Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия.
e-mail: aosypov@gmail.com

ДНК имеет сильный отрицательный заряд, распределённый неравномерно. В области присоединения регуляторных белков значение потенциала выше, чем на остальной части цепи, что помогает белкам узнавать регулируемые участки и связываться с ними [1, 2]. Анализ электростатических характеристик ДНК помогает предсказывать её взаимодействие с регуляторными элементами, а изменение этих характеристик может помочь регулировать экспрессию белков [5].

Целью данной работы стало изучение зависимости силы мутантных промоторов гена *rrnB* рибосомальной РНК *E.coli* от параметров электростатического *up*-элемента.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Рассчитать зависимость силы промотора от максимальной величины потенциала в окне длиной в 21 пару оснований в -59 — -38 позиции относительно точки старта транскрипции для набора мутантных *up*-элементов.
2. Рассчитать зависимость силы промотора от суммарной величины потенциала в том же окне.

Последовательности и сила 62 мутантных промоторов взята из статей *Estrem, Ross et. Al* [3, 4]. Величина электростатического потенциала *up*-

элемента для последовательностей была рассчитана при помощи инструментов базы данных DEPPDB [1, 2].

Для проведения исследования была написана программа на языке R в программном обеспечении Rstudio. Анализ данных проводился при помощи построения зависимости силы промотора от параметров потенциала ψ -элемента, а их корреляционные взаимодействия исследованы при помощи статистического теста Пирсона.

В целом мы видим увеличение силы промотора как при увеличении абсолютной величины электростатического потенциала ($r = 0.4638153$), так и при увеличении абсолютной величины суммарного значения потенциала ($r = 0.5455484$).

Ур-элемент имеет дистальную и проксимальную части [3, 4, 5, 6], которые с разной силой способны связываться с альфа-субъединицей РНК-полимеразы [3, 6]. Поэтому при дальнейшем рассмотрении мы разделили наши данные на группы — полный ψ -элемент ($n = 33$), его проксимальная ($n = 8$) и дистальная ($n = 21$) части. После разделения по группам корреляция усилилась. В группе с полным ψ -элементом и в группе с его проксимальной частью наблюдается увеличение силы промотора с увеличением электростатических характеристик. Для абсолютной величины электростатического потенциала $r = 0.6025838$, для абсолютной суммарной величины потенциала $r = 0.5463801$. Для дистальной части ψ -элемента также наблюдается увеличение силы промотора как при увеличении абсолютной величины электростатического потенциала ($r = 0.5609531$), так и при увеличении абсолютной величины суммарного значения потенциала ($r = 0.5853439$), хотя и с меньшей интенсивностью. Все корреляции имели статистическую значимость p -value меньше 0,0001.

Выводы. Мы изучили зависимость силы мутантных промоторов гена *trnV* рибосомальной РНК *E.coli* от параметров электростатического потенциала ψ -элемента.

Сила промоторов растет в группах с полным ψ -элементом и его проксимальной частью с увеличением величины абсолютного и суммарного потенциала.

Сила промоторов с ψ -элементом из одной дистальной части растёт с увеличением величины абсолютного и суммарного потенциала, но меньше, чем для полного или проксимального ψ -элемента.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Osyrov 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. *Osyrov 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. *Estrem S.T., Ross W., Gaal T., Chen Z.S., Niu W., Ebright R.H., Gourse R.L.* (1999). Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase α subunit // *Genes & development*, 13(16), 2134—2147.
4. *Estrem S.T., Gaal T., Ross W., Gourse R.L.* (1998). Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 9761-9766.
5. *Presnell K.V., Flexer-Harrison M., Alper H.S.* Design and synthesis of synthetic UP elements for modulation of gene expression in *Escherichia coli* // *Synth Syst Biotechnol.* 2019 May 2;4(2):99-106. doi: 10.1016/j.synbio.2019.04.002. PMID: 31080900; PMCID: PMC6501063.
6. *Yan Q., Fong S.S.* Study of in vitro transcriptional binding effects and noise using constitutive promoters combined with UP element sequences in *Escherichia coli* // *J Biol Eng.* 2017 Nov 1;11:33. doi: 10.1186/s13036-017-0075-2. PMID: 29118850; PMCID: PMC5664571.

АКТИВАЦИЯ ИНТЕРФЕРОНОВОГО СИГНАЛИНГА, КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ МНОГОКЛЕТОЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

*Краснов К.С.^{1,2}, Сенотов А.С.¹, Кобякова М.И.¹, Ломовская Я.В.¹,
Краснова О.А.^{1,2}, Захаров К.Е.^{1*}, Акатов В.С.^{1,2}, Фадеев Р.С.^{1,2}*

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

* МБОУ СОШ № 1 им. Героя Советского Союза П.И. Чиркина г. Калининска Саратовской области.

² Пущинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» на базе ПушГЕНИ.

e-mail: kirill.krasnov64@gmail.com

На модели острого миелоидного лейкоза *in vitro* показана активация провоспалительных сигнальных путей в условиях формирования культур высокой плотности, активация интерферон-зависимых сигнальных путей и ассоциация подавляющего большинства дифференциально экспрессируемых генов с интерфероновой внутриклеточной сигнализацией.

Факторы формирования лекарственной устойчивости у клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) до конца не ясны. Тем не менее, известно, что на формирование клеточной резистентности (КР) при ОМЛ значительное влияние оказывает специфическое микроокружение, формируемое опухолевыми клетками [1].

В лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН была предложена модель, имитирующая межклеточные взаимодействия в патологическом костном мозге, которые формируются при ОМЛ. Для культуры клеток высокой плотности (КВП) было произведено РНК секвенирование и проведен анализ дифференциальной экспрессии генов, и анализ обогащения наборов генов (АОНГ) в сравнении с чувствительными к воздействию противоопухолевыми препаратами клетками [2]. АОНГ производился с использованием GSEApy (v. 1.0.0) и наборов генов из коллекции общих признаков базы данных молекулярных сигнатур (MSigDB). По данным АОНГ показана активация провоспалительных сигнальных путей — сигнальный путь ФНО через NF- κ B и ИЛ6-JAK/STAT3, что может быть одним из факторов формирования КР при ОМЛ.

При более детальном изучении данных АОНГ в КВП было обнаружено обогащение наборов генов, связанных с активацией сигнальных путей ИНФ- α и ИНФ- γ , показатели обогащения которых превышали таковые для наборов генов сигнальных путей ФНО через NF- κ B и ИЛ6-JAK/STAT3, что, вероятно, оказывает большее влияние на формирование клеточной резистентности.

Кроме того, выявленные 121 дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) [2] были проанализированы с использованием базы данных Interferome (v. 2.01), в которой содержится информация об ассоциации генов с интерфероновым сигналингом. Получено, что из 121 ДЭГ гена 118 ассоциированы с регуляцией интерфероновых сигнальных путей, в результате чего можно предположить, что активация интерферон-зависимых сигнальных путей в КВП может вносить значительный вклад в развитие многоклеточной резистентности, формирующейся в условиях формирования клеточного микроокружения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ladikou E.E. et al.* Acute myeloid leukaemia in its niche: the bone marrow micro-environment in acute myeloid leukaemia // *Current Oncology Reports*. 2020. V. 22. P. 1—9;
2. *Kobyakova M. et al.* The Increase in the Drug Resistance of Acute Myeloid Leukemia THP-1 Cells in High-Density Cell Culture Is Associated with Inflammatory-like Activation and Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins / *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. V. 23. № . 14. P. 7881.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОЭМУЛЬСИИ НА ОСНОВЕ ТЕРПЕНОИДОВ

Краснова О.А.^{1,2}, Минайчев В.В.¹, Краснов К.С.^{1,2}, Акатов В.С.¹, Фадеева И.С.^{1,2}

- ¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН.
- ² Пушкинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» на базе ПущГЕНИ.

e-mail: okras.iteb@gmail.com

В условиях *in vitro* и *in vivo* показано, что разработанная ранее в лаборатории и полученная методом гомогенизации высокого давления высокостабильная терпеноидная наноэмульсия безвредна, не обладает токсическим, в том числе иммунотоксическим действием, и собственной антигенной активностью даже при ее введении лабораторным животным в максимальной толерантной дозе. При этом выявлено, что исследуемая эмульсия при совместном введении с антигеном усиливает его иммуногенность более чем в 30 раз, а также независимо от антигена обладает собственным прямым иммуностимулирующим действием и может быть использована как потенциальное средство повышения резистентности организма к инфекционному поражению.

Неоднократные вспышки опасных инфекций, таких как SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2, свидетельствуют о невозможности ликвидации «прибоя» новых патогенов [1]. В борьбе с распространением заболеваний главным оружием является вакцинация, для увеличения эффективности которой используют адъюванты, однако проведение ее в короткие сроки — это невыполнимая задача, поэтому крайне необходимым является разработка иммуностимулирующих препаратов, способных действовать превентивно и повышать резистентность человека к потенциальному инфекционному поражению [2].

В Лаборатории биомедицинских технологий ИТЭБ РАН была предложена рецептура наноэмульсии с использованием терпентинного масла, которая по исследуемым показателям была признана безопасной и обладала выраженным иммуностимулирующим действием.

На эмбриональных фибробластах мышцы линии NIH3T3 было показано, что инкубация клеток с наноэмульсией достоверно не влияет на увеличение общего числа погибших клеток в культуре и индукцию появления дву- и одностранных разрывов ДНК, что свидетельствует об отсутствии цитотоксического действия. Аналогично не было выявлено и гемолитического действия эмульсии на эритроциты периферической крови человека. В условиях *in vivo* оценка острой токсичности эмульсии путем введения максимальной толерантной дозы лабораторным

мышам в объеме 50 мл/кг показала отсутствие влияния эмульсии на массу тела, потребление корма и поведенческие показатели животных. В процессе введения препарата, а также на всем протяжении исследования не было отмечено клинических признаков отклонения в состоянии здоровья животных, что также подтвердили результаты некропсии. Таким образом, по оцениваемым параметрам наноэмульсия признана безвредной (ГОСТ 31926-2013, ГОСТ Р 56700-2015).

Целью иммунологических испытаний было определение влияния разработанной эмульсии на основные факторы гуморального и клеточного иммунитета. Установлено, что введение наноэмульсии лабораторным мышам не приводит к изменению титра IgM, IgG и IgE, а также достоверно не влияет на уровень гистамина, ответственного за развитие воспаления и гиперчувствительности немедленного типа. Фагоцитарный индекс и фагоцитарное число моноцитов после инкубации с эмульсией как показатели активации клеточного иммунитета составили $97 \pm 2\%$ и $189\,000 \pm 15\,000$ соответственно, и достоверно не отличались от контрольных образцов. Инкубация мононуклеарных клеток периферической крови мышей в течение 72 ч с наноэмульсией также не привела к увеличению числа Ki-67-позитивных пролиферирующих клеток как в условиях поликлональной активации, где показатель эмульсии составил $55 \pm 2\%$ от общей популяции и достоверно ($p \geq 0.05$) не отличался от $58 \pm 5\%$ в контроле, так и без поликлональной активации, где показатель во всех группах не превысил 1%. Таким образом, показано, что наноэмульсия на основе терпеноидов не оказывает влияния на пролиферативную активность лимфоцитов, фагоцитарную активность моноцитов и продукцию основных гуморальных факторов иммунной системы, что свидетельствует об отсутствии иммунотоксичности и собственных антигенных свойств у наноэмульсии.

Иммунизация лабораторных животных модельным антигеном в комплексе с эмульсией с целью оценки ее иммуностимулирующих свойств показала многократное увеличение титра ксеноспецифичных антител относительно контроля и четырехкратное увеличение этого показателя относительно общепризнанного наноэмульсионного адьюванта MF59. Также в модели генерализованного заражения мышей клещами *Myocoptes musculus* была выявлена выраженная активация систем естественной резистентности организма к модельному заболеванию, вследствие чего у всех особей, получивших наноэмульсию, не было отмечено признаков развития инфекции. С помощью дифференциального гистологического анализа в образцах кожи контрольных неинъецированных животных были обнаружены все типичные для заражения патологические изменения морфологии кожи, такие как акантоз, гиперкератоз, серозноклеточное образование корок и непосредственно фолликулярные формы клещей на разных стадиях развития. Помимо этого, были отмечены ярко выраженные признаки активного воспаления: трех-

кратное утолщение дермы, инфильтрация подкожного слоя мононуклеарными клетками, скопление большого количества тучных клеток (470 ± 85 клеток/мм²), в том числе дегранулирующих, в то время, как все инъецированные животные имели неотличимую от незараженного контроля «чистую» гистологию кожи.

Таким образом, можно заключить, что разработанная эмульсия обладает значительным иммуностимулирующим и иммуноактивирующим потенциалом и может быть использована в качестве адьюванта и как основа для иммуностимулирующего лекарственного препарата.

В результате работы показано, что разработанная наноэмульсия на основе терпеноидов обладает высоким профилем безопасности, не проявляет токсичности, в том числе иммунологической, и не проявляет собственных антигенных свойств. В то же время в исследовании иммуотропных свойств наноэмульсия продемонстрировала значительное иммуноактивирующее действие, что открывает возможности использования разработанной субстанции в качестве адьювантов человеческих и ветеринарных вакцин, а также в роли самостоятельного иммуностимулирующего лекарственного средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Marani M. et al.* Intensity and frequency of extreme novel epidemics // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2021. V. 118, № 35. P. 1—4.
2. *Del Giudice G., Rappuoli R., Didierlaurent A.M.* Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines // Semin. Immunol. Elsevier, 2018. V. 39, № May. P. 14—21.

ВАРИАЦИИ УРОВНЕЙ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ МЫШЕЙ В РАЗНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ УГЛЕРОДА В ПИКЕ БРЭГГА ИЛИ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Кузнецова Е.А.^{1}, Розанова О.М.¹, Смирнова Е.Н.¹, Глухов С.И.¹, Сирота Т.В.¹,
Белякова Т.А.²*

¹ ФГБУН ИТЭБ РАН, Пущино, Россия.

² ФТЦ ФИАН, Протвино, Россия.

* e-mail: kuzglu@rambler.ru

Если исключить возможность радиационных аварий и террористических актов, то основные задачи радиобиологических исследований в настоящее время связаны с решением проблем радиотерапии и освоением космоса. По-

бочным эффектом облучения организмов при терапии и долговременных полетах является возникновение злокачественных новообразований, что делает актуальным изучение последствий воздействия ионизирующих излучений как для выявления факторов риска и обеспечения безопасности космонавтов, так и для оптимизации протоколов лечения онкологических пациентов. В этой связи востребованы исследования воздействия на живые организмы и фотонов, и ускоренных частиц, присутствующих в космических излучениях и используемых для лечения опухолей. В последнее время большой интерес для радиотерапии представляют исследования с применением ускоренных тяжелых ионов, поскольку основную энергию они отдают в конце пробега в пике Брэгга [1], что позволяет минимизировать повреждение окружающих здоровых тканей.

Цель работы: оценить выживаемость и уровни повреждений ДНК лейкоцитов крови у индивидуальных животных в отдаленные сроки после воздействия на мышей ускоренных ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в пике Брэгга в дозе 6,5 Гр, сравнить динамику изменений уровней повреждений ДНК лейкоцитов с таковой после воздействия рентгеновского излучения в той же дозе.

Определяли: выживаемость мышей, облученных ускоренными ионами углерода в пике Брэгга или рентгеновским излучением в дозе 6,5 Гр; методом ДНК-комет [2] — уровни повреждений ДНК (% TDNA) в лейкоцитах крови мышей за 1 сут. до и через 1—23 сут. после облучения ионами углерода в дозе 6,5 Гр и через 1—28 сут. после воздействия рентгеновского излучения. Повреждение ДНК выражали в процентах ДНК, содержащейся в хвосте кометы, относительно общего количества ядерной ДНК (%TDNA). Мышей облучали на установке «Радиобиологический стенд на углеродном пучке У-70» НИЦ «Курчатовский институт» — ИФВЭ (г. Протвино, Россия) пучком ускоренных ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в пике Брэгга в дозе 6,5 Гр, в соответствии с [3]. Параллельно мышей облучали на рентгеновской установке «РУТ-250-15-1» в ЦКП «Источники излучений» ИБК РАН (г. Пущино) при мощности дозы 1,12 Гр/мин, напряженности 200 кВ, силе тока 20 мА, фильтры 1 мм Al и 1 мм Cu, фокусное расстояние 37 см.

Обнаружили: большее повреждающее действие ионов углерода по сравнению с рентгеновскими лучами по критерию выживаемости и уровню повреждений ДНК. Выявлена вариация уровней повреждений ДНК лейкоцитов крови, как в группах животных, так и у индивидуальных мышей в отдаленные сроки после облучения ионами углерода. Различия %TDNA на 16 сут. после облучения между мышами № 1 и 2, 2 и 3, 2 и 4, 3 и 5, а также на 23 сут. между

мышами 2 и 4, 2 и 5, 3 и 5, 4 и 5 статистически достоверны ($p < 0,05$). При сравнении динамики изменений % TDNA при облучении ионами с таковой при воздействии рентгеновского излучения у индивидуальных животных обнаружено, что и диапазон значений % TDNA, и их вариабельность наиболее явно выражены при облучении ионами углерода, что свидетельствует о большей нестабильности генома после воздействия ионов. Можно полагать, что более высокий % TDNA лейкоцитов после облучения ионами углерода по сравнению с рентгеновским излучением, его больший диапазон и несинхронность изменений у индивидуумов в пострадиационном периоде связаны с возникновением кластерных повреждений в ДНК и дисфункцией митохондрий, а также обусловлены генетическими и эпигенетическими факторами. Значение уровня повреждений ДНК в клетках крови лабораторных животных в формировании отдаленных последствий на организменном уровне требует дальнейшего исследования для разработки новых и совершенствования традиционных тест-систем с использованием моделей животных в свете развития персонализированной биомедицины.

Работа была выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00381-21-00.

Благодарности: Авторы выражают глубокую благодарность сотруднику Лаборатории ионного лучевого комплекса НИЦ «Курчатовский институт» Пикалову В.А. за помощь в организации и проведении экспериментов на оборудовании «Радиобиологического стенда на углеродном пучке У-70» и сотруднику Лаборатории клеточной инженерии ИТЭБ РАН Заичкиной С.И. за инициирование данного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Azzam E.I., Jay-Gerin J.P., Pain D.* Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury *Cancer Lett.* 2012. 327 (1—2), 48-60. doi:
2. *Collins A.R., Oскоz A.A., Brunborg G., Gaivão I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C.C., Stetina R.* The comet assay: topical issues // *Mutagenesis.* 2008 May;23(3):143-51. doi: 10.1093/mutage/gem051. PMID: 18283046.
3. *Kuznetsova E.A., Sirota N.P., Mitroshina I.Y., Pikalov V.A., Smirnova E.N., Rozanova O.M., Glukhov S.I., Sirota T.V., Zaichkina S.I.* DNA damage in blood leukocytes from mice irradiated with accelerated carbon ions with an energy of 450 MeV/nucleon // *Int J Radiat Biol.* 2020 Oct;96(10):1245—1253. doi: 10.1080/09553002.2020.1807640. PMID: 32780609.

УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ ЖИВОТНЫХ НА МОДЕЛИ УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ

*Куликов А.В.¹, Глазкова П.А.², Глазков А.А.², Куликов Д.А.^{3,4}, Гаврилюк В.Б.¹,
Брусков В.Б.¹, Архипова Л.В.¹*

- ¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.
- ² Московский областной научно-исследовательский клинический институт, Москва, Россия.
- ³ Московский государственный областной педагогический университет, Мытищи, Россия.
- ⁴ Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья, Москва, Россия.

e-mail: 29.04.55@mail.ru

Вопрос увеличения продолжительности жизни является одним из наиболее важных и над его решением в мире работают многие медико-биологические коллективы. Известно, что в организме млекопитающих с возрастом происходит необратимая атрофия тимуса [1, 2]. Снижение иммунной реактивности и противоопухолевой резистентности, также является следствием возрастной инволюции тимуса [3, 4]. Замедление скорости возраст зависимой атрофии тимуса может привести к увеличению минимальной, максимальной и средней продолжительности жизни. Разработанный нами ранее метод трансплантации тимуса в иммунопривелегированную переднюю камеру глаза показал хорошие результаты в этой области [5]. Предложенный метод был очень удобен для экспериментальных исследований, но использование его в клинической практике казалось мало вероятным. Поэтому мы провели ряд экспериментов на модели ускоренного старения организма.

В опыт брали 2 группы мышей (SHK): 1-я — контроль (облучение в дозе 6 Гр, без трансплантации), 2-я — трансплантация тимуса после облучения в дозе 6 Гр. Доноры тимуса — мыши весом 15 гр. Второй группе проводили аллотрансплантацию тимуса подкожно в предварительно сформированный карман между лопатками.

Облучение проводили на установке (терапевтическая РУТ-250-15-1). Облучали в дозе 1 Гр в мин в течение 6 мин, т.е. суммарная доза облучения составила 6 Гр.

Все 100% из 1-й группы облученных животных погибли на сроках 8—25 дней. Во 2-й группе, где в качестве трансплантируемой ткани выступали иммунокомпетентные клетки тимуса, к 92 дню эксперимента были живы 44%

мышей, подвергнутых облучению летальной дозой радиации. После указанного срока провели декапитацию животных под эфирным наркозом. В докладе будут представлены сравнительные графики и таблицы по нескольким физиологическим показателям.

Известно, что если проводить аллотрансплантацию ткани в области не являющиеся иммунокомпетентными, трансплантат вследствие иммунологической атаки отторгается не позже чем за 2 недели и естественно было предположить, что его благоприятное воздействие на организм реципиента должно длиться не на много дольше. Значительно более длительное протекторное воздействие ткани тимуса на организм мышей при ускоренном старении, на наш взгляд, объясняется тем, что радиационное облучение очень значительно снижает количество иммунокомпетентных клеток, которые и являются основными агентами отторжения трансплантата.

Разработанный метод, после прохождения всех разрешительных процедур, может быть использован для защиты здоровья сотрудников атомных объектов, подвергшихся радиационному облучению вследствие террористических атак или техногенных катастроф, как средство быстрого реагирования в случае применения на территории страны «грязной бомбы», и метод реабилитации космонавтов после длительных космических полетов с многочасовыми выходами в открытое пространство.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИТЭБ РАН № 007-00-94-18-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Анисимов В.Н.* Молекулярные и физиологические механизмы старения. — СПб.: Наука, Т. 2008. 481 с.
2. *Csaba G.* The immunoendocrine thymus as a pacemaker of lifespan // *Acta Microbiol. Immunol. Hungarica.* 2016. V. 63. № 2. P. 139—158.
3. *Gress R.E., Deeks S.G.* Reduced thymus activity and infection prematurely age the immune system // *J. Clin Invest.* 2009. V. 119. № 10. P. 2884—2887.
4. *Shaw A.C., Joshi S., Greenwood H. et.al.* Aging of the innate immune system // *Curr Opin Immunol.* 2010. V. 22. Issue 4. P. 507—513.
5. *Куликов А.В., Архипова Л.В., Куликова П.А., Глазков А.А., Мндлян Е.Ю., Гаврилюк В.Б., Куликов Д.А.* Влияние сезона рождения и трансплантации тимуса на продолжительность жизни экспериментальных животных // *Известия РАН. Серия биологическая.* 2019 № 1 С. 38—42.

КОРРЕКЦИЯ ТЯЖЕЛОГО СТРЕССА У ЖИВОТНЫХ С ПОМОЩЬЮ МЕТАБОЛИТНОЙ ТЕРАПИИ — ИНИЦИАЦИИ РЕАКЦИЙ «АКТИВАЦИИ»

*Маевский Е.И., Гришина Е.В., Васильева А.А., Закаров А.М., Богданова Л.А.,
Учитель М.Л.*

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской
академии наук, Пушино.
e-mail: eim11@mail.ru

Реакции «активации» повышают
адаптивность организма
[Л. Гаркави, Е. Квакина и др., 2002]

Усиление действия раздражителя в широком диапазоне интенсивностей от малых «гомеопатических» до повреждающих стрессовых и патологических воздействий вызывает развитие череды последовательных ответных реакций организма: «тренировки», «активации», «острого стресса», «хронического стресса» и «ареактивности». Важно, что эти состояния могут наблюдаться на разных по интенсивности и по дозе уровнях [1]. Это явление было открыто коллективом Ростовских исследователей — онкотерапевтов Л. Гаркави, Е. Квакиной, М. Уколовой, и со временем было признано физиологами в качестве развития учения Г. Селье [2] о стрессе как неспецифической реакции организма на повреждение. Открытие ростовских ученых успешно развивалось в совместных исследованиях с научной школой М.Н. Кондрашовой. Сотрудниками научной школы было обнаружено, что при мягком физиологическом стрессе средства метаболитной терапии, обладающие сигнальным действием, позволяют избежать развития острого стресса. Параллельно Л. Гаркави и сотрудники [3] показали, что наиболее высоким адаптивным потенциалом организм человека обладает в тех случаях, когда нейро-эндокринный статус и биомаркеры периферической крови свидетельствуют о наличии состояния «активации». Однако вопрос о том, можно ли с помощью метаболитной терапии инициировать на фоне тяжелого стресса состояние «активации» оставался нерешенным. Ответ на этот вопрос в какой-то мере представлен в настоящем исследовании.

Тяжелый стресс моделировали путем односторонней овариэктомии (ООЭ) у самок крыс Wistar весом 250—270 г. Дополнительно оперированные животные получали два курса инъекций преднизолона. При тяжелом стрессе в соответствии с канонами Г. Селье эстральный (овуляторный) цикл прерывался (по

данным ежедневного цитологического контроля влагилищного мазка у самок крыс). Согласно лимфоцитарному индексу (ЛИ) — отношение количества лимфоцитов к количеству нейтрофильных лейкоцитов, и цитобиохимически определяемой в лимфоцитах крови активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), определяемой цитобиохимически [4], состояние животных было охарактеризовано как «хронический стресс». Для купирования стресса использовали: 1) сукцинат-содержащую композицию (ССК), аналогичную по составу биологически активным добавкам «Энерлит-Клима» (“Amberen”) в дозе 33 мг/кг и 2) комплекс витаминов группы В (В1, В2, В6, В9, В12) в дозе 1,5 мг/кг. Эти средства метаболитной терапии добавляли животным в специальный рацион ежедневно в течение 2 недель.

В течение 5 недель после ООЭ у животных постоянно сохранялись признаки стресса: снижение ЛИ, увеличение продолжительность нерепродуктивных фаз (Нф) эстрального цикла — диэструса и метэструса, укорочение репродуктивных фазы (Рф) — проэструса и эструса. Одновременно наблюдалось снижение активности СДГ в клетках крови. При забое животных было обнаружено падение отношения массы тимуса к массе надпочечников (Т/Н) по сравнению с интактными животными. Раздельное введение в рацион ССК или витаминной композиции в течении 2-х недель существенно не меняло состояние животных по сравнению с животными, перенесшими ООЭ, но не получавшими метаболитной терапии. На фоне стресса (ООЭ) 2-недельный курс сочетания ССК и витаминной добавки восстанавливал соотношение Нф/Рф до уровня, наблюдаемого у интактных самок крыс. Одновременно обнаружен существенный прирост активности СДГ в лимфоцитах крови животных, повышение ЛИ и отношения Т/Н.

Таким образом проведенное исследование продемонстрировало возможность с помощью метаболитной терапии, включающей сочетание ССК и комплекса витаминов группы В, выйти их «хронического стресса» в состояние «активации».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А.* Адаптационные реакции и резистентность организма / 3-е изд., доп. — Ростов н/Д : изд-во «Рост». ун-та, 1990. 223 с.
2. *Селье Г.* Очерки об адаптационном синдроме / пер. с англ. — М. : ИЛ. 1960, 460 с.
3. *Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Кузьменко Т.С., Шихлярова А.И.* Антистрессорные реакции и активационная терапия. Реакция активации как путь к здоровью через процессы самоорганизации. — Екатеринбург : РИА «Филантроп». 2002. 196 с.
4. *Кондрашова М.Н., Захарченко М.В., Хундерякова Н.В., Маевский Е.И.* Цитобиохимический способ определения активности сукцинатдегидрогеназы, окисления эн-

догенной янтарной кислоты, сигнального действия микромолярных концентраций янтарной кислоты, его применение для количественной оценки уровня адренергической регуляции в организме, среда и набор для осуществления способа. № 2364868. 20.08.2009.

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ НА ИХ БИОЛОГИЧЕСКУЮ СОВМЕСТИМОСТЬ И СПОСОБЫ ЕЁ ПОВЫШЕНИЯ

Минайчев В.В.^{1,2}, Смирнов И.В.², Тетерина А.Ю.², Фадеев Р. С.¹, Михеева П.В.², Менухов В.О.^{1,3}, Кобякова М.И.^{1,2}, Звягина А.И.¹, Пятинина К.В.^{1,3}, Акатов В.С.¹, Фадеева И.С.^{1,2}

- ¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, РФ.
- ² ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, РФ.
- ³ Пущинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» на базе ПушГЕНИ, Пущино, РФ.

e-mail: vminaychev@gmail.com

Разработка высокоэффективных остеопластических материалов для заполнения дефектов костной ткани различной этиологии (возрастные изменения, травмы и заболевания) продолжает оставаться актуальной и не до конца решенной задачей. На сегодняшний день центральной парадигмой разработки является создание материалов с остеогенными свойствами, то есть способных стимулировать собственную регенерацию поврежденной костной ткани, что особенно актуально для критически-размерных дефектов. При этом существующие материалы не обладают необходимыми остеогенными свойствами, и, кроме того, зачастую могут препятствовать процессу регенерации костной ткани.

Среди большого разнообразия остеопластических материалов, как природного, так и синтетического происхождения, наибольшее распространение получило использование материалов на основе синтетических кальций-фосфатных соединений (КФС). Интерес к их использованию обусловлен прежде всего их схожестью с минеральным компонентом костной ткани. По сравнению с другими видами остеопластических материалов КФС отличаются простотой синтеза, возможностью получения материалов с разнообразными прочностными характеристиками и сложной геометрией, а также показанной в

ряде работ способностью стимулировать регенерацию костной ткани. Однако, несмотря на все перечисленные преимущества, ответ организма на КФС зачастую ограничивается либо фиброзной инкапсуляцией материала, либо имплант-ассоциированной костной резорбцией, что приводит к дополнительному повреждению организма и необходимости реоперации. Подобный нестабильный эффект КФС связан, прежде всего с тем, что биологические свойства КФС зависят от их физико-химических характеристик, варьируя которые, можно получать материалы с различной степенью биосовместимости. При этом вследствие большого числа физико-химических параметров (размер частиц, заряд, степени кристалличности и др.) данный вопрос остается не до конца изученным. Таким образом, на основе всего вышесказанного целью работы являлось исследование влияния физико-химических свойств различных кальций-фосфатных биоматериалов на их биологическую совместимость, а также модификация КФС на основе полученных данных с целью ее повышения.

На первом этапе работы было произведено исследование пастообразного наноразмерного гидроксиапатита (нГАп). Был выявлен ряд факторов, ограничивающих биоинтеграцию нГАп в организме, такие как слабые адгезионные свойства и агрегация частиц нГАп в организме. В исследованиях *in vitro* на культуре мышечных мезенхимальных клеток линии СЗН/10/T1/2 было показано, что нГАп не способен обеспечивать нормальную адгезию клеток к своей поверхности, что приводит к их аноикису. Исследование *in vivo* в модели гетеротопической имплантации показало, что нГАп образует в организме нерезорбирующиеся агрегаты, блокирующие миграцию клеток в материал, а также процессы неокостогенеза на нем, включая инкапсуляцию материала. При этом, добавление к нГАп деминерализованной ксеногенной костной крошки в качестве остеокондуктивного компонента, способствовало заселению материала клетками, резорбции нГАп и построению структурированного трабекулоподобного неокостогенового матрикса.

Исследование физико-химических свойств нГАп показало гетерогенность фазового состава данного материала с преобладанием аморфной фазы. Поскольку в физиологических условиях образование гидроксиапатита костной ткани происходит через ряд промежуточных КФС, было решено провести исследование биосовместимости КФС-предшественников гидроксиапатита костной ткани, таких как дикальций-фосфат дигидрат (ДКФД) и октакальций фосфат (ОКФ), полученных низкотемпературным синтезом. Кроме того, в качестве контрольных КФС использовали аморфный ГАп (амГАп) и ГАп, полученный с использованием высокотемпературного синтеза (спечГАп). В ходе проведенных исследований *in vitro* было показано, что все КФС в больших

концентрациях (>1 мг/мл) оказывают цитотоксическое действие на мезенхимальные клетки, связанное, по-видимому, с высвобождением большого количества ионов Ca^{2+} в процессе перекристаллизации КФС. При этом наибольший цитотоксический эффект наблюдался для амГАп и ОКФ, а наименьший — для ДКФД и спечГАп.

Поскольку одним из наиболее перспективных КФС является ОКФ (благодаря своим остеоиндуктивным свойствам и способности трансформироваться в природный ГАп в физиологических условиях), было предложено модифицировать его кристаллическую структуру с целью снижения цитотоксических и повышения остеоиндуктивных свойств. Одним из применяемых на сегодняшний день подходов к модификации КФС является замещение ионов Ca^{2+} в кристаллической решетке на ионы других металлов. В исследовании было произведен низкотемпературный синтез ОКФ, допированного ионами Sr^{2+} и исследованы его цитотоксические свойства и влияние на физиологическое состояние мезенхимальных клеток линии СЗН/10Т1/2. Выбор Sr^{2+} обусловлен тем, что по литературным данным Sr^{2+} способствует образованию кости остеобластами и подавляет резорбцию кости остеокластами. Кроме того, он также оказывает прямое воздействие на минерализованный костный матрикс, непосредственно встраиваясь в него. Полученные результаты продемонстрировали значительное снижение цитотоксического эффекта ОКФ на клетки при содержании стронция 20% и 50%.

На основании полученных данных другим способом повышение биосовместимости КФС являлось их сочетание с деминерализованным костным матриксом (ДКМ), т. е. создание биомиметического материала, максимально приближенного по своему составу к нативной костной ткани. В качестве КФС для данного исследования использовали ДКФД. Биомиметический материал получали путем осаждения ДКФД из раствора на поверхность ДКМ при комнатной температуре и близкому к физиологическому рН.

Гистологический анализ образцов после гетеротопической имплантации показал наличие интратрабекулярной минерализации ДКМ и формирование неоколлагеновых трабекулоподобных структур, что не наблюдалось в ДКМ без КФС. Все это свидетельствует о значительном увеличении остеоиндуктивных и остеогенных свойств ДКМ при сочетании с ДКФД.

Проведенные исследования указывают на необходимость модификации КФС для повышения их биологической совместимости и остеоиндуктивного эффекта. Полученные данные указывают на перспективность подхода создания биомиметических материалов на основе ДКМ, реминерализованных биосовместимыми формами КФС.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИТЭБ РАН, при частичной финансовой поддержке фонда РФФИ в рамках проекта № 21-73-20251 с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН.

МОДЕЛЬ ФАЗОВЫХ ОТНОШЕНИЙ ИНТЕРНЕЙРОНОВ ОТНОСИТЕЛЬНО ТЕТА-РИТМА В ПОЛЕ CA1 ГИППОКАМПА

Мысин И. Е.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: imysin@mail.ru

Гиппокамп — это структура мозга, являющаяся ключевым звеном в процессах внимания и формировании памяти. Для анализа информации нейронные ансамбли гиппокампа нуждаются в синхронизации с помощью ритмов. Главным ритмом, организующим нейронную активность гиппокампа во время решения когнитивных задач, является тета-ритм (4—12 Гц). Почти все нейроны гиппокампа модулируются тета-ритмом [1]. Это выражается в том, что каждая популяция имеет фазу тета-ритма, в которую вероятность разрядов её нейронов максимальна. Предыдущие попытки объяснить фазовые отношения для большого числа нейронов не были успешными [2]. Мы рассмотрели механизм формирования фазовых отношений для популяций интернейронов (тормозных нейронов) поля CA1. Поле CA1 было выбрано, поскольку имеется наибольшее число данных об активности интернейронов для этой области гиппокампа.

Основная проблема при построении модели распределения нейронов по фазам тета-ритма — это выявление механизма стабилизации антагонистических отношений между разными популяциями интернейронов. Например, парвальбумин-содержащие (PV) и холецистокинин-содержащие (ССК) корзинчатые нейроны тормозят друг друга и разряжаются на противоположных фазах тета-ритма [3]. Однако существует небольшой диапазон параметров связей и входов на эти нейроны, когда они формируют устойчивую противофазную активность. В большом числе случаев одна из популяций полностью подавляет вторую. При рассмотрении большого числа популяций интернейронов из разных областей гиппокампа задача многократно усложняется. Мы предположили, что кратковременная синаптическая депрессия осуществляет стабилизацию структуры активности интернейронов. Мы начали рассмотрение с сети, состоящей двух взаимно тормозных популяций нейронов. Результаты вычис-

лительных экспериментов показали, что добавление в модель кратковременной синаптической депрессии дает стабилизацию противофазного режима разрядов в широком диапазоне параметров. Синаптическая депрессия осуществляет функцию обратной отрицательной связи. Если нейроны первой популяции разряжаются очень долго, их синапсы депрессируются. Это дает возможность второй популяции выйти из-под тормозного влияния и начать разряжаться.

На втором этапе мы рассмотрели уже сеть биологически правдоподобную сеть, состоящую из 7 популяций интернейронов: PV и ССК корзинчатые нейроны, дендритные, нейроглиаформные, аксо-аксональные, Иви и OLM (*Oriens-lacunosum moleculare*) клетки. Нейроны этих популяций составляют около 70% всех интернейронов поля CA1. Также в модели мы учитывали входы от пирамидных нейронов полей CA3 и CA1, а также от нейронов 3-го слоя энторинальной коры. Связи нейронов были взяты из данных проекта Hippocampome.org [4]. Далее мы оптимизировали параметры пластичности синапсов в нашей сети для наилучшего описания экспериментальных данных о фазовых отношениях. Мы смогли подобрать параметры и получить хорошее приближение. Таким образом гипотеза о роли кратковременной депрессии тормозных синапсов как отрицательной обратной связи необходимой для формирования фазовых отношений подтверждена вычислительными экспериментами.

Работа поддержана грантом РФФ № 20-71-10109.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Mizuseki K., Sirota A., Pastalkova E., Buzsáki G.* Theta oscillations provide temporal windows for local circuit computation in the entorhinal-hippocampal loop. *Neuron*. 2009 Oct 29;64(2):267–80.
2. *Mysin I.* A Model of the CA1 Field Rhythms // *eNeuro*. 2021. № 6 (8).
3. *Somogyi P., Katona L., Klausberger T., Laszłóci B., Viney T.J.* Temporal redistribution of inhibition over neuronal subcellular domains underlies state-dependent rhythmic change of excitability in the hippocampus // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014 Feb 5;369(1635):20120518.
4. *Moradi K., Aldarraji Z., Luthra M., Madison G.P., Ascoli G.A.* Normalized unitary synaptic signaling of the hippocampus and entorhinal cortex predicted by deep learning of experimental recordings // *Commun Biol*. 2022 May 5;5(1):418.

БИОИНФОРМАТИКА, НЕЙРОБИОЛОГИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ И ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ

Осипов А.А.^{1,2}

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

² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия.

e-mail: aosypov@gmail.com

Представлена связь между биоинформатикой, нейробиологией нового поколения и искусственным интеллектом.

Биоинформатика использует методы традиционного искусственного интеллекта для анализа данных и в свою очередь поставляет данные и онтологии для инструментов ИИ типа систем поддержки принятия врачебных решений.

Вводится понятие: «нейробиология нового поколения» — этап развития нейробиологии, который характеризуется использованием методов автоматического получения и анализа массовых данных, применением неинвазивных высокоразрешающих методов, тесной интеграцией с биоинформатикой и разработками в области традиционного ИИ. Нейробиология нового поколения использует биоинформатику для получения и анализа массовых геномных данных, а также адаптирует ее подходы и методы для анализа больших данных собственных специфических типов. Приводятся примеры исследований, в которых используются указанные данные и методы, и описываются современные системы депонирования интегрированных массовых данных.

Нейробиология нового поколения поставляет данные для изучения структурного и функционального устройства и фундаментальных механизмов функционирования мозга как носителя естественного интеллекта для создания его функциональной модели, способной выполнять основные когнитивные задачи сильного искусственного интеллекта.

Вводится понятие: «средний нейроморфный искусственный интеллект» — промежуточный между узкоспециализированным реактивным слабым ИИ и универсальным проактивным сильным ИИ. Средний нейроморфный искусственный интеллект характеризуется универсальностью, реактивностью и ограниченной нейроморфностью. Универсальность позволяет выполнять необходимые комплексные когнитивные функции. Реактивность снимает этические проблемы безопасности человечества и неумножения страданий мыслящих существ, а также задачу создания эмоционально-мотивационного блока, системы регуляции внимания и т.д. Огра-

ниченнная нейроморфность вызвана неполнотой наших знаний об устройстве мозга как субстрата когнитивной деятельности, отсутствием нужды в системах жизнеобеспечения, эмоционально-мотивационного блока, системы регуляции внимания и т.п. Также ограничение нейроморфности вызваны необходимостью решать некоторые задачи ввода/вывода, обработки и хранения информации, недоступные для живых систем, но желательные для функционирования искусственного интеллекта как инструмента человеческой деятельности.

В свою очередь, создание среднего искусственного интеллекта позволит систематизировать накопленные научные знания на беспрецедентном уровне и принципиально повысить эффективность научного труда.

БЛОКАДА НАДФН-ОКСИДАЗЫ 2 ПРЕДОТВРАЩАЕТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И МИКРОГЛИОЗ В ГИППОКАМПЕ МЫШЕЙ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ АМИЛОИДНОЙ ТОКСИЧНОСТИ

*Осинов А.А.^{1,2}, Любанская А.Д.³, Мухина К.А.^{1,3}, Иваненко А.⁴,
Никифорова А.Б.¹, Попова И.Ю.^{1*}*

- ¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.
- ² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия.
- ³ Московский государственный университет им. Ломоносова, Москва, Россия.
- ⁴ МБОУ СОШ № 9, г. Казань, Россия.
- * *e-mail:* i-yu-porova@yandex.ru

Разработка ранней терапии болезни Альцгеймера (БА) является актуальной проблемой современной биологии и медицины из-за отсутствия понимания механизмов инициации заболевания. Основные факторы риска БА связаны с окислительным стрессом, в который очень существенный вклад вносит 2 изоформа НАДФН-оксидазы (NOX2). Экспериментальные исследования показали, что во время патологии NOX2 вносит основной вклад в окислительный стресс клеток и, таким образом, может представлять собой фармакологическую мишень для прямой и эффективной терапии. Целью данного исследования было выяснить как влияет блокада NOX2 на биохимические и иммуногистохимические маркеры развития патологии у мышей с моделью БА.

Материалы и методы. *Манипуляции с животными.* Эксперименты проводили на мышцах-самцах линии BALB/c. Животным проводилась операция по

имплантации направляющей канюли для микроинъекций препаратов в левый боковой желудочек головного мозга.

Мышей разделили на четыре группы: контрольная с введением ACSF $n = 5$, группа с введением А β , $n = 4$, контрольная с введением селективного ингибитора NOX2 GSK2795039 (GSK), $n = 4$, и группа с введением А β и GSK, $n = 4$. Препараты вводили бодрствующим мышам с помощью шприца Гамильтона через направляющую канюлю (1 мкл, со скоростью 1 мкл/мин) ежедневно в течение 3 дней.

После последней инъекции препаратов мышей оставляли на 12 часов до исчезновения острых эффектов инъекций. Затем мышей анестезировали и декапитировали; мозг извлекали, левую половину фиксировали в 4% параформальдегиде для иммуногистохимического анализа, а правую половину анализировали биохимическими методами.

Иммуногистохимия. Фронтальные срезы мозга изготавливали на вибраторе Leica VT 1200 S и проводили флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание на микроглию. Анализировали количество меченых микроглиальных клеток и их общую площадь в полях области CA1 и зубчатой извилины по микрофотографиям с помощью программного обеспечения ImageJ.

Биохимия. Правое полушарие после быстрого извлечения из черепа гомогенизировали и разделяли центрифугированием на три фракции: мембранную, цитоплазматическую и митохондриальную. Их подвергали дальнейшему анализу на маркеры окислительного стресса.

Содержание белка во фракциях для нормирования биохимических показателей определяли по методу Бредфорда. Накопившиеся перекисно окисленные липиды определяли фотометрированием продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой. Концентрацию восстановленных сульфгидрильных групп определяли фотометрированием по методу Элмана. Динамику образования АФК определяли флюориметрированием с использованием красителя Amplex Red.

Сравнение групп проводили с помощью шкалы Крускала—Уоллиса.

Результаты. Поскольку наибольшее количество NOX2 обнаружено на микроглии и активция этих клеток наблюдается при развитии болезни Альцгеймера, в работе был проведен иммуногистохимический анализ микроглии в гиппокампе у трех групп экспериментальных животных. Иммуногистохимическая окраска микроглии выявила существенное увеличение площади микроглиальных клеток в гиппокампе в группе мышей с болезнью Альцгеймера на самой ранней стадии развития патологии (на 50 и 58% в зубчатой фасции и поле CA1 гиппокампа, соответственно). Воздействие бета-амилоида изменяло

и форму микроглиальных клеток — увеличивались тела клеток, отростков становилось больше, но они были короткими. Таким образом, микроглиальные клетки приобретали вид типичной реактивной микроглии.

Блокада НАДФН оксидазы 2 существенно уменьшала площадь микроглиальных клеток до 47—49% по сравнению с контрольными значениями. При этом ветвистость отростков микроглии не изменялась. Этот факт свидетельствует о том, что микроглия переходит в еще более спокойное состояние (с функциональной точки зрения), чем в контроле.

Изменения биохимических маркеров окислительного стресса в гомогенате мозга не продемонстрировало статистически достоверных различий, но оно выявило начало развития окислительного стресса под влиянием острой амилоидной токсичности и уменьшение его выраженности на фоне действия блокатора NOX2.

В мембранной фракции гомогената с введением амилоида обнаружилось повышенное количество перекисно окисленных липидов и пониженное содержание восстановленных сульфгидрильных групп, что говорит о продолжительном местном действии АФК. Блокатор NOX в значительной степени предотвратил оба этих изменения. Скорость продукции АФК мембранной фракцией также была повышена в группе с амилоидом, это повышение оказалось очень слабо скомпенсировано действием GSK, что, по-видимому, объясняется длительным временем после последней инъекции ингибитора на фоне продолжающегося действия амилоидной токсичности.

В то же время концентрация восстановленных сульфгидрильных групп цитозольной фракции была значительно повышена под амилоидом параллельно с некоторым понижением в ней уровня перекисно окисленных липидов и видимой скорости продукции АФК (которая может быть забуферена повышением восстановительной активности среды), что может свидетельствовать о компенсаторном усилении деятельности внутриклеточной глутатионовой антиоксидантной системы путем активации глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы, поставляющей для нее восстановленный NADPH.

В митохондриальной фракции не прослеживается закономерных изменений биохимических показателей развития оксидативного стресса, что может быть связано с ранним этапом развития патологии, на котором происходит повышение продукции АФК клеточными мембранами при активации NOX, в то время как митохондриальный аппарат еще не вовлечен в патологический процесс.

Выводы. Гистологические данные об активации микроглии и результаты биохимических исследований маркеров окислительного стресса и состояния

клеточной антиоксидантной системы указывают на вклад окислительного стресса в инициацию болезни Альцгеймера. 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.

УНИВЕРСАЛЬНЫЙ СПЕКТР ПЕРИОДОВ И ИРРАЦИОНАЛЬНЫЕ ФРАКТАЛЬНЫЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ: ВОЗМОЖНАЯ СВЯЗЬ

Панчелюга В.А., Панчелюга М.С.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: VictorPanchelyuga@gmail.com

Начало, кратко представленным ниже, исследованиям было положено в работе [1], где, с использованием локального фрактального анализа методом всех сочетаний [2], был найден спектр, периоды которого, впоследствии, были обнаружены в флуктуациях процессов различной природы, в силу чего, он был назван «универсальный спектр периодов» (УСП). Так, свойство универсальности проявляется в «биологической активности» УСП: он обнаружен при анализе временных рядов флуктуаций параметров различных биологических систем: флуктуаций температуры мелких млекопитающих и птиц [3-4], хемилюминесценции планарий [5]. Наиболее ярким свидетельством биологической активности УСП является его совпадение со спектром окологосударственных периодов, отражающих практически все аспекты ритмики живых систем [6].

Важной особенностью УСП [1-6] является его фрактальный характер. То есть, набор частот данного спектра составляет единую самосогласованную систему. Об этом свидетельствует, например, спектр собственных колебаний Земли для которого показано совпадение с УСП и который, в силу его фрактальности, можно рассматривать как единый колебательный процесс, приводящий к существованию системы стоячих волн, экспериментально подтвержденной в [7].

Очевидно, что для объяснения УСП необходима математическая модель, ведущая к некоторым универсальным фрактальным распределениям. Такая модель, основанная на понятиях резонанса и грубости физической системы развита в [8].

Как известно, две системы с собственными частотами p и q находятся в состоянии резонанса, если отношение данных частот r является числом рациональным и, мы говорим о невозможности резонанса, если r принадлежит множеству иррациональных чисел. Данное определение имеет своим следствием парадоксы, причина которых кроется в том фундаментальном обстоятельстве, что p и q не могут быть определены с бесконечной точностью, необходимой для различения рационального и иррационального отношений, даже, если в нашем распоряжении имеется идеальный прибор. По этой причине, любое измерение является «грубым» и имеет своим результатом конечное рациональное число. Второй парадокс — известный из практики факт, что резонанс легче возникает для случаев, когда p и q — малые натуральные числа, расположенные в самом начале числовой оси.

Данные парадоксы подробно рассмотрены в [8] в рамках модели, предлагающей последовательное рассмотрение резонанса с учетом грубости физической системы. Результатом этого рассмотрения является вывод о существовании двух комплементарных фракталов, один из которых основан на множестве рациональных чисел, другой — на множестве иррациональных [8]. Так как, суммарно, областью определения рассматриваемых фракталов является множество действительных чисел, \mathbf{R} , то они названы \mathbf{R} -фрактал.

В то время как «рациональный» фрактал отвечает за резонансное взаимодействие между частями сложной системы, «иррациональный» — за отсутствие такого взаимодействия, чему соответствуют условия устойчивости структуры некоторой сложной природной системы. Максимальная устойчивость достигается, когда отношение параметров системы ближе всего к золотому сечению. В силу этого, параметры реальных природных систем, как правило, связаны именно с иррациональным фракталом, структура которого основана на золотом сечении.

В таблице приведены значения УСП-периодов полученных на основе анализа временных рядов флуктуаций скорости альфа-распада (Р/Р) [1] и рядов флуктуаций температуры мелких млекопитающих и птиц (ФТЖ) [6]. Для сравнения, во втором столбце таблицы даны значения аналогов рядов Фибоначчи, вычисленные для первых четырех уровней иррационального фрактала. Видно хорошее совпадение всех значений \mathbf{R} -фрактала со значениями УСП-периодов, за исключением строки № 19, где соответствующие значения УСП-периодов отсутствуют. Это, очевидно, связано с особенностями конкретных реализаций временных рядов, использованных для построения Р/Р- и ФТЖ-спектров (см. [1, 6]).

Сравнение УСП и R-фрактала

№	R-фрактал	УСП (мин)	
		ФТЖ [6]	P/P [1]
1	13, 14, 15	13	13.8
2	19, 20, 21	20	21.3
3	26	26	25
4	28		27.5
5	34	33	32
6	36	37	
7	41		40
8		44	43
9	45		46
10	50	51	51
11			
12	55	57	55.8
13	60	62	60.7
14	69	68	68.3
15			73
16		74	75.5
17	80	80	80
18		85	85.5
19	88, 89		
20	95	94	95
21		101	99.8
22	106	109	106.3

Совпадение УСП и иррациональной части R-фрактала (см. таблицу) можно рассматривать как экспериментальное свидетельство полученного в модели [8] принципа максимальной устойчивости природных систем. Следствием данного принципа является повсеместное присутствие отношений, связанных с золотым сечением [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Панчелюга В.А., Панчелюга М.С. // Биофизика. 2015. Т. 60. вып. 2. С. 395—410.
2. Панчелюга В.А., Панчелюга М.С. // Биофизика, 2013. Т. 58, вып. 2. С. 377—384.
3. Диатроптов М.Е., Панчелюга В.А., Панчелюга М.С. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2020. Т. 169. № 6. С. 706—711.
4. Диатроптов М.Е., Панчелюга В.А., Панчелюга М.С., Суков А.В. // Доклады российской академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 494. № 1. С. 472—476.
5. Panchelyuga V.A. at al. // CEUR Workshop Proceedings. V. 2763. P. 61—63.
6. Панчелюга В.А., Панчелюга М.С. // Актуальные вопросы биологической физики и химии, 2021, т. 6, № 3, с. 393—399.

7. Селюков Е.И., Стигнеева Л.Т. Краткие очерки практической микрогеодинамики. — СПб. : Питер. 2010. 176 с.
8. Панчелюга В.А., Панчелюга М.С. // Метафизика, 2021. № 2. С. 39—56.

**ОБНАРУЖЕНИЕ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ
ПОСЛЕ НЕПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ ПАРА,
ПРОШЕДШЕГО ЧЕРЕЗ ВЫСОКОВОЛЬТНУЮ РАЗРЯДНУЮ КАМЕРУ**

*Панчелюга В.А.¹, Панчелюга М.С.¹, Заичкина С.И.¹, Дюкина А.Р.¹,
Поцелуева М.М.¹, Ларюшкин Д.П.¹, Степанов И.Н.², Зателепин В.Н.³,
Баранов Д.С.³*

- ¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.
- ² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.
- ³ Лаборатория ИНЛИС, Москва, Россия.

e-mail: VictorPanchelyuga@gmail.com

В настоящее время в большинстве ведущих мировых держав существуют обширные государственные программы исследования 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 обнаруженного в работе [1], где оно было названо «странное излучение» (СИ). 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 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]. При этом, пар поступающий в экспериментальный бокс был «заряжен» СИ-частицами, в то время как в контрольный бокс подавался «незаряженный» пар напрямую от парогенератора.

Но, по причине того, что в ходе высоковольтного разряда происходит также генерация ряда химических агентов, попадающих в экспериментальный бокс и, при этом, отсутствующих в контроле, результаты работы [2] нельзя рассматривать, как обусловленные только действием СИ. Для устранения воз-

возможного влияния данных химических агентов экспериментальная установка была модернизирована 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 паропроводы из гибкого силиконового шланга.

Таким образом, использованный нами подход основан на трех предположениях: 1) СИ переносится паром; 2) СИ проникает через стенки катушек; 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.

Следовательно, 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-х 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.

Таким образом, 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. Заичкина С.И., Дюкина А.Р., Поцелуева М.М., Сорокина С.С., Ларюшкин Д.П., Панчелюга М.С., Панчелюга В.А., Баранов Д.С., Зателепин В.Н. Биологические эффекты в окрестности высоковольтного электрического разряда в водовоздушной 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. 13(3). С. 319—328.

ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ В НЕОКОРТЕКСЕ И ГИППОКАМПЕ КРЫС ПОСЛЕ ИНТОКСИКАЦИИ ХЛОРИДОМ ТРИМЕТИЛОЛОВА

*Першина Е.В., Михеева И.Б., Павлик Л.Л., Черноморец И.Ю., Федоров Д.А.,
Архинов В.И.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.
e-mail: pershina-ev@mail.ru

Экспериментальные модели на животных, предназначенные для изучения фундаментальных механизмов нейродегенерации, дают возможность наметить новые направления в поиске фармакологических мишеней для эффективной терапии. Одна из таких моделей для решения задач, связанных с динамикой нейродегенерации, основана на применении системной инъекции нейротоксиканта хлорида триметиллолова (ТМТ). Это водорастворимое металлоорганическое соединение при попадании в организм человека и животных вызывает ряд неврологических нарушений, обусловленных повреждением и гибелью нейро-

нов, преимущественно в гиппокампе. Вероятной первоначальной мишенью действия ТМТ на мозг является мембраносвязанный белок митохондрий, получивший название станнин (stannin). Как и при других нейротоксических моделях, в результате ТМТ-интоксикации в нейронах мозга наблюдаются перегрузка кальцием, эксайтотоксичность, нейровоспаление, окислительный стресс и митохондриальные дисфункции [1].

Цель настоящей работы состоит в определении отличий нейрональных повреждений в гиппокампе и префронтальной коре крыс после ТМТ-интоксикации, предполагая обнаружить механизмы, благодаря которым нейроны префронтальной коры более устойчивы к повреждающему действию ТМТ. Для этого самцам крыс Вистар подопытных групп вводили ТМТ в дозе 7,5 мг/кг (в/б) и через разные сроки после инъекции проводили оценку: поведения животных, структурных и ультраструктурных изменений нейронов методом световой и электронной микроскопии, а также состояния микроглии методом иммуногистохимии и последующей флуоресцентной микроскопии, кроме того, методами ОТ-ПЦР в реальном времени и иммуноферментного анализа исследовали экспрессию цитокинов, характеризующих нейровоспаление.

Ранее нами было показано [2], что в течение первых дней после инъекции ТМТ у животных нарастали токсические явления — крысы теряли в весе, становились агрессивными; иногда наблюдались судорожные реакции. Через 2—3 недели поведение крыс нормализовалось, однако, когнитивные функции у них были снижены по сравнению с контрольной группой, что проявилось в увеличении ошибок в лабиринте и ухудшении запоминания условной реакции пассивного избегания. При этом были выявлены структурные нарушения нейронов как в гиппокампе, так и в префронтальной коре [3]. Наиболее заметным результатом влияния ТМТ на нейроны было появление аутофагосом (АФ), локализованных в цитоплазме, дендритах и аксонах. Причем, среднее число АФ в гиппокампе было больше, чем в префронтальной коре ($0,9 \pm 0,1$ АФ на $\mu\text{м}^2$ в гиппокампе и $0,3 \pm 0,05$ на $\mu\text{м}^2$ в префронтальной коре). Кроме того, в гиппокампе были обнаружены значительные нарушения митохондрий, которые имели разную степень набухания и деструкции, нередко практически лишённые крист. В префронтальной коре, в отличие от гиппокампа, митохондрии не отличались от контрольных. Указанные нарушения нейронов были максимальными через одну неделю после инъекции ТМТ, впоследствии они уменьшались, и через три недели структура митохондрий в нейронах гиппокампа не отличалась от нормы, а число АФ значительно

уменьшалось. В префронтальной коре в этот период наблюдений АФ уже не встречались.

Аутофагия является регулируемым клеточным процессом, при котором дефектные компоненты доставляются внутрь лизосом или вакуолей и подвергаются деградации. Появление АФ после действия ТМТ мы наблюдали как в префронтальной коре, так и в гиппокампе, однако в коре через три недели после интоксикации аутофагический процесс был уже завершен, а в гиппокампе он оставался активным.

Полученные результаты хорошо согласуются с полученными данными о состоянии микроглии. В гиппокампе через одну, две и три недели после инъекции ТМТ форма и распределение клеток микроглии изменялись, их число в хилусе и во всех слоях пирамидных нейронов значительно увеличивалось. В префронтальной коре, особенно в прелимбической и инфралимбической зонах, увеличивалась плотность клеток микроглии, размеры клеток заметно увеличивались, однако такие изменения были обнаружены только через одну неделю после инъекции ТМТ.

Микроглия выполняет первичный иммунный надзор и макрофагоподобную функцию в ЦНС, включая продукцию цитокинов и хемокинов для поддержания гомеостаза. Выявленные нами изменения состояния микроглии связаны с её миграцией в очаг повреждения, а изменение формы и размеров свидетельствует о её реактивации и способности к фагоцитозу, что подтверждает развитие нейровоспаления под влиянием ТМТ. Длительный воспалительный процесс в нервной ткани может приводить к глиозу, нарушению миелинизации и гибели нейронов. Наши результаты показали, что нейровоспаление, вызванное ТМТ, в гиппокампе выражено сильнее и продолжается дольше чем в префронтальной коре. Известно, что разрешение нейровоспаления происходит с участием противовоспалительных цитокинов. Действительно, результаты, полученные нами ранее [4] подтвердили увеличенное содержание интерлейкина-10 в префронтальной коре, но не в гиппокампе, при нейродегенерации, вызванной ТМТ. Это может быть одной из причин разрешения воспаления и более успешного сохранения нейронов в префронтальной коре.

Таким образом, результаты настоящей работы показали, что нейротоксикант ТМТ вызывает в гиппокампе более значительные нарушения структуры нейронов, чем в префронтальной коре. Среди причин высокой уязвимости гиппокампа к повреждающему действию ТМТ является массовое разрушение митохондрий в этой структуре мозга. Поврежденные митохондрии запускают активацию микроглии и аутофагический процесс, наиболее выраженные через одну неделю после ТМТ-интоксикации, как в гиппокам-

пе, так и префронтальной коре. Однако впоследствии в префронтальной коре нейровоспаление успешно разрешается, аутофагия завершается, а в гиппокампе эти процессы остаются активными. Работа выполнена при поддержке РФФ № 21-75-00106.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lee S. et al.* Trimethyltin-induced hippocampal neurodegeneration: A mechanism-based review // *Brain Res Bull.* 2016;125:187-99.
2. *Pershina E.V. et al.* Expression of mGlu receptor genes in the hippocampus after intoxication with trimethyltin // *J Mol Neurosci.* 2019;67(2):258—264.
3. *Мухеева И.Б. и др.* Аутофагия в нейронах префронтальной коры и гиппокампа крыс после интоксикации хлоридом триметиллова // *Бюлл. эксперим. биол. мед.,* 2022; 173(5):632—636.
4. *Kamaltdinova E. et al.* Different Activation of IL-10 in the Hippocampus and Prefrontal Cortex During Neurodegeneration Caused by Trimethyltin Chloride // *J Mol Neurosci,* 2021;71:613—617.

ЛАЗЕРНАЯ МИКРОТОМОГРАФИЯ ИЗОЛИРОВАННОГО ООЦИТА ЧЕЛОВЕКА

Погорелов А.Г.¹, Макарова Н.П.², Погорелова В.Н.¹, Сухих Г.Т.²

- 1 Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.
- 2 ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, Минздрав России, Москва.

e-mail: agpogorelov@rambler.ru

Зрелые ооциты представляют собой неоднородную популяцию, из которой только половина способна завершить мейоз, поэтому эффективность оплодотворения зависит от качества яйцеклетки. В связи с этим в технологии экстракорпорального оплодотворения актуальной задачей является диагностическое описание строения женской половой. В настоящее время набор инструментов, которые не повреждают яйцеклетку, ограничен только визуальным наблюдением. Для характеристики полноценного созревания ооцита используют морфологические признаки: размер клетки, состояние внеклеточного пространства, внешний вид полярного тельца, перивителлинового пространства, а также наличие разного рода цитоплазматических включений. Дополнительные данные о строении живой яйцеклетки человека можно получить или уточнить с помощью лазерной микро томо-

графии (QLSM — Quantitative Laser Scanning Microtomography) — метода экспериментальной биофизики, разработанного для бесконтактного тестирования микрообъекта.

QLSM основан на послойной томографии, что позволяет получить стопку последовательных оптических срезов по глубине объекта микронных размеров. Изначально данный метод корреляционной микроскопии был предложен для изучения препарата, процедура подготовки которого вызывает гибель клетки [1]. Однако нет причин, которые ограничивают возможность изучения нативного ооцита посредством QLSM. Поэтому цель работы состояла в том, чтобы адаптировать данный метод для диагностики женской половой клетки, инкубируемой в физиологической среде. В результате реализовалось основное достоинство послойной томографии — неинвазивная визуализация внутреннего строения живой яйцеклетки, а также количественная оценка важных пространственных характеристик.

Использование женских половых клеток в биомедицинских целях разрешено этическим комитетом ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова МЗ РФ. Для научных исследований брали замороженные ооциты донора, что обусловлено доступностью такого клинического материала, разрешённого этическим комитетом. Материал получали из криобанка указанного учреждения. После размораживания и отмывки отдельную яйцеклетку изучали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SPE в режиме бесконтактной лазерной микротомографии (красный лазер — 635 нм, в проходящем свете). Принципы и технические особенности метода QLSM детально описаны ранее [2, 3, 4]. Отметим существенную деталь, интервал воздействия лазера на ооцит при получении стопки срезов (50 штук) составляет не более 60 секунд. Чтобы предотвратить высыхание анализируемого образца, яйцеклетки в капле физиологического раствора помещали в микрокамеру микроскопа, где поддерживали атмосферу насыщенного пара воды.

В результате показано, что в технологии ЭКО бесконтактная лазерная микротомография является эффективным подходом для диагностического описания морфологии женской половой клетки. Посредством данного метода реализовано основное достоинство послойной томографии — неинвазивная визуализация внутреннего строения нативного ооцита человека. Показано скопление мелких везикул в кортикальной области отмывтой яйцеклетки. Данный дисморфизм может быть обусловлен незавершенностью процесса установления равновесного состояния после отмывки криопротектора. Последующая компьютерная 3-D реконструкция позволила дополнить характеристику

ооцита значением клеточного объема, что отражает важный функциональный признак — осмотический статус яйцеклетки [5, 6].

В части развития методов изучения структуры микрообъектов исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 20-16-00019).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gulin A., Nadtochenko V., Astafiev A. et al.* // *Analyst*. 2016. V. 141. P. 4121—4129.
2. *Pogorelov A.G., Pogorelova V.N.* // *J. Microsc.* 2008. V. 232. P. 36—43.
3. *Pogorelova M.A., Golichenkov V.A., Pogorelov A.G.* // *Optics and Spectroscopy*. 2014. V. 116. P. 488—493. doi: 10.7868/S0030403414030179. doi: 10.1134/S0030400X14030175.
4. *Pogorelova M.A., Panaut A.I., Pogorelov A.G.* // *Biophysics*. 2016. V. 61. P. 445—452.
5. *Pogorelov A.G., Makarova N.P., Kalinina E.A., Panait A.I., Pogorelova V.N., Sukhikh G.T.* // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2021. V. 498. P. 190—192.
6. *Pogorelov A.G., Makarova N.P., Sysoeva A.P., Pogorelova V.N., Sukhikh G.T.* // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021. V. 171. P. 32—36.

ВЛИЯНИЕ ГИДРОЛИЗАТА ИЗОЛЯТА БЕЛКА СОИ НА АДАПТАЦИЮ К ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ У КРЫС

*Поздняков Н.В.^{1,2}, Молчанов М.В.¹, Пономарёва Т.И.^{2,3}, Рыков В.А.³,
Лукин А.М.², Шилов С.В.², Согорин Е.А.²*

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.

² ИБП ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия.

³ Филиал института биоорганической химии РАН, Пушкино, Россия.

e-mail: pozdnjakovnikita@gmail.com

Пептиды гидролизатов пищевых белков — это легко усвояемый источник аминокислот, необходимых организму при адаптации к физическому стрессу. Коммерчески значимыми являются гидролизаты сывороточного белка, казеина и других белков животного происхождения. Гидролизаты растительных белков набирают популярность, но распространены меньше. Перспективным для получения растительных гидролизатов является изолят белка сои по причине доступной цены и сбалансированного аминокислотного профиля. Однако, прямые исследования, показывающие улучшение результата выполнения физической нагрузки при потреблении в пищу гидролизата изолята белка сои, отсутствуют. В данной работе впервые было проведено исследование безопасности и эффективности гидролизата изолята белка сои при физической нагрузке.

ке на модельных животных (крысах). Было показано, что гидролизат не привел к патологическим изменениям внутренних органов животных, потребление пищи и вес животных не отличались от контрольной группы (животные потребляли сывороточный белок). При физической нагрузке крысы, получавшие гидролизат изолята белка сои с помощью энтерального кормления, показали тенденцию к более быстрому приспособлению к физическому стрессу, чем контрольная группа и группа животных, получавшая перед физической нагрузкой свободные аминокислоты. Методом ЯМР-спектроскопии были исследованы метаболиты сыворотки крови животных. Было показано, что к 95-й минуте после кормления в группе крыс, получавшей гидролизат изолята белка сои, разброс концентраций протеиногенных аминокислот крови между особями был значительно меньше, чем в группах, получавших сывороточный белок или смесь аминокислот. Другими словами, индивидуальные биохимические и физиологические особенности особей не повлияли на усвоение аминокислот пептидов гидролизата, в отличие от усвоения аминокислот цельного сывороточного белка или смеси свободных аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Zambrowicz A., Timmer M., Polanowski A., Lubec G., Trziszka T.* Manufacturing of peptides exhibiting biological activity // *Amino acids* 2013, 44, 315—320.
2. *Pozdnyakov N., Shilov S., Lukin A., Bolshakov M., Sogorin E.* Investigation of enzymatic hydrolysis kinetics of soy protein isolate: laboratory and semi-industrial scale // *Biore-sources and Bioprocessing* 2022, 9, 1—13.
3. OECD Series on Testing and Assessment Guidance Document 116 on the Conduct and Design of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 Second edition: Second edition; OCDE iLibrary, OECD Publishing, 2014.
4. *Forte L.D., Rodrigues N.A., Cordeiro A.V., de Fante T., Simino L.A., Torsoni A.S., Torsoni M.A., Gobatto C.A., Machado-Gobatto F.B.* Periodized versus non-periodized swimming training with equal total training load: Physiological, molecular and performance adaptations in Wistar rats. *Plos one* 2020, 15, e0239876.
5. *Veskoukis A.S., Kyparos A., Paschalis V., Nikolaidis M.G.* A novel swimming performance test in rats. *Chinese Journal of Physiology* 2018, 61, 144—151.
6. *Gowda G.N., Raftery D.* Quantitating metabolites in protein precipitated serum using NMR spectroscopy // *Analytical chemistry* 2014, 86, 5433—5440.
7. Control Data of Br/Han:WIST@Tac(GALAS) Rat; Taconic Farms, Inc, 2005.
8. *Samtiya M., Aluko R.E., Dhewa T.* Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview // *Food Production, Processing and Nutrition*. 2020, 2, 1—14.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ
ОСМОТИЧЕСКИМ ШОКОМ И ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТОМ НАТРИЯ
НА БИОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ФИКСИРОВАННЫХ
КСЕНОПЕРИКАРДИАЛЬНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ
ДЛЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ**

*Пятина К.В.^{1,2}, Звягина А.И.¹, Минайчев В.В.¹, Менухов В.О.¹, Даль А.И.¹,
Акатов В.С.^{1,2}, Фадеева И.С.^{1,2}*

- ¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН.
- ² Пушинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» на базе ПушГЕНИ, Пушино, Россия.

e-mail: miss.kiranda@gmail.com

Совместное применение осмотического шока для разрушения клеточных мембран и додецилсульфат натрия (SDS) для вымывания мембранных липидов из тканей является довольно распространенным сочетанием, используемым для предимплантационной децеллюляризации фиксированных глутаровым альдегидом (ГА-фиксированных) биоматериалов. При этом, клинический опыт использования обработанных таким образом ксеноперикардиальных биоматериалов в составе протезов клапанов сердца указывают на их биологическую нестабильность и склонность к развитию асептического кальциноза, что приводит к раннему повреждению или отрыву створок и потере функциональности всего клапана. В то же время результаты ряда исследований по оценке влияния SDS-децеллюляризации на клиническую эффективность сообщают о повреждающем воздействии этого детергента на ВКМ ксеноперикарда, что может влиять на их биофункциональные свойства и являться причиной развития различных патологических реакций организма.

Целью данной работы являлось исследование биологических свойств подвергшихся комбинированной предимплантационной децеллюляризации осмотическим шоком и SDS биоматериалов и последующая оценка их эффективности для применения в сердечно-сосудистой хирургии, в том числе по результатам гетеротопической имплантации крысам на длительные сроки (6 мес). В качестве материала сравнения использовался ксеноперикард, децеллюляризованный раствором EDTA и дезоксихолата натрия без использования осмотического шока и SDS.

Для получения экспериментальных материалов донорский ксеноперикард подвергали последовательной предимплантационной обработке, включающей следующие этапы: (1) децеллюляризацию гипертоническим раствором и SDS;

(2) фиксацию в ГА; (3) отмывку в этаноле; (4) лиофилизацию в глицерине и стерилизацию оксидом этилена. Морфофункциональную оценку экспериментального материала проводили после завершения каждого из этапов обработки с помощью гистологического (окраска Н&Е) и гистохимического (трихром по Лилли) анализов в сравнении с нативным контролем. Кроме того, была проведена оценка эффективности биоматериала в модельных условиях *in vitro* (культура фибробластов человека, предоставленные Центром *in vitro* испытаний ИТЭБ РАН): оценка цитотоксического действия образцов, оценка митотической активности, оценка пролиферативной активности, оценка индукции внутриклеточного окислительного стресса. Все *in vitro* эксперименты проводились в двух модельных условиях: (1) при стандартной пробподготовке материалов, заключающейся в их 2-х часовой отмывке в питательной среде; (2) при приближенной к *in vivo* условиям длительной (2 суток) 2-х этапной отмывке материалов в среде с сывороткой, имитирующей насыщение материалов белками плазмы крови.

Было показано, что осмотический шок оказывает выраженное повреждающее воздействие на структуру материалов, проявляющееся в общей дезорганизации коллагеновых волокон, вызванной перегидротацией и осмотическим набуханием фибриллярных белков матрикса. Кроме того, были обнаружены признаки глубоких повреждений молекулярной структуры коллагеновых волокон, на что указывала потеря специфичности матрикса к фибриллярному красителю. Наблюдаемые повреждения ВКМ возрастали при последующем этапе детергентной обработки с помощью SDS. Этап фиксации ГА стабилизировал общую макроструктуру матрикса материалов, однако дегенеративные повреждения ультраструктуры матрикса сохранялись на протяжении всех последующих этапов обработки.

Комплексное *in vitro* исследование показало, что все исследуемые материалы обладают выраженным цитотоксическим действием, подавляют пролиферативную активность клеток, ингибируют прирост клеточных популяций и индуцируют внутриклеточный окислительный стресс. Общее токсическое воздействие экспериментальных образцов на клетки, вероятнее всего связано с соединениями, экстрагируемыми в среду инкубации. При этом после проведения дополнительной 2-х этапной отмывки для всех исследуемых образцов было показано полное отсутствие как контактного, так и бесконтактного цитотоксического действия, что может стать предварительной схемой обработки экспериментальных материалов для снижения их общего токсического действия при исследовании миграции клеток вглубь матрикса образцов.

Было показано, что данная дополнительная 2-х этапная отмывка образцов в питательной среде, имитирующая насыщение матрикса материалов компонентами плазмы крови, обеспечивала полное восстановление митотической активности клеток до значений митотического индекса клеток, культивируемых на поверхности культурального пластика. Также после данной отмывки показано полное восстановление роста клеточных популяций до плотности стандартного контроля. Также было показано, что несмотря на то, что при культивировании клеток на поверхности всех исследованных образцов материалов, происходила контактная индукция внутриклеточного окислительного стресса, дополнительная отмывка образцов экспериментальных материалов также полностью подавляла как контактную, так и бесконтактную индукцию внутриклеточного окислительного стресса.

По результатам гетеротопической имплантации было установлено, что экспериментальные образцы подвергаются хроническому позднему отторжению, проявляющемуся в виде крупных очагов выраженной лимфоцитарной инвазии, наблюдаемой даже через 6 месяце имплантации, а также интенсивной резорбции пограничных зон материала. Кроме того, в околопограничных зонах наблюдались признаки протеолитической деградации матрикса образцов. При этом сам матрикс материала был слабо заселен клетками реципиента даже на поздних сроках имплантации. Признаков развития асептического кальциноза обнаружено не было, из-за чего можно предположить, что отмечаемый в литературе асептический кальциноз, наблюдаемый при имплантации аналогично обработанных материалов в составе протезов клапанов сердца, связан с биомеханическим повреждающим воздействием и взаимодействием данных материалов с компонентами крови (в первую очередь с тромбоцитами), запускающих процессы патологической физико-химической кальцификации.

Таким образом, было показано, что децеллюляризация осмотическим шоком и SDS оказывает выраженное воздействие на биологическую функциональность ксеноперикардальных биоматериалов, в первую очередь за счет повреждающего воздействия на компоненты ВКМ. Все наблюдаемые *in vitro* негативные воздействия материалов на клетки значительно снижались или полностью пропадали при использовании дополнительной двухэтапной отмывки, имитирующей более приближенные к *in vivo* условия насыщения матрикса материалов белками плазмы крови и значительно подавляющей контактную ГА-ассоциированную цитотоксичность. Однако, наблюдаемая *in vivo* низкая степень репопуляции матрикса экспериментальных материалов в совокупности с интенсивными процессами клеточной утилизационной резорбции

указывает на то, что именно структурные изменения ВКМ приводят к развитию острого отторжения данных материалов в организме реципиента.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИТЭБ РАН, при частичной финансовой поддержке гранта президента РФ в рамках работы по проекту СП-1813.2021.4 с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН.

ПРЯМОЕ ИЗМЕРЕНИЕ АЛМАЗНЫМ МИКРОТЕРМОМЕТРОМ ТЕМПЕРАТУРНОГО ПРОФИЛЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА МЫШЕЙ

Ромишин А.М.¹, Осипов А.А.^{2,3}, Попова И.Ю.³, Цеб В.Э.³, Власов И.И.¹

¹ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия.

² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия.

³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.

e-mail: aosypov@gmail.com

Производство тепла митохондриями имеет решающее значение для поддержания температуры тела, регулирования скорости метаболизма и предотвращения окислительного повреждения митохондрий и клеток. При этом митохондрии являются естественными производителями тепла, образующегося за счет малоэффективного преобразования энергии (в АТФ сохраняется только от 40% до 60%). В последнее десятилетие широкое распространение получила гипотеза «горячих митохондрий», согласно которой митохондрии могут быть теплее (вплоть до 50 °С), чем цитозоль, из-за их интенсивного энергетического метаболизма. Однако до сих пор роль температурных градиентов в реализации физиологических процессов на субклеточном уровне оставалась малоизученной из-за отсутствия измерительного инструментария — температура митохондрий характеризовалась только методами на основе флуоресцентных зондов, которые чувствительны к изменениям окружающей среды (вязкость, рН, ионная сила, гашение и т.д.).

В данной работе тепловыделение изолированных митохондрий впервые было измерено однозначно напрямую с помощью алмазного термометра, который абсолютно безразличен к внешним нетепловым параметрам.

Исследование проводили на изолированных митохондриях мозга мышей линии BALB/c (25—33 г). Мышей анестезировали изофлураном, декапитировали, полушария мозга выделяли, разрезали на мелкие кусочки в ледяном буфере (220 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 10 мМ HEPES, 1 мМ EGTA и 0,5% бычьего сывороточного альбумина, рН 7,4) и гомогенизировали (Duran,

Wheaton). Гомогенат мозга центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин при 4 °С. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость центрифугировали при 12 000 g в течение 10 мин при 4 °С. Полученный осадок ресуспендировали в 0,5 мл среды для выделения и хранили на льду в течение эксперимента. Для проверки жизнеспособности изолированных митохондрий использовали краситель TMRM (ThermoFisher, USA), чувствительный к мембранному потенциалу (максимум флуоресценции на 580 нм). Временной трек интенсивности красителя записывали на фоне добавления пирувата, АДФ и разобшителя СССР, чтобы убедиться, что митохондрии выжили после гомогенизации и демонстрируют обычный метаболический ответ.

Изучение митохондриального теплового ответа на разобшение проводили с использованием конфокального спектрометра Horiba Jobin-Yvon LabRam HR800. Флуоресценция SiV-центров возбуждалась лазерным источником LaserQuantum на длине волны 473 нм, который фокусировался линзой с малой числовой апертурой на один из концов многомодового оптического волокна (Thorlabs, 400 мкм) с максимумом пропускания при 740 нм. В то же время другой конец волокна, проложенный внутри капилляра и расположенный вблизи его кончика, направлял фотоны возбуждения непосредственно на микроалмаз. Устройство алмазного термометра (АТ) исчерпывающе описано в нашей предыдущей работе [1]. В основе конструкции лежит алмазный кристалл высокого структурного качества, локализованный на торце стеклянного микрокапилляра. Термочувствительность АТ обеспечивается ансамблем центров окраски «кремний-вакансия» (SiV-центр), встроенных в алмазный кристалл во время CVD-синтеза. Положение максимума бесфонной линии SiV-флуоресценции зависит от температуры и позволяет регистрировать температуру любой микросистемы после предварительной калибровки. Полученную флуоресценцию собирали с помощью воздушного объектива с большим рабочим расстоянием и направляли на спектрометр. Митохондриальную суспензию (200 мкл) размазывали по чашке Петри, с помощью оптической CMOS-камеры находили митохондриальный агрегат размером от 2 до 10 мкм и регистрировали термические изменения в ответ на аппликацию 2.5 мкл СССР. В качестве эталонного индикатора макроскопической температуры в раствор погружали термометр.

Эксперименты показали, что сброс мембранного потенциала при аппликации разобшителя СССР приводит к выделению тепла митохондриями в диапазоне от 4 до ~22 °С по сравнению с уровнем окружающей среды, с абсолютным максимумом 45 °С. Такой широкий диапазон температурных ответов может быть связан с гетерогенностью митохондриальной суспензии и отражать различный энергетический потенциал разных типов митохондрий. Это пред-

положение согласуется с литературными данными о наличии в нейронах разных типов митохондрий, различающихся линейными размерами и функциями. Было показано, что мелкие аксональные митохондрии выполняют буферизирующую функцию, поддерживая оптимальную концентрацию ионов кальция в цитоплазме и регулируя передачу сигналов в синапсах [2]. Митохондрии дендритов имеют сильно удлинённую форму, а длинные митохондрии в телах нейронов сливаются между собой, формируя густую сеть [3]. Можно предположить, что тепловой профиль митохондрий из разных клеточных компартментов может принципиально отличаться.

Спонтанные температурные всплески с сопоставимой амплитудой были также обнаружены до аппликации СССР, что может отражать участие некоторых митохондрий в синтезе АТФ или утечку мембранного потенциала во избежание гиперпродукции активных форм кислорода.

Длительность теплового ответа также варьировалась в широких пределах — от секунд до сотен секунд, вероятно, из-за неоднородного распределения действия СССР на отдельные митохондрии в пределах одного агрегата. В то время как митохондрии на поверхности агрегата находятся под прямым действием СССР, глубинные органеллы изолированы и остаются неразобщенными. Таким образом, медленное проникновение СССР приводит к асинхронному и неоднородному временному отклику.

Проведённые нами исследования проливают свет на термодинамику митохондрий в нервной ткани и позволяют строить конструктивные теории на основе прямых данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Romshin A.M. et al. A new approach to precise mapping of local temperature fields in submicrometer aqueous volumes // *Sci. Rep.*, vol. 11, № 1, p. 14228, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-93374-7.
2. Lewis T.L., Kwon S.-K., Lee A., Shaw R., Polleux F. MFF-dependent mitochondrial fission regulates presynaptic release and axon branching by limiting axonal mitochondria size // *Nat. Commun.*, vol. 9, № 1, p. 5008, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-07416-2.
3. Stępkowski T.M., Męczyńska-Wielgosz S., Kruszewski M. MitoLUMES: An Engineered Neuronal Cell Line for the Analysis of the Motility of Mitochondria // *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 37, № 6, p. 1055—1066, Aug. 2017, doi: 10.1007/s10571-016-0438-0.
4. Гуляева Н.В. Молекулярные механизмы нейропластичности: расширяющаяся вселенная // *Биохимия*, vol. 82, № 3, p. 365—371.
5. Macherel D., Haraux F., Guillou H., Bourgeois O. The conundrum of hot mitochondria // *Biochim. Biophys. Acta BBA — Bioenerg.*, vol. 1862, № 2, p. 148348, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148348.

ВЫЯВЛЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ОМЛ К TRAIL-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИБЕЛИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАНСКРИПТОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сенотов А.С., Кобякова М.И., Краснов К.С., Фадеев Р.С.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: a.s.senotov@gmail.com

Революция в методах молекулярно-генетического анализа наряду с повышением их доступности является важным достижением последних десятилетий. Наибольшее распространение получили методы, направленные на изучение профилей РНК — транскриптомные исследования [1]. Основная идея которых заключается в том, что показателем активности гена является количество специфической РНК присутствующей в клетке, таким образом, активно экспрессирующиеся гены продуцируют множественные транскрипты, повышая уровень сигнала. Напротив, снижение или полное отсутствие экспрессии, дает снижение уровня сигнала или его отсутствие. Сравнивая количество транскриптов тотально выделенной РНК измененных клеток относительно нормальных можно оценить вовлеченность внутриклеточных сигнальных путей в происходящие с клеткой изменения.

Ранее в нашей лаборатории был выявлен феномен повышения устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) ТНР-1 к TRAIL-индуцированной гибели при культивировании их в условиях высокоплотных культур (ВПК), формирующийся через 120 часов культивирования в круглодонных планшетах по отношению к культурам, находящимся в низкой плотности (НПК) через 24 часа культивирования. Для определения направления поиска механизмов повышения устойчивости клеток ОМЛ было проведено полногеномное исследование тотальных транскриптомов. Полученные в результате исследования 58 тысяч генов были отсортированы и отфильтрованы на дифференциально экспрессированные гены (ДЭГ) согласно критериям $\text{Log}_2\text{FC} < -1$, $\text{Log}_2\text{FC} > 1$, $p < 0,05$ (где FC — кратность изменения транскрипта в ВПК по отношению к НПК). Количество ДЭГ, соответствующее указанным критериям, составило 121, при этом 92 гена с повышенной и 29 со сниженной транскрипцией. Далее эти ДЭГ были проверены по основным бонформатическим ресурсам Gene Ontology и KEGG для выявления внутриклеточных сигнальных путей в которых они представлены максимально. В результате исследования было показано, что максимальное обогащение внутриклеточных путей связано с позитивной регуляцией хронического воспалительного ответа,

фосфорилированием IκB и биосинтезе ненасыщенных жирных кислот. ДЭГ со сниженной активностью находились в путях, отвечающих за минеральный обмен в общем и транспорт цинка в частности, также подавлен был транспорт аминокислот в клетку и транспорт везикул от аппарата Гольджи к мембране.

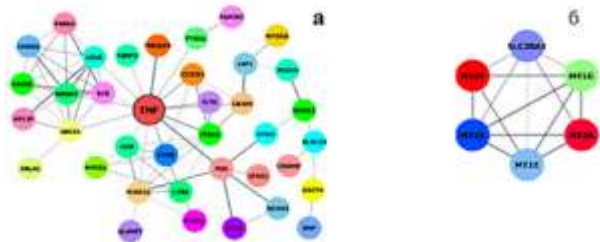


Рис. 1. Сети молекулярного взаимодействия продуктов генов с повышенной (а) и пониженной (б) экспрессией

Следующим этапом исследования ДЭГ стало построение сетей межмолекулярного взаимодействия продуктов генов. На рисунке 1а показаны функциональные модули и ключевые регуляторные белки ДЭГ с повышенной экспрессией, 50% узлов образуют общую структуру, в которой ключевым интегратором выступает ген, кодирующий цитокин TNF-α, регулирующий процесс воспаления. ДЭГ со сниженной экспрессией не образовывали общей сети формируя небольшую группу из генов, кодирующих металлопротеиназы, основная функция которых заключается в отрицательной регуляции воспалительного ответа.

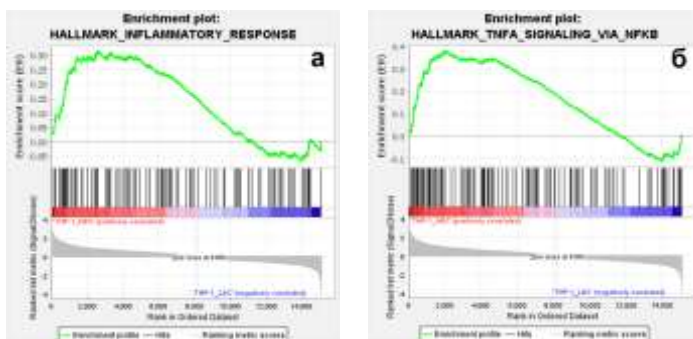


Рис. 2. GSEA анализ представленности групп провоспалительного сигнального пути ($ES = 0.333$, $NES = 1.589$ $FDR = 0.021$) (а) и TNF-α через NF-κB ($ES = 0.393$, $NES = 1.930$ $FDR = 0.0$) (б), p -value ≤ 0.05

Первично полученные выводы были подтверждены анализом обогащения групп генов (GSEA). На рисунке 2 приведены результаты полногеномного исследования статистически значимых различий ТНР-1 ВПК относительно ТНР-1 НПК. Было показано обогащение в воспалительном сигнальном пути и обогащение пути TNF- α через подконтрольный ему NF- κ B.

Данные, полученные в результате биоинформатического анализа транскриптома, позволили определить вектор последующих исследований, в том числе положительный контроль в виде липополисахарида (ЛПС), для сравнительного анализа сигнального пути TRAIL в клетках ТНР-1 ВПК и НПК. Результаты исследования представленности рецепторов и основных участников внутриклеточного сигнального каскада TRAIL полученные для клеток ТНР-1 ВПК, соответствовали изменениям в клетках ТНР-1 ЛПС.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Broadhead M.L., Clark J.C., Dass C.R., Choong P.F.* Microarray: an instrument for cancer surgeons of the future? // ANZ J Surg, 2010, 80, 531-6.

(+)-КАТЕХИН И ГАЛЛАТ ИНИЦИИРУЮТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В АОРТЕ КРЫС

*Самохвалова Т.В., Корыстова А.Ф., Кублик Л.Н., Шапошникова В.В.,
Корыстов Ю.Н.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: ykorystov@rambler.ru

Катехин, его галлопроизводные и продукты конъюгации катехинов являются основными флавоноидами чая, какао, шоколада. В зелёном чае содержится, например, до 30% катехинов от сухого веса листа [1]. С чаем человек потребляет до половины всех флавоноидов (2). Катехин существует в четырёх стереоизомерных формах: транс — (+)-катехин, (–)-катехин и цис — (+)-эпикатехин, (–)-эпикатехин. В природе (чай, какао и других растительных продуктах) встречаются, в основном, (+)-катехин и (–)-эпикатехин. Однако при термической обработке какао и чая образуется (–)-катехин из (–)- эпикатехина [3]. Термическая обработка зёрен используется при производстве какао и шоколада [3], а термическая обработка чая применяется для стерилизации бутилированного чая, потребление которого широко распространилось. Ранее было показано, что смесь транс-катехинов [4] и галлопроизводные (–)-эпикатехина [5] вызывают окислительный стресс в аорте. В настоящей работе исследовали влияние (+) и (–) транс-катехинов, (–)-эпикатехина и галлата на аорту крыс для выяснения какие именно компоненты

смеси транс-катехинов и галлопроизводных (–)-эпикатехина ответственны за инициацию окислительного стресса в аорте.

Работа выполнена на крысах самцах Вистар. Активность АПФ в сегментах аорты определяли по гидролизу гиппурил-гистидин-лейцина. Образование АФК в сегментах аорты определяли по окислению дихлордигидрофлуоресцеина. Исследовали дозовые зависимости изменения активности АПФ и образования АФК в аорте после введения (–)-катехина, (+)-катехина, (–)-эпикатехина, а также галлата. Показано, что (+)-катехин и галлат увеличивали активность АПФ и образование АФК в аорте, а (–)-катехин, (–)-эпикатехин не влияли на активность АПФ и АФК. Дозы (+)-катехина и галлата, увеличивающие активность АПФ до половины максимальной (АД₅₀) равны и 0.04 и 0.03 мкг/кг соответственно. (+)-катехин и галлат инициируют окислительный стресс в аорте, а (–)-катехин и (–)-эпикатехин не влияют на активность АПФ и образование АФК. Таким образом, показанная ранее инициация окислительного стресса в аорте смесью (+)- и (–)-катехинов [4] была обусловлена (+)-катехином, а такой же эффект галлопроизводных (–)-эпикатехина [5] — галлатом.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Van het Hof K.H., Kivits G.A.A., Weststrate J.A. et al. // Eur. J. Clin. Nutr. 1998. V. 52. № 5. P. 356—359.*
2. *Hodgson J.M., Croft K.D. // Mol. Aspects Med. 2010. V. 31. № 6. P. 495—502.*
3. *Kofink M., Papagiannopoulos M., Galensa R. // Molecules 2007. V. 12. № 7. P. 1274—1288.*
4. *Аникина В.А., Ким Ю.А., Корыстова А.Ф. и др. // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. 2019, Т. 168. № 11, С. 565—568.*
5. *Korystova A.F., Kublik L.N., Samokhvalova T.V. et al. // Biomedicine & Pharmacotherapy, V. 142, October 2021, 112064.*

ПРИНЦИПЫ УПРАВЛЕНИЯ В СИСТЕМЕ КЛЕТОК, СВЯЗАННЫХ ПРОНИЦАЕМЫМИ КОНТАКТАМИ

Смолянинов В.В.¹, *Потапова Т.В.²*, *Асланиди К.Б.¹*

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.

² Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова.

e-mail: kbaslanidi@gmail.com

Все многоклеточные организмы от водорослей и грибов до планарий и человека представляют собой разнообразные структуры взаимодействующих клеток. Создания сложной анатомии в эмбриогенезе или при регенерации у

всех многоклеточных организмов осуществляется системами электронеовозбудимых клеток, связанных друг с другом проницаемыми контактами. Координация взаимодействующих клеток осуществляется, в частности, посредством биоэлектрической коммуникации через проницаемые контакты.

Мы полагаем, что механизмы создания и обработки морфогенетической информации тесно связаны с самой природой потоков энергии через живую систему. Живая клетка представляет собой открытую, неравновесную термодинамическую систему, пространственная структура которой поддерживается потоком энергии из окружающей среды. Материальным эквивалентом потока энергии из внешней среды в гетеротрофную клетку является поток метаболитов, в частности, глюкозы, через плазматическую мембрану.

В одиночной изолированной клетке транспорт ионов против градиента электрохимического потенциала осуществляется ионными насосами. Для подавляющего большинства клеточных мембран самых разнообразных живых организмов перенос единицы заряда против градиента электрохимического потенциала эквивалентен энергии гидролиза одной молекулы АТФ. Поток энергии из внешней среды в клетку можно оценить по количеству молекул глюкозы, поступающих в клетку. В системе клеток, соединенных проницаемыми контактами, энергия, необходимая для поддержания электрохимического градиента ионов на мембране данной клетки, может расходоваться в другой клетке, соединенной с данной клеткой проницаемыми контактами.

Направленность управления внутриклеточными процессами определяется тем, что характерные времена экспрессии генов, синтеза и включения органических молекул во много раз превышают характерные времена изменения ионного состава цитоплазмы и электрических параметров клетки. Изменения в экспрессии генов, синтезе и включении органических молекул происходят со значительной временной задержкой после изменения электрических параметров клетки.

Основные принципы управления в системе клеток, связанных проницаемыми контактами, были сформулированы на основании анализа экспериментальных результатов, полученных на сине-зеленых водорослях, мицелиальных грибах, рыбах и культивируемых клетках млекопитающих:

- поток энергии, поступающий в живую систему из внешней среды, управляет потоками неорганических ионов через плазматическую мембрану и далее всеми остальными процессами жизнедеятельности;
- гиперполяризованная клетка управляет мембранным потенциалом депольаризованных соседей и приближает значение их мембранного потенциала к своему уровню;

- мембранный потенциал любой клетки управляет ионным составом цитоплазмы;
- ионный состав цитоплазмы управляет экспрессией генов, ответственных за процессы пролиферации, дифференцировки или апоптоза;
- вновь синтезированные ДНК, РНК, белки или липиды могут встраиваться в плазматическую мембрану, изменять пути транспорта неорганических ионов через плазматическую мембрану и управлять мембранным потенциалом.



МОЖНО ЛИ АКТИВИРОВАТЬ ВЗАИМНОЕ УНИЧТОЖЕНИЕ РАКОВЫХ КЛЕТОК?

Соловьева М.Е., И. Одинокова И.В., Крестинина О.В., Бабурина Ю.Л., Ломовская Я.В., Шаталин Ю.В., Акатов В.С.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН) Пущино, Россия, 142290, Московской области, ул. Институтская, 3.
e-mail: akatov.vladimir.@gmail.com

Взаимное уничтожение клеток путем энтоза осуществляется в результате поглощения одной клетки другой, с последующей лизосомальной гибелью поглотившей клетки. Такой процесс можно увидеть в культурах клеток рака молочной железы, например, линии MCF-7 (около 3—5%). Вопрос, можно ли активировать эти процессы и заставить раковые клетки уничтожать друг друга? Наши результаты говорят, что принципиально это возможно.

Ранее нами было показано, что окисленные производные дисульфирама (DSFoxy), которые образуются в редокс реакциях гидросокобаламина и диэтилдитиокарбамата, высокотоксичны для клеток опухолевого происхождения [Solovieva *et al.*, *Redox Biol.*, 2019]. Было также установлено, что DSFoxy ингибируют апоптоз, аутофагию и вызывают параптозоподобную гибель в опухолевых клетках [Solovieva *et al.*, *Biomolecules*, 2020]. Эта форма регулируемой

гибели клеток выражается в гипертрофическом набухании цистерн эндоплазматического ретикулума (ЭПР), которое сопровождается повреждением митохондрий, цитоскелета.

Наши последующие исследования [Solovieva *et al.*, IJMS, 2022], основанные на масс-спектрометрическом анализе убиквитома клеток карциномы человека HEp-2 на стадии инициации их гибели, позволили сформулировать представление о механизме инициации параптозоподобной гибели опухолевых клеток производными DSFoxu. Данные биоинформатического анализа изменений убиквитома и вестерн блотинга убиквитинированных белков указывают на повреждение белков клеток продуктами DSFoxu, на накопление этих поврежденных белков в ЭПР вследствие подавления ретроградного транспорта мисфолдированных и поврежденных белков из ЭПР в цитозоль. Причина подавления ретроградного транспорта белков из ЭПР в цитозоль состоит в повреждении деубиквитиназ (DUB), и в частности той DUB, которая сопряжена с протеасомой и определяет ее функционирование. Таким образом, представленный механизм инициации параптозоподобной регулируемой гибели клеток посредством DSFoxu включает повреждение белков, в том числе тех, которые ответственны за реализацию апоптоза, аутофагии, расширение цистерн ЭПР (вакуолизация цитоплазмы) в результате накопления в них поврежденных белков, что обусловлено подавлением ретроградного транспорта поврежденных белков из ЭПР в цитозоль в результате повреждения деубиквитиназ и нарушения функционирования протеасом. ЭПР-вакуолизация цитоплазмы вызывает повреждение митохондрий, цитоскелета и приводит к гибели клеток.

В клетках рака груди человека (MCF-7) DSFoxu также инициируют параптозоподобную гибель [Solovieva *et al.*, BBA, 2022]. Однако было обнаружено, что при определенном режиме воздействия DSFoxu на клетки (кратковременная инкубация) происходит активация взаимного поглощения клеток, сопровождающегося лизосомальной гибелью поглотивших клеток. Этот процесс включает до половины всех погибающих клеток. Такой результат указывает на принципиальную возможность усиления/активации взаимного уничтожения раковых клеток, а также на необходимость выяснения механизмов энтоза и на поиск индукторов энтоза, которые избирательны для раковых клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Solovieva M., Shatalin Y., Odinkova I., Krestinina O., Baburina Y., Lomovskaya Y., Pankratov A., Pankratova N., Buneeva O., Kopylov A., Medvedev A., Akatov V. Disulfiram oxy-derivatives suppress protein retrotranslocation across the ER membrane to the cytosol and initiate paraptosis-like cell death // *Membranes* 2022a, 12, 845.

2. *Solovieva M., Shatalin Y., Odnokova I., Krestinina O., Baburina Y., Mishukov A., Lovninskaya Y., Pavlik L., Mikheeva I., Holmuhamedov E., Akatov V.* Disulfiram oxyderivatives induce entosis or paraptosis-like death in breast cancer MCF-7 cells depending on the duration of treatment // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2022b, 1866, 130184.
3. *Solovieva M.E., Shatalin Y.V., Solovyev V.V., Sazonov A.V., Kutysenko V.P., Akatov V.S.* Hydroxycobalamin catalyzes the oxidation of diethyldithiocarbamate and increases its cytotoxicity independently of copper ions // *Redox Biol.* 2019, 20, 28—37.
4. *Solovieva M., Shatalin Y., Fadeev R., Krestinina O., Baburina Y., Kruglov A., Kharechkinina E., Kobayakova M., Rogachevsky V., Shishkova E., Akatov V.* Vitamin B12b enhances the cytotoxicity of diethyldithiocarbamate in a synergistic manner, inducing the paraptosis-like death of human larynx carcinoma cells // *Biomolecules* 2020, 10, 69.

АВТОСТОПОМ В КЛЕТКУ: КОМПЛЕКСЫ ФЛАВОНОИДОВ С ПЕРЕХОДНЫМИ МЕТАЛЛАМИ МОГУТ ПРОНИКАТЬ СКВОЗЬ МЕМБРАНЫ В ЦИТОПЛАЗМУ

Тараховский Ю.С.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Пущино.

e-mail: tarahov@rambler.ru

Флавоноиды — это группа пищевых полифенолов, которые поступают в организм человека с растительной пищей. В последние годы эти вещества привлекают внимание исследователей из-за их эффективности в профилактике широкого спектра заболеваний, включая нейродегенеративные, онкологические, аутоиммунные и сердечно-сосудистые. Аналогичные патологии могут также возникать при недостатке некоторых переходных металлов первого ряда, включая Cu(II), Zn(II), Mn(II), Fe(II/III). Примечательно, что флавоноиды известны как хелаторы переходных металлов. Когда образуется комплекс с этими металлами, терапевтический эффект может быть усилен, предполагая возможность синергизма.

Возможность проникновения комплексов флавоноидов с переходными металлами через фосфолипидный бислой впервые была высказана нами при анализе фазового поведения липидов [1] и обсуждалась в наших последующих работах [2, 3]. Аналогичные предположения высказывались и другими исследователями [4, 5], хотя молекулярный механизм этого процесса недостаточно изучен.

Для анализа взаимодействия комплексов флавоноид-металл с фосфолипидным бислоем биологических мембран мы использовали молекулярное мо-

делирование (см. рисунок). В работе ключевым моментом был анализ липофильности комплексов с различной стехиометрией связывания. Липофильность является ключевым физико-химическим параметром, который играет решающую роль в определении фармакодинамики и фармакокинетики лекарственных средств и их проникновении в клетку.

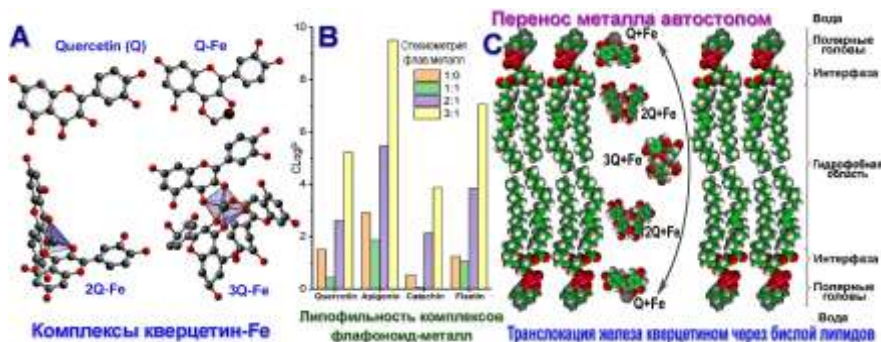


Рисунок. Анализ молекулярных моделей (А) показал, что липофильность комплексов флавоноид-металл при изменении стехиометрии связывания сначала падает, а затем растет в ряду (1:0) > (1:1) < (1:2) < (1:3) (В). На основании представленных расчетов предложена оригинальная гипотеза о существовании уникального процесса транслокации комплексов флавоноид-металл различной стехиометрии через клеточные мембраны в цитоплазму, который основан на возможности их последовательной ассоциации и диссоциации в различной стехиометрии, названный «автостопом» (С)

Молекулярные модели показали, что липофильность комплексов флавоноид-металл, представленная, как логарифм отношения концентраций вещества в системе вода:октанол (рисунок, В), может значительно варьировать в зависимости от стехиометрии их связывания [6]. Хотя значения липофильности, полученные из разных источников или рассчитанные с помощью другого программного обеспечения, могут отличаться и могут зависеть от значения рН, представленные расчеты демонстрируют очевидную тенденцию к изменению этих параметров в зависимости от стехиометрии комплексов флавоноид-металл.

Полученные данные о липофильности комплексов с разной стехиометрией связывания позволили высказать предположение о существовании уникального механизма транслокации комплексов флавоноид-металл через фосфолипидный бислой клеточных мембран, основанный на возможности их последовательной ассоциации и диссоциации, который предложено называть «автостопом» (рисунок, С). В соответствии с представленной схемой, на периферии бислоя фосфолипидов находятся комплексы с низкой липофильностью, что

соответствует стехиометрии связывания флавоноид: металл 1:1 и 2:1, тогда как в центре бислоя присутствуют наиболее липофильные комплексы 3:1.

Ожидается, что исследования биологических свойств комплексов флавоноидов с металлами позволят повысить их биодоступность и терапевтическую эффективность, а также могут быть использованы при создании новых лекарственных средств.

Материалы представленной работы опубликованы ранее [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tarakhovskiy Yu.S., Кузнецова С.М., Васильева Н.А., Егорочкин М.А., Ким Ю.А.* Взаимодействие таксифолина (дигидрохверцетина) с мультисамельными липосомами из димиритоилфосфатидилолина // *Биофизика* 53 (2008) 78—83.
2. *Kim Y.A., Tarahovsky Y.S., Yagolnik E.A., Kuznetsova S.M., Muzafarov E.N.* Lipophilicity of flavonoid complexes with iron(II) and their interaction with liposomes // *Biochemical and biophysical research communications* 431 (2013) 680—685.
3. *Kim Y.A., Tarahovsky Y.S., Yagolnik E.A., Kuznetsova S.M., Muzafarov E.N.* Integration of Quercetin-Iron Complexes into Phosphatidylcholine or Phosphatidylethanolamine Liposomes // *Appl Biochem Biotechnol* 176 (2015) 1904—1913.
4. *Baccan M.M., Chiarelli-Neto O., Pereira R.M.S., Espósito B.P.* Quercetin as a shuttle for labile iron // *Journal of inorganic biochemistry* 107 (2012) 34—39.
5. *Kavanagh O., Elmes R., O'Sullivan F., Farragher J., Robinson S., Walker G.* Investigating Structural Property Relationships to Enable Repurposing of Pharmaceuticals as Zinc Ionophores // *Pharmaceutics* 13 (2021).
6. *Tarahovsky Y.S., Kim Y.A., Yagolnik E.A., Muzafarov E.N.* Flavonoid-membrane interactions: involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling // *Biochimica et biophysica acta* 1838 (2014) 1235—1246.
7. *Tarahovsky Y.S.* Hitchhiking into a cell: flavonoids may produce complexes with transition metals for transmembrane translocation // *Biomaterials: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 35 (2022) 1299—1306.

ИЗУЧЕНИЕ РАБОТЫ ПРОТОЧНОЙ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЧИСТКИ КРОВИ ОТ МОЧЕВИНЫ

Фомкина М.Г., Литвинова Е.Г.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.

e-mail: mfomkina@mail.ru

Современная медицина во всем мире борется с заболеваниями, которым дали название «смертельный квартет». Это четыре болезни, которые являются основными причинами смерти населения, — диабет, гипертония, онкология и легочные заболевания. А в 2011 году ООН и ВОЗ хроническую болезнь почек

(ХБП) назвали пятой болезнью-убийцей. Признаки ХБП отмечаются более чем у 1/3 пациентов хронической сердечной недостаточностью; снижение функции почек наблюдается у 36% лиц в возрасте старше 60 лет, у лиц трудоспособного возраста снижение функции отмечается в 16% случаев, а при наличии сердечно-сосудистых заболеваний его частота возрастает до 26% [1, 2].

В настоящее время гемодиализные аппараты очищают кровь с помощью полупроницаемых мембран, удаляя низкомолекулярные и среднемолекулярные токсины с помощью диализных мембран из потока крови. Но эффективность этого метода достигает своего максимума, и требуются новые подходы для решения задачи по удалению нежелательных для организма токсинов, как правило, высокомолекулярных веществ.

Мы предлагаем усовершенствовать процесс очистки крови путем введения в существующие гемодиализные аппараты дополнительной системы очистки. В дополнительной системе очистки крови будут адресно каталитически разлагаться средне- и высокомолекулярные соединения — шлаки на более мелкие компоненты. Которые затем вместе с потоком крови будут поступать в основной фильтр аппарата искусственная почка с полупроницаемыми мембранами и диализирующим раствором. Продукты распада токсинов будут более успешно удаляться из крови пациентов, поскольку обладают меньшими размерами и массой и легче проникают через диализные мембраны. Таким образом, можно будет существенно повысить эффективность процедуры гемодиализа и сократить время, необходимое для очистки крови от эндо- и экзотоксинов во время одного сеанса.

Нами была собрана модельная проточная система, прокачивающая тестовый раствор через микрореактор с иммобилизованным ферментом уреазы, который разлагает один из основных метаболитов-шлаков крови — мочевины. Модельная проточная система представляла собой магистральную водно-солевую систему с перистальтическим насосом, который перегонял по силиконовым трубочкам со скоростью 5 мл/мин тестовый раствор с мочевиной через закрытую камеру с микрореактором. Микрореактор представлял собой пластиковую пластинку площадью 1 см² (0,5×2) с нанесенным на нее ферментом уреазы по методу, предложенному в ИТЭБ РАН [3—5] и покрытую слоями и полиэлектролитов ПСС-ПААГ и ПСС-ПААГ-ПСС. Общий объем тестового раствора составлял 50 мл, из них объем жидкости в силиконовых трубочках и камере составлял 16 мл. Концентрация мочевины в растворе составляла 40 мМ, Прокачка 50 мл буфера PBS с мочевиной через проточную систему со скоростью 5 мл/мин показала, что микрореакторы успешно перерабатывают мочевины тестового раствора, имитирующего кровь большого ХПН терминальной стадии.

После нахождения микрореакторов в тестовых растворах в течение 2—3 часов, начальные скорости разложения мочевины снижались примерно в 5 раз. Но после отмывки системы водой с небольшим количеством этилового спирта, начальные скорости возвращались к первоначальным значениям. Это свидетельствует о том, что ферменты не повреждались, а скорее уменьшалась проницаемость полимерного слоя, отделяющего ферменты от внешней среды.

Оценка возможности использования микрореакторов по уменьшению концентрации мочевины в крови показала, что в пересчете на 5 литров крови больного ХБП (с концентрацией мочевины 25 мМ) потребуется иммобилизовать 300—500 мкг фермента уреазы, чтобы разложить мочевины за один час. Это предварительные расчетные значения, полученные на простейшей модельной системе.

Отметим, что качество процедуры гемодиализа оценивается по изменению концентрации мочевины в крови до начала диализа и после 4—5 часового сеанса. Считается, что снижение концентрации мочевины на 65—70% является удовлетворительным результатом. Однако, как отмечают авторы [6], концентрации мочевины и креатинина при этом остаются на высоком уровне и зачастую не достигают значений нормы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Смирнов А.В., Каюков И.Г., Есаян А.М. и др.* Превентивный подход в современной нефрологии // *Нефрология* 2004;8(3):7-14. doi: 10.24884/1561-6274-2004-8-3-7-14
2. *Бикбов Б.Т., Томилина Н.А.* Состояние заместительной терапии больных с хронической почечной недостаточностью в Российской Федерации в 1998—2007 гг. (Аналитический отчет по данным Российского регистра заместительной почечной терапии) // *Нефрология и диализ* 2009;11(3):144-233
3. *Терновский В.И., Чернохвостов Ю.В., Фомкина М.Г., Монтрель М.М.* Потенциометрический сенсор на основе уреазы, иммобилизованной в полиэлектrolитных микрокапсулах // *Биофизика* 2007. Т. 52. № 5. С. 825—829.
4. *Монтрель М.М., Терновский В.И., Фомкина М.Г., Петров А.И.* Ультратонкое полимерное покрытие, способ его изготовления и ферментативный биосенсор на его основе // *Бюл.* № 25, 10.09.2008. Патент № 2333231.
5. *Фомкина М.Г., Монтрель А.М., Минкабиров Г.М.* Способ получения подложек с многослойным покрытием на основе полиэлектrolитных микрокапсул, содержащих биологически активные материалы // *Бюл.* № 31, 10.11.2015. Патент на изобретение № 2567320.
6. *Воеводина Н.В., Лидохова О.В., Макеева А.В.* Оценка эффективности гемодиализа как метода заместительной терапии при хронической почечной недостаточности // *Международный студенческий научный вестник.* 2017. № 4—7.

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИНИАТЮРНЫХ МАТРИЧНЫХ ИК КАМЕР, РАБОТАЮЩИХ ПОД УПРАВЛЕНИЕМ СМАРТФОНОВ, В МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ. ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Хижняк Е.П. и Хижняк Л.Н.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.

e-mail: exmail2@mail.ru

Температура является одной из важнейших характеристик состояния здоровья человека. Бесконтактные инфракрасные медицинские термометры широко применяются в последние годы в медицинской диагностике, однако регистрация пространственных распределений температур с помощью таких термометров весьма проблематична. Температурные распределения на поверхности тела позволяют определить локализацию патологических процессов, связанных с воспалительными процессами, спазмом, различными формами нарушений кровотока, локальными нарушениями метаболизма и развитием онкологических новообразований. Инфракрасная (ИК) термография является наиболее совершенным методом регистрации пространственного распределения температур. Этот метод диагностики абсолютно безопасен для человека, так как в основе метода лежит принцип регистрации температур по собственному излучению, поэтому он может без каких-либо ограничений использоваться в медицинской диагностике.

В последнее время появились недорогие, миниатюрные ИК камеры (тепловизоры), работающие под управлением смартфонов. По температурной чувствительности и пространственному разрешению такие ИК камеры вполне сопоставимы с характеристиками медицинских тепловизоров, при гораздо меньшей стоимости.

Идея использования таких ИК камер в медицинской диагностике определяется рядом причин. Портативность камер позволяет их использовать в палатах больных и машинах скорой помощи, в том числе — в полевых условиях. Доступность программных средств разработчика (SDK) позволяет установить на управляющем смартфоне программы обработки ИК данных и средств передачи результатов с помощью интернета; в перспективе возможно создание персональных диагностических систем.

Цель исследования — Анализ реальных технических характеристик ИК камер (тепловизоров), работающих под управлением смартфонов, и выработка рекомендаций по применению таких ИК камер в медицинской диагностике.

В работе использовались ИК камеры типа «Seek Thermal compact PRO» (США) с пространственным разрешением 320×240 и заявленной точностью регистрации температуры ± 2 °С, и две ИК камеры фирмы «Orgal» (Израиль) с пространственным разрешением 384×288 , типа «Therm-App» с обеспечивающая точность ± 2 °С и типа «Therm-App MD» с заявленной точностью регистрации температуры $0,5$ °С.

На базе данных ИК камер был собран лабораторный макет диагностической системы, оснащенный экспериментальным пакетом программ обработки ИК изображений непосредственно на смартфоне, под управлением которого работали ИК камеры.

Результаты и обсуждение. Проведены детальные исследования реальных технических параметров указанных камер в диапазоне температур окружающей среды от 18 до 30 °С, что соответствует требованиям для портативных медицинских диагностических систем.

ИК камера типа «Therm-App MD» рассматривалась в качестве наиболее перспективной, поскольку (согласно заявлению фирмы-изготовителя) она должна иметь точность регистрации температуры $0,5$ °С и может применяться для выявления больных с повышенным значением температуры в аэропортах (в том числе в период Covid-19).

Показано, что ни одна из обозначенных выше ИК камер не в состоянии обеспечить необходимую для медицинской диагностики точность температурных измерений даже при регистрации ИК изображений с поверхности температурного образца типа «Чёрное тело» в диапазоне температур на поверхности «Чёрного тела» от 20 до 40 °С. Реальная ошибка измерений наиболее совершенной ИК камеры типа «Therm-App MD» более чем двукратно превышает заявленную производителем величину, причем только после 20 — 30 минутной адаптации данной ИК камеры к условиям окружающей среды. Ошибка температурных измерений двух других ИК камер была ± 2 — 3 °С после 20 — 30 минутной адаптации к условиям окружающей среды. Без адаптации к условиям окружающей среды ошибка температурных измерений у всех трех типов ИК камер может возрасти до 3 — 5 °С.

Показано, что точность измерений может быть улучшена при использовании метода оперативной коррекции результатов температурных измерений с применением одного, а лучше — двух внешних реперных температурных образцов с известными значениями температуры, расположенных в поле регистрации ИК изображения. Данный метод коррекции прекрасно реализуется в диагностических системах на базе ИК камер, работающих под управлением смартфонов, при установке на управляющем смартфоне соответствующего

пакета программных средств, и вполне приемлем для оперативного выявления больных с повышенным значением температуры, в том числе в аэропортах, а также для выявления и локализация острых воспалительных процессов. Однако необходимость во внешних реперных образцах существенно ограничивает мобильность таких диагностических систем и практически исключает возможность их использования в палатах больных и машинах скорой помощи (особенно — в полевых условиях).

В настоящее время ведутся перспективные разработки в двух направлениях.

Совместно с Государственным институтом прикладной оптики (г. Казань) ведутся работы по созданию принципиально новой ИК камеры, работающей под управлением смартфона, обеспечивающей точность температурных измерений не хуже 0,2 °С.

Разрабатывается гораздо более перспективный и принципиально новый метод, не требующего использования внешних реперных температурных образцов. К настоящему моменту проведена предварительная апробация данного метода в клинических условиях при диагностике воспалительных и сосудистых заболеваний, диагностическим критерием которых является относительный перепад температур между разными участками тела.

После завершения перечисленных выше разработок и их доклинической апробации предполагается оформление патентов.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ

Хмиль Н.В.¹, Павлик Л.Л.¹, Германова Э.Л.², Лукьянова Л.Д.², Миронова Г.Д.¹

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

² Институт общей патологии и патофизиологии, РАН, Москва, Россия.

e-mail: mironova40@mail.ru

В работе исследовали моделируемое в условиях *in vivo* влияние однократного воздействия трех различных режимов гипобарической гипоксии (ГБГ), различающихся по содержанию O₂ во вдыхаемом воздухе (FiO₂—14%—10%—8%), на формирование митохондрио-зависимых адаптивных процессов в миокарде. Работа проведена на двух фенотипах крыс: низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) к гипоксии. Изучено исходное содержание митохондриальных ферментов миокарда (МС I—V), как показателя состояния энергетической функции при нормоксии двух различных по переносимости недостатка кислорода фенотипов крыс (НУ и ВУ). А также изменения в

ультраструктуре трех субпопуляций митохондрий и уровне митохондриальных ферментов миокарда после однократного 30 мин воздействия ГБГ разной степени тяжести [1].

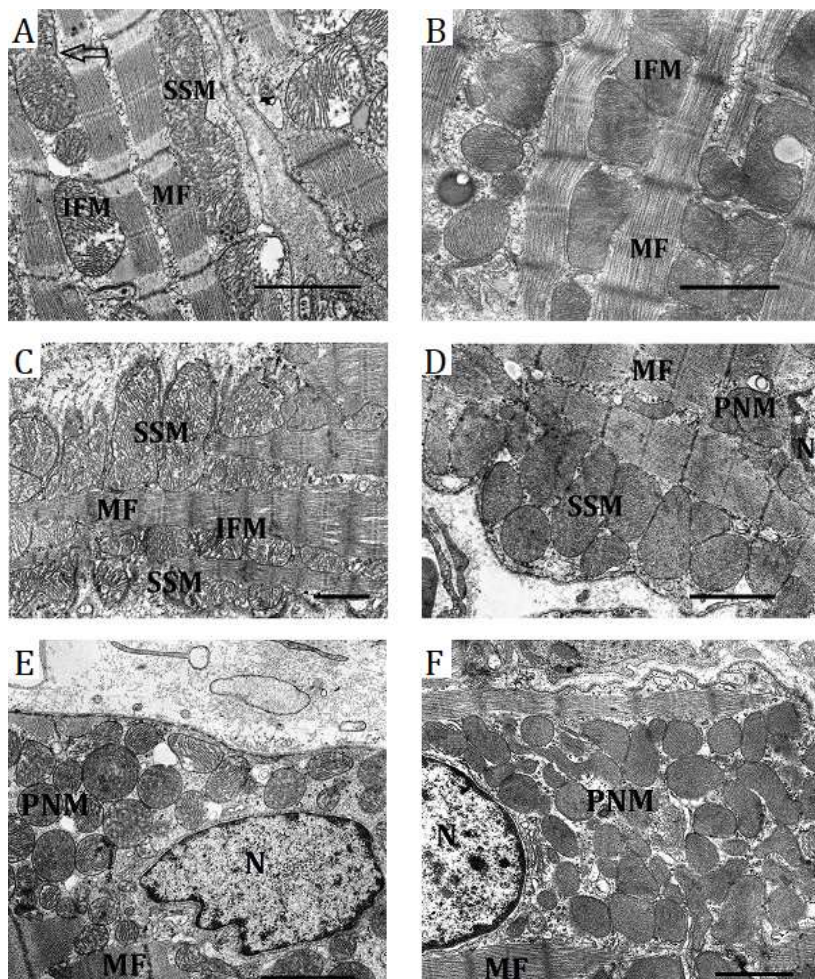
Установлено, что наряду с описанными ранее ультраструктурными отличиями НУ и ВУ животные имеют исходные различия в содержании исследуемых каталитических субъединиц митохондриальных комплексов в нормоксических условиях, которые возможно обеспечивают характер резистентности этих животных к гипоксии (табл. 1).

Таблица 1

Содержание в нормоксических условиях каталитических субъединиц митохондриальных ферментов (МС I—V) в КГМ крыс с исходно разной толерантностью к гипоксии (низкоустойчивые — НУ и высокоустойчивые — ВУ, ОДЕ — отн. денс. ед.)

<i>Тип крыс</i>	<i>NDUFB2 (МС I) ОДЕ</i>	<i>SDHA (МС II) ОДЕ</i>	<i>Cyt b (МС III) ОДЕ</i>	<i>COX1 (МС IV) ОДЕ</i>	<i>ATP5P (МС V) ОДЕ</i>
ВУ	334 ± 17,05	217 ± 14,58	215 ± 12,99	298 ± 11,09	412 ± 21,09
НУ	285 ± 10,61	174 ± 4,03	174 ± 12,27	251 ± 10,02	356 ± 15,02
ВУ/НУ, %	117#	125#	124#	119#	116#

«Слабое» и «умеренное» 30 мин воздействие ГБГ не приводило деструктивным изменениям в ультраструктуре всех трех субпопуляций митохондрий НУ и ВУ животных. Однако при «тяжелой» гипоксии у НУ животных кроме адаптивных изменений наблюдались и небольшие деструктивные, характерные для патологических состояний нарушения (хаотичное расположение и лизис крист, вакуолизация, диффузный лизис миофибриллярных пучков). Тем не менее подобные изменения были замечены исключительно в межфибриллярной субпопуляции митохондрий (рис. 1 А). В субсарколеммальной зоне особенно у НУ животных при «тяжелой» гипоксии усиливались процессы слияния митохондрий. Они резко укрупнились, вытягиваясь в длину. Клеточная мембрана при этом плотно опоясывала митохондрии, что придавало ей извилой характер (рис. 1 С, D), увеличивая площадь их общения с кислородом крови. Характерным отличием для митохондрий в окооядерной зоне была разница в размерах между ВУ и НУ. Однако у НУ в отличие от ВУ, резко увеличивалось общее количество мелких органелл, а форма становилась более полиморфной. Наряду с контактами типа “kissing junctions” встречались нанотуннели (рис. 1 С, D). Митохондрии становились более рыхлыми. Между кристами во многих митохондриях появлялись просветы.



Отличительной чертой в морфологии кардиомиоцитов при «тяжёлой» гипоксии как у НУ, так и у ВУ было изменение локализация ядер и их появление около сарколеммы (рис. 1 С, D). Процент таких ядер у ВУ и НУ был одинаков и составлял в среднем 25%. Движение ядер в сарколемме, как и перераспределение околоядерных митохондрий вокруг ядра, вероятно, является одним из механизмов адаптации организма к гипоксии.

Наряду с изменениями в ультраструктуре миокарда, изучено влияние однократного воздействия ГБГ разной степени тяжести на содержание каталити-

ческих субъединиц митохондриальных комплексов MC I—V у ВУ и НУ животных (табл. 2).

Таблица 2

Содержание митохондриальных ферментов (MC I-V) в миокарде крыс с исходно разной толерантностью к гипоксии после воздействия различных режимов ГБГ, % от контроля

Режим ГБГ	NDUFV2 (MC I)		SDHA (MC II)		Cyt b (MC III)		COX1 (MC IV)		ATP5P (MC V)	
	ВУ	НУ	ВУ	НУ	ВУ	НУ	ВУ	НУ	ВУ	НУ
3000	99	100	119	118	116	119	105	107	110	105
5000	88	83	123	124	110	122	115	110	110	114
7000	99	100	97	114	117	115	98	97	104	109

Из полученных данных можно сделать вывод, что «слабое» и в еще большей мере «среднее» ГБГ воздействие приводит к увеличению содержания SDHA (MC II), на фоне незначительных изменений NDUFV2 (MC I). Переключение окисления с NAD-зависимых субстратов в дыхательной цепи на окисление сукцината рассматривается, в настоящее время, как эволюционно сформированный срочный сигнальный адаптивно-компенсаторный регуляторный механизм, благодаря которому обеспечивается сохранение энергосинтезирующей функции дыхательной цепи в достаточно широком диапазоне сниженных значений концентрации кислорода в среде. Применение «тяжелое» ГБГ воздействия не приводило к существенным изменениям в содержании MC I—V.

Таким образом, после однократной 30 мин тренировки различными режимами гипоксии не было вывлено драматических деструктивных изменений внутренней организации митохондрий. Органеллы сохраняли структуру близкую к интактной, в том числе сохранялась интактность мембран и организация крист. Транслокацию и перегруппировку митохондрий под сарколеммальную и ядерной мембраной, которые мы наблюдали при некоторых воздействиях гипоксии, можно рассматривать как адаптивную, компенсаторно-приспособительную реакцию митохондриального аппарата животной клетки на изменения физиологического состояния организма в целом. Адаптация миокарда реализуется также за счет перестройки митохондриальной системы энергообеспечения, сопровождающейся активацией окисления сукцината, что приводит к усилению работы цитохромного участка дыхательной цепи, а также АТФ-синтазной активности. Работа поддержана грантом РФФ № 23-25-00441.

ЛИТЕРАТУРА

Germanova E., Khmil N., Pavlik L., Mikheeva I., Mironova G., Lukyanova L. // Int. J. Mol. Sci, 2022, 23, 14248, <https://doi.org/10.3390/ijms232214248>.

ФОТОБИОМОДУЛЯЦИЯ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* С ПОМОЩЬЮ КРАСНОГО И БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Храмов Р.Н.¹, Заломова Л.В.², Фесенко Е.Е.(мл.)²

- ¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН.
- ² Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

e-mail: khramov30@mail.ru

Предпосылки и цели. Совокупность метаболитов (метаболом) в крови образно называют молекулярным «зеркалом» нашего здоровья. Новейшие данные показали, что 69% ассоциаций метаболитов являются продуктом жизнедеятельности исключительно микробиома, 15% — продукты метаболизма хозяина, обусловленные в значительной мере его геномом, и 16% — находятся под гибридным контролем генома и микробиома [1]. Микробиом человека является важным предиктором изменений в фенотипе хозяина [2]), обуславливая до 20% адаптации хозяина и связанных с ней клеточных/молекулярных явлений, тогда как геном хозяина обуславливает менее 2% модификаций [3]. Результаты исследования признаны многообещающими в разработке терапии нарушений метаболизма, при наличии возможности управления микробиомом, в частности манипулируя поступлением метаболитов 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 можно рассматривать как мишени для фармакологических и нелекарственных вмешательств, одним из которых является фотобиомодуляция (ФБМ). ФБМ применяется достаточно широко для облегчения боли, заживления ран и т.п. Для этого используется свет на различных длинах волн. Но нет единого представления об оптимальных длинах волн и дозах облучения. ФБМ терапия работает через предполагаемые механизмы, зависящие от длины волны, включая прямую стимуляцию дыхания митохондрий и/или активацию трансмембранных сигнальных каналов путем изменения активности воды и другое. Достаточно новым направлением ФБМ является внешнее (через стенку живота) облучение микробиоты кишечника (МК), которой отводят роль важнейшего органа холоорганизма [4]. Именно МК определяют как ключевой фактор здоровья. Дисбактериоз кишечника,

характеризующийся снижением микробного разнообразия и изменением микробного состава, признан одним из основных факторов множества заболеваний. К примеру, микробиом пациентки с раком груди показал значительные изменения в разнообразии после курса ФБМ лечения, но не после собственно противораковой терапии, с увеличением доли известных полезных и уменьшение числа потенциально патогенных бактерий.

Дизайн исследования, материалы и методы. Для значимого воздействия на экосистему МК через поверхность живота целесообразно использовать свет в «окне прозрачности» биологических тканей (600—1500 нм) [5]. Мы впервые попытались оценить влияние прямой ФБМ в выделенной экосистеме микроорганизмов МК *in vitro*, полученной из образцов фекалий человека. При этом сравнивалась эффективность ФБМ при светодиодном красном и ближнем инфракрасном (БИК) излучении 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. 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 криотеста более чем в три раза превышал при 940 нм таковой при 660 нм (соответственно 23 и 7%) в диапазоне доз от 10 до 600 J/m². Аналогичная картина наблюдалась и для микроорганизмов *Bifidobacterium breve*: после облучения при 940 нм прирост выживаемости достигал 10%, а при 660 нм не наблюдалось значимых изменений в диапазоне 10—160 J/m². ФБМ на длине волны 660 нм не оказывала значимого влияния на кривые роста *Bifidobacterium breve*, в то время как ФБМ 940 нм вызывала через 4 и 6 часов культивирования существенные изменения кривых роста: подавление на 3,5% и увеличение на 9% по сравнению с контрольными (после нагрузочной процедуры криоконсервации). На культуре МК после криоконсервации излучение на 940 нм вызывало значимые изме-

нения в широком диапазоне доз: при очень низкой дозе 1 J/m^2 и при достаточно больших дозах до $67\ 800 \text{ J/m}^2$. При этом эффекты были позитивными и не зависели от теплового воздействия.

Заключение. Представлена первая демонстрация различной чувствительности бактерий МК *in vitro* в ответ на ФБМ, инициируемую красным и ближним инфракрасным светодиодным излучением. Обнаружены специфические для клеточного типа (штамма) различия в ответе на ФБМ воздействие *in vitro*. Полученные результаты подтверждают возможность воздействия светодиодного излучения 660 и 940 нм на исследованную микрофлору. Показано, что ближний инфракрасный свет (940 нм) может более позитивно воздействовать на микроорганизмы МК. Для проявления эффектов ФБМ можно использовать дополнительную нагрузку в виде криповреждения. Есть основания полагать, что ФБМ может быть особенно эффективна при различных заболеваниях или стрессорных воздействиях, приводящих к дисбиозу, при котором погибают полезные микроорганизмы МК человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Diener C., Dai C.L., Wilmanski T. et al. Genome–microbiome interplay provides insight into the determinants of the human blood metabolome // *Nature Metabolism*, 10 November 2022; DOI: 10.1038/s42255-022-00670-1.
2. Ursell L.K., Metcalf J.L., Parfrey L.W., Knight R. Defining the human microbiome // *Nutr Rev.* 2012 Aug; 70 Suppl 1(Suppl 1):S38–44. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00493.
3. Puce L., Hampton-Marcell J., Trabelsi K. et al. Swimming and the human microbiome at the intersection of sports, clinical, and environmental sciences: A scoping review of the literature // *Microbiol.* 2022 Aug 3;13:984867. doi: 10.3389/fmicb.2022.984867.
4. Bicknell B., Laakso E.L., Liebert A., Kiat H. Modifying the Microbiome as a Potential Mechanism of Photobiomodulation: A Case Report // *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2022 Feb; 40(2):88–97. DOI: 10.34756/GEOS.2022.17.38251; 10.34756/GEOS.2022.17.3825110.1089/photob.2021.0057.
5. Храмов Р.Н. На пути к разработке экзогенной фотобиомодуляции микробиоты кишечника человека / *Материалы конференции «Теоретическая и экспериментальная биофизика»* / под ред. чл.-корр. РАН Иваницкого Г.Р. — Издательство: «Синхробук» (Synchrobook™), 2021. С. 57—59.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ С БИОМАКРОМОЛЕКУЛАМИ МЕТОДОМ ФУНКЦИОНАЛА ПЛОТНОСТИ: *QUO VADIS?*

Чуев Г.Н.¹, Федотова М.В.², Морозов Д.³

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия.

² Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Россия.

³ Институт белка РАН, Пушкино, Россия.

e-mail: genchuev@rambler.ru

Взаимодействие наночастиц с биологическими объектами является одним из ключевых факторов, определяющих возможность использования наночастиц в бионанотехнологических приложениях. Корректное экспериментальное определение и/или аккуратный, сопоставимый с экспериментальными данными, расчет характеристик этого взаимодействия имеет большое значение для прогнозирования эффективности использования наночастиц. Однако определение параметров гидратации и ассоциации комплексов биомолекул с наночастицами с помощью экспериментальных методов во многих случаях представляет значительную проблему. Чрезвычайно затратными оказываются в этом случае и расчеты методами численного моделирования. Сложность подобных исследований связана с двумя причинами. Во-первых, и биомолекулы, и наночастицы включают огромное число атомов (от сотен до нескольких десятков тысяч). Во-вторых, они вовлечены в большое количество межмолекулярных взаимодействий — с водой (гидратация), между собой (ассоциация, самоагрегация), с присутствующими в среде ионами (ассоциация) или с лигандами (комплексобразование). Вместе с тем, от специфики проявления этих взаимодействий существенным образом зависит биологическая активность наночастиц. Теория функционала плотности классических молекулярных растворов может быть одним из эффективных способов решения этой проблемы. Мы разработали новый подход для исследования взаимодействия наночастиц с биомакромолекулами, основанный на этой теории [1]. Наш метод базируется на расчете атомных плотностей и позволяет описывать структуру молекулярных растворов в терминах трехмерной плотности распределения атомов, из которых состоят молекулы раствора. Разработанный нами метод имеет ряд преимуществ по сравнению с другими расчетными методами. А именно: 1) он дает возможность эффективно и просто исследовать влияние отдельных химических групп на состояние сольватированного комплекса; 2) вычислительные затраты на 2—3 порядка ниже, чем аналогичные затраты при расчетах методом молекулярной динамики. Возможности метода были протестированы для ряда био-нано си-

стем. В частности, было показано, что метод обеспечивает высокую точность и чрезвычайно мало малое время расчета гидратной структуры сольватированных белков [2] характерный радиус которых порядка 1-2 нм. Метод также позволяет быстро и эффективно определять детали взаимодействия между гидратированными наночастицами из двуоксида кремния с характерными размерами 10—30 нм [3]. Точность метода достаточно высока для того, чтобы выявить, как модификации биомолекул влияют на взаимодействие между ними. В качестве примера было исследовано связывание двух типов коронавируса COVID с рецептором hACE2 [4]. Было показано, что экспериментально наблюдаемая повышенная связываемость SARS-COV2 по сравнению с SARS-COV1 обусловлена, в первую очередь, формированием дополнительных мостиков, включающих молекулы воды. С практической точки зрения, результаты подобных расчетов могут быть востребованы при создании и в дизайне лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-23-00184).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Chuev G.N., Fedotova M.V., Valiev M.* Renormalized site density functional theory // Journal of Statistical Mechanics — Theory and Experiment, 2021, V. 2021, 033205.
2. *Kruchinin S.E. et al.* Protein 3D-Hydration: a Case of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor // International Journal of Molecular Science, 2022, 23(23), 14785.
3. *Chuev G.N., Dinpajoo M., Valiev M.* Molecular-based analysis of nanoparticle solvation: classical density functional approach // Journal of Chemical Physics, 2022, **157**, 184505.
4. *Kumawat N. et al.* Site Density Functional Theory and Structural Bioinformatics Analysis of the SARS-CoV Spike Protein and hACE2 Complex // Molecules, 2022, 27, 799.

РАЗЛИЧИЯ В РЕДОКС РЕАКЦИЯХ АКВА- И ЦИАНОКОБАЛАМИНОВ С ТИОЛАМИ И АСКОРБАТОМ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

Шаталин Ю.В., Шубина В.С., Соловьева М.Е., Акатов В.С.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: yury.shatalin@yandex.ru

Имеются убедительные доказательства того, что кобаламины могут участвовать в индукции окислительного стресса, тем не менее, механизмы, лежащие в основе этих эффектов, недостаточно изучены. Ранее нами было показано, что НОСbI в комбинации с тиолами, такими как глутатион, N-ацетилцистеин и дитиотреитол катализирует образование пероксида водорода в культуральной среде, развитие окислительного стресса и апоптотическую

гибель клеток Нер-2. Целью настоящей работы являлось сравнительное изучение взаимодействия НОСbI и CNCbI с некоторыми низко-молекулярными тиолами, а также сравнительный анализ продукции активных форм кислорода (АФК) в процессе кобаламин-катализируемого окисления тиолов и цитотоксического действия комбинаций тиол-кобаламин. Было установлено, что окисление тиолов, катализируемое как НОСbI, так и CNCbI, сопровождается продукцией АФК и, в определенных условиях, индуцирует окислительный стресс и гибель клеток. Форма витамина В₁₂ и структура тиола играют решающую роль в этих процессах. Установлено, что механизмы и кинетика окисления тиолов, катализируемого НОСbI и CNCbI, существенно различаются. НОСbI увеличивает скорость окисления тиолов в большей степени, чем CNCbI. Однако, в отличие от CNCbI, НОСbI формирует стабильные комплексы с монотиолами. Данные комплексы проявляют высокую антиоксидантную активность и, по всей видимости, способны элиминировать АФК, формирующиеся в биологических системах. Это могло бы объяснить более высокий уровень накопления АФК в процессе окисления монотиолов CNCbI и более выраженную цитотоксичность комбинаций данных монотиолов с CNCbI.

Мы обнаружили, что, НОСbI и CNCbI в сочетаниях с тиолами, наряду с обнаруженными различиями в редокс взаимодействиях, также вызывают отличающиеся биологические эффекты. В частности, эти формы кобаламина по-разному действуют на окисление таких тиол-содержащих веществ, как тиокарбаматы, а именно, диэтилдитиокарбамата (DDC), метаболита лекарственного препарата дисульфирама (DSF). Это приводит к различиям в цитотоксичности сочетания НОСbI и CNCbI с DDC: наблюдается резкое усиление цитотоксического эффекта гидроксикобаламином и отсутствие такого усиления при сочетании DDC с CNCbI. При этом генерации АФК не наблюдается в обоих случаях. Комбинированное применение DDC и гидроксикобаламина (витамин В_{12b}), ведущее к образованию окисленных сульфопроизводных дисульфирама, вызывает неапоптотическую параптозоподобную форму гибели клеток Нер-2 и MCF-7. Интересно также отметить, что CNCbI в сочетании с аскорбатом не проявляет прооксидантное действие и не вызывает усиления цитотоксичности аскорбата, в отличие от НОСbI.

В целом, полученные данные позволяют по-новому взглянуть на окислительно-восстановительные процессы, в которых участвуют кобаламины. Наши результаты также могут быть полезны при разработке новых подходов к лечению некоторых кобаламинозависимых расстройств, важным компонентом которых является окислительный стресс.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shatalin Y.V., Shubina V.S., Solovieva M.E., Akatov V.S.* Differences in the formation of reactive oxygen species and their cytotoxicity between thiols combined with aqua- and cyanocobalamins // *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 11032. <https://doi.org/10.3390/ijms231911032>.
2. *Solovieva M. Shatalin Y., Odinkova I., Krestinina O., Baburina Y., Mishukov A., Lovninskaya Y., Pavlik L., Mikheeva I., Holmuhamedov E., Akatov V.* Disulfiram oxyderivatives induce entosis or paraptosis-like death in breast cancer MCF-7 cells depending on the duration of treatment // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2022, 1866, 130184. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130184>.

НОВЫЙ КЛАСС ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ОКРАШИВАНИЯ ТКАНИ

*Шаталин Ю.В.¹, Шубина В.С.¹, Шацаускас А.Л.^{2,3}, Черненко С.А.^{2,3},
Костюченко А.С.^{2,3}, Фисюк А.С.^{2,3}*

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

² Омский государственный технический университет, Омск, Россия.

³ Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского, Омск, Россия.

e-mail: shubinavictoria@yandex.ru

Гистологический метод исследования находит широкое применение для изучения морфологии и структуры клеток, тканей и органов. В частности, гистологические исследования проводят для диагностики различных заболеваний, быстрой диагностики поражения тканей или органов в ходе операции, иммуногистохимического анализа. В этих случаях готовят криосрезы ткани. Анализ криосрезов является полезным инструментом для быстрой оценки образцов тканей. Нами разработан метод синтеза и исследована возможность применения новых синтезированных 5-этил-5,6-дигидробензо[с][1,7]нафтиридин-4(3H)-онов для окраски криосрезов кожи крыс. Данные флуорофоры имеют близкие фотофизические свойства, но отличаются по лиофильности за счёт заместителя при атоме N(3). Установлено, что отдельные соединения окрашивают все слои эпидермиса, некоторые не клеточные структуры дермы, а также сальные железы и отдельные структуры волосяного фолликула, в частности, наружное эпителиальное влагалище, а также кровеносные сосуды. Соединение, содержащее карбоксильный фрагмент и обладающее меньшей липофильностью, практически не окрашивает эпидермис, сальные железы и структуры волосяного фолликула, соединительноткан-

ную оболочку волоса и кровеносные сосуды, практически не наблюдается окрашивания структур сосочкового слоя дермы (рисунок). В то же время, данное соединение довольно интенсивно и менее избирательно по сравнению с другими исследованными соединениями окрашивает структуры сетчатого слоя дермы. В свою очередь, окрашивание срезов липофильными соединениями позволяет различить отдельные клетки эпидермиса и сальных желез. Несколько большая интенсивность флуоресценции наблюдается в области ядер себоцитов.

В целом, окрашивание криосрезов кожи данными красителями позволяет быстро и просто визуализировать структуру сальных желез и не мешает последующему окрашиванию ткани другими красителями, что является преимуществом использования данных красителей. Скорость фотовыгорания красителей в криосрезах сопоставима с выгоранием флуоресцеина. Полученные соединения представляют интерес как основа новых флуоресцентных гистологических красителей и клеточных зондов.

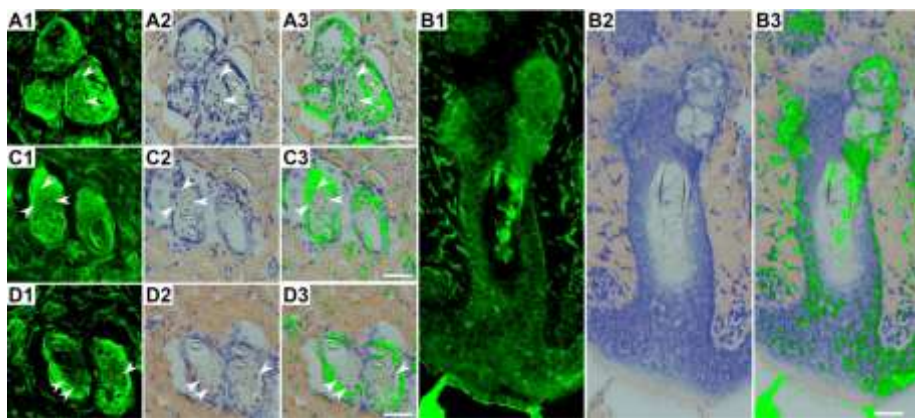


Рисунок. Микрофотографии срезов кожи после окрашивания исследуемыми соединениями и азур-эозином. Криосрезы окрашены исследуемыми соединениями 5-этил-2-метил-6-фенил-5,6-дигидробензо[с][1,7]нафтиридин-4(3H)-он (A1, B1, C1), 3,5-диэтил-2-метил-6-фенил-5,6-дигидробензо[с][1,7]нафтиридин-4(3H)-он (D1) с последующим окрашиванием азур-эозином (A2, B2, C2, D2). Совмещенные изображения (A3, B3, C3, D3). Сальные железы (A, C, D) и волосяной фолликул (B). Масштабный отрезок 100 мкм

Результаты исследования подробно описаны в публикации журнала *Dyes and Pigments*, 2022, 204: 110388.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-13-00356.

УЛЬТРАЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ РАКОВО-СЕТЧАТОЧНЫХ АНТИГЕНОВ ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ УРОЛОГИЧЕСКИХ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ

Шляпников Ю.М., Малахова Е.А., Шляпникова Е.А.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

e-mail: yuri.shlyapnikov@gmail.com

Урологические онкозаболевания, такие как рак почки (ПКР), мочевого пузыря (РМП) и предстательной железы (РПЖ), широко распространены и характеризуются высоким уровнем смертности. Одним из подходов к повышению эффективности их диагностики может стать поиск новых неинвазивных биомаркеров в жидкостной биопсии и разработка более чувствительных методов их выявления. Ранее было показано, что ряд зрительных белков, известных как раково-сетчаточные антигены, экспрессируются в некоторых злокачественных опухолях. В данной работе исследована возможность диагностики урологических онкозаболеваний с помощью ультрачувствительного определения раково-сетчаточных антигенов — аррестина, рековерина, родопсинкиназы и трансдуцина — в жидкой биопсии методом иммуноанализа на микрочипах с детекцией магнитными частицами.

Чтобы иметь возможность проводить массовый иммунохимический анализ сотен биологических образцов с высокой чувствительностью, был разработан метод иммуноанализа на усовершенствованных микрочипах с химическим управлением смачиваемости поверхности. Непрореагировавшие активные группы на поверхности микрочипа после ковалентной иммобилизации белка блокировали амином с перфторнонанооильной группой, присоединенной через дисульфидный линкер. Такая поверхность гидрофобна, что обеспечивает высокоэффективный массоперенос аналита к активным зонам в простой экспериментальной системе: микрочип находится во вращающейся пробирке с образцом. Благодаря гидрофобной поверхности при стекании образца с поверхности микрочипа на ней не остается перемешиваемого слоя жидкости. В результате объем образца, непосредственно контактирующий со связывающими центрами на микрочипе, постоянно обновляется, и реакции связывания аналита не переходит в крайне медленный диффузионно-контролируемый кинетический режим. Перед детекцией сигнала дисульфидные связи расщепляются трис(2-карбоксиэтил)фосфином, и гидрофобные перфторалкильные цепи удаляются с поверхности микрочипа, в результате чего она становится гидрофильной. Как было показано ранее, гидрофильные свойства поверхности яв-

ляются абсолютно необходимыми для детекции сигнала путем сканирования микрочипа суперпарамагнитными частицами, покрытыми специфическими антителами, в ламинарном потоке и магнитном поле. Применение этого метода детекции обеспечивает ультравысокую чувствительность анализа. Значения предела обнаружения для типичных белковых биомаркеров составляют 1 фМ при времени инкубации 1 ч.

По результатам анализа образцов сыворотки крови, полученных от 50 больных ПКР и 17 здоровых контролей, был сделан вывод о низкой диагностической эффективности анализа сыворотки крови: значения чувствительности и специфичности раково-сетчаточных антигенов не превышали 70%. Вместе с тем, анализ мочи показывает намного более высокую диагностическую эффективность. Были исследованы образцы мочи 89 пациентов с ПКР, 40 — с РМП, 40 — с РПЖ и 50 пациентов контрольной группы. Было показано, что раково-сетчаточные антигены в концентрациях порядка пг/мл часто выявляются в моче больных урологическими онкозаболеваниями. В то время как родопсинкиназа и трансдуцин продемонстрировали низкую предсказательную способность (значения площади под ROC-кривой, AUC, не превышали 0,7), результаты анализа показали высочайшую эффективность комбинации аррестина с рековерином в диагностике ПКР: при пороге 0,1 пг/мл чувствительность составила 96%, а специфичность — 92% (AUC 0,96; 95% доверительный интервал 0,93—0,99). В случае РМП чувствительность определения комбинации аррестина с рековерином составила 58% (AUC 0,76; 95% доверительный интервал 0,66—0,86), в случае РПЖ — 60% (AUC 0,78; 95% доверительный интервал 0,68—0,88). Для исследования послеоперационной динамики содержания раково-сетчаточных антигенов было также проанализировано 30 образцов мочи, полученных через 7 дней после удаления опухолей почки, простаты и мочевого пузыря. Установлено, что у больных, исходно имевших положительный результат анализа, после удаления опухоли указанные антигены в моче не обнаруживаются в 90% случаев.

Таким образом, ультрачувствительное иммунохимическое выявление аррестина и рековерина в моче является перспективным методом неинвазивной диагностики урологических онкозаболеваний. Вместе с тем, в случае положительного теста на данные антигены требуется дополнительное обследование для дифференциальной диагностики рака почки, мочевого пузыря и предстательной железы. Кроме того, аррестин с рековерином могут рассматриваться как потенциальные неинвазивные биомаркеры для оценки эффективности хода лечения.

Работа выполнена совместно с Институтом урологии и репродуктивного здоровья человека Первого МГМУ им. И.М.Сеченова и Институтом Молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М.Сеченова (Сеченовский Университет).

Работа поддержана грантом РФФ № 19-75-10025.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Шляпников Ю.М., Малахова Е.А., Потолдыкова Н.В., Светочева Я.А., Винаров А.З., Зинченко Д.В., Зерний Е.Ю., Замятнин А.А., Шляпникова Е.А.* Неинвазивная диагностика рака почки с помощью ультрачувствительной иммунодетекции раково-сетчаточных антигенов // Биохимия, 2022, 87 (7), 877—887.
2. *Шляпников Ю.М., Малахова Е.А., Винаров А.З., Потолдыкова Н.В., Владимиров В.И., Зерний Е.Ю., Замятнин А.А. мл., Шляпникова Е.А.* Раково-сетчаточные антигены в моче больных раком мочевого пузыря и предстательной железы // Биохимия, 2022, 87(11), 1646—1656.