



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

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОФИЗИКА

6–8 февраля 2019 года



Издательство
Синхробук
(Synchrobook™)
ПУЩИНО
2019

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

6–8 февраля 2019 года

Издательство Синхробук (Synchrobook™)

Пушино
2019

Теоретическая и экспериментальная биофизика : Материалы конференции «Теоретическая и экспериментальная биофизика», 6–8 февраля 2019 года. — Пушино : Синхробук (Synchrobook™), 2019. — 68 с.

ISBN 978-5-91874-015-6

Под ред. чл.-корр. РАН Иваницкого Г.Р.

ISBN 978-5-91874-015-6



9 785918 740156 >

© ИТЭБ РАН, Пушино, 2019

© Синхробук (Synchrobook™), Пушино, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Абдуллаев С.А., Губина Н.Е., Евдокимовский Э.В., Газиев А.И.</i> РЕПАРАЦИЯ ЯДНК И ГЕТЕРОПЛАЗМИЯ мтДНК В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС, ОБЛУЧЕННЫХ ПРОТОНАМИ 150 МЭВ	9
<i>Акуленко М.В., Кондрашова М.Н.</i> РАЗРАБОТКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ КЕТОГЛУТАРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЦИТОБИОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ И ЕЕ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИЕЙ В ОРГАНИЗМЕ	10
<i>Бобылёв А.Г., Якупова Э.И., Бобылёва Л.Г., Вихлянцев И.М.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА ТИТИНА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ <i>IN VITRO</i>	12
<i>Буданцев А.Ю., Демьянов А.Ю., Погорелова М.А.</i> ПОСТРОЕНИЕ 3-D МОДЕЛЕЙ КЛЕТОК МЕТОДАМИ ТРЕХМЕРНОЙ ГРАФИКИ	14
<i>Дынный В.В., Гришина Е.В., Федотчева Н.И.</i> О ВОЗМОЖНОМ УЧАСТИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ NO-ЗАВИСИМОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ ДЫХАНИЯ И ЦИКЛОСПОРИН-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ПОРЫ МИТОХОНДРИЙ	16
<i>Дюкина А.Р., Заичкина С.И., Розанова О.М., Сорокина С.С., Смирнова Е.Н., Поцелуева М.М., Наумов А.А., Юсупов В.И.</i> ДЕЙСТВИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА МЫШЕЙ <i>IN VIVO</i>	17
<i>Евдокимовский Э.В., Губина Н.Е., Абдуллаев С.А., Газиев А.И.</i> ИЗМЕНЕНИЯ В УРОВНЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК, А ТАКЖЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В МИТОХОНДРИЯХ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС, ОБЛУЧЕННЫХ ПРОТОНАМИ 150 МЭВ	19
<i>Иванов В.Е., Черников А.В., Гудков С.В., Брусков В.И.</i> ОБРАЗОВАНИЕ ДОЛГОЖИВУЩИХ АКТИВНЫХ ФОРМ БЕЛКОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕПЛА В РАСТВОРАХ ЖЕЛАТИНА И КАЗЕИНА	20
<i>Карманова Е.Е., Усачева А.М., Иванов В.Е., Черников А.В., Брусков В.И.</i> ОБРАЗОВАНИЕ ДОЛГОЖИВУЩИХ АКТИВНЫХ ФОРМ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ. ГЕНЕРАЦИЯ ИМИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ВЛИЯНИЕ НА ЭТОТ ПРОЦЕСС МЕКСИДОЛА	22
<i>Коломбет В.А., Лесных В.Н., Коломбет А.Е., Елистратов А.В.</i> ТРИ ЭТАПА	

В ИССЛЕДОВАНИИ УНИВЕРСАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ УТРАИВАЮЩИХСЯ ПЕРИОДОВ.....	24
<i>Кондрашова М.Н., Шварцбург П.М.</i> ГИПЕРАКТИВАЦИЯ ДЫХАНИЯ — ПРИЧИНА ПОДАВЛЕНИЯ ГЛИКОЛИЗА В ЛИМФОЦИТАХ ПРИ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА, ВОССТАНОВЛЕНИЕ ГЛИКОЛИЗА ОДНОВРЕМЕННО С НОРМАЛИЗАЦИЕЙ САХАРА КРОВИ ВАКЦИНАЦИЕЙ БЦЖ.....	25
<i>Корыстова А.Ф., Кублик Л.Н., Левитман М.Х., Самохвалова Т.В., Шапошникова В.В., Ким Ю.А., Корыстов Ю.Н.</i> ФЛАВОНОИДЫ ПОДАВЛЯЮТ УВЕЛИЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНГИОТЕНЗИН ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА В АОРТЕ КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ.....	27
<i>Куликов А.В., Архипова А.Ю., Филошкин Ю.Н., Архипова Л.В., Мндлян Е.Ю., Гаврилюк В.Б., Мойсенович М.М., Куликов Д.А.</i> РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ СПОСОБОВ КОМПЕНСАЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ ЛЕТАЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА.....	28
<i>Кутышено В.П., Микулинская Г.В., Прохоров Д.А., Паскевич С.И.</i> ВЛИЯНИЕ HIS-TAG И СПОСОБА ОЧИСТКИ НА АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРУ МЕТАЛЛОФЕРМЕНТА — L-АЛАНОИЛ-D-ГЛУТАМАТПЕПТИДАЗЫ БАКТЕРИОФАГА T5.....	30
<i>Минкабирова Г.М., Абдуллаев С.А.</i> ПОСТРАДИАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЯДЕРНОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В МОЧЕ КРЫС, ОБЛУЧЕННЫХ В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ ДОЗ, ИЛИ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ БЛЕОМИЦИНА.....	31
<i>Миронова Г.Д., Белослудцева Н.В., Мосенцов А.А., Розова Е.В., Маньковская И.Н.</i> НОВЫЙ ПОДХОД К ПРЕДУПРЕЖДЕНИЮ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ОРГАНИЗМЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ.....	33
<i>Михеев А.Ю., Авсеенко А.В., Морозов В.Н.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЛЬТРУЮЩИХ СВОЙСТВ СРЕДСТВ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ.....	35
<i>Мысин И.Е., Попова И.Ю., Осипов А.А.</i> БАЛАНС АДЕНИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ И ГИБЕЛЬ НЕЙРОНОВ. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ.....	36
<i>Перевязова Т.А., Юнусова А.К., Артюх Р.И., Железная Л.А.</i> ЭНДОНУКЛЕАЗА РЕСТРИКЦИИ VspD6II — НОВЫЙ ТЕРМОФИЛЬНЫЙ ИЗОШИЗОМЕР ФЕРМЕНТА Eco57I.....	37
<i>Попова С.С., Уланова А.Д., Грицына Ю.В., Салмов Н.Н., Рогачевский В.В., Михайлова Г.З., Бобылёв А.Г., Моренков О.С., Захарова Н.М.,</i>	

<i>Вихлянцев И.М.</i> ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА В ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТЫХ МЫШЦАХ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА (<i>SPERMOPHILUS UNDULATUS</i>) В ПЕРИОДЫ ЗИМНЕЙ АКТИВНОСТИ	39
<i>Сирота Н.П., Хижняк Е.П., Кузнецова Е.А.</i> ГЕНЕРАЦИЯ ТЕПЛА В ПРОЦЕССЕ ЩЕЛОЧНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА РЕЗУЛЬТАТЫ «КОМЕТА ТЕСТА»	41
<i>Сирота Т.В.</i> ДЕЙСТВИЕ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПРОЦЕСС ХИНОИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ, МОДЕЛИРУЮЩИЙ ОДИН ИЗ МЕХАНИЗМОВ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА	43
<i>Соловьева М.Е., Шаталин Ю.В., Фадеев Р.С., Соловьев В.В., Сазонов А.В., Кутышненко В.П., Акатов В.С.</i> ГИДРОКСИКОБАЛАМИН (ВИТАМИН В12) КАТАЛИЗИРУЕТ ОКИСЛЕНИЕ ДИЭТИЛДИТИОКАРБАМАТА И ПОВЫШАЕТ ЕГО ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ НЕЗАВИСИМО ОТ ИОНОВ МЕДИ	44
<i>Сорокина С.С., Заичкина С.И., Розанова О.М., Шемяков А.Е., Смирнова Е.Н., Дюкина А.Р., Мальков А.Е., Балакин В.Е., Пикалов В.А.</i> ВЛИЯНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПУЧКОВ ПРОТОНОВ И ИОНОВ УГЛЕРОДА НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ МЫШЕЙ В ОТДАЛЁННЫЕ СРОКИ	46
<i>Тараненко А.М.</i> ТЕОРИЯ ДИНАМИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЕЙ — ПРОРЫВНЫЕ РЕШЕНИЯ В СТРАТЕГИЧЕСКОЙ ЦЕЛИ НАУКИ В ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА ЖИЗНИ РОССИЯН	48
<i>Тараненко А.М.</i> МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗРЫВНЫХ ДИНАМИЧЕСКИХ РЕЖИМОВ ДЛЯ НОВЫХ МЕТОДОВ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ В ЛЕЧЕНИИ АДДИКТИВНЫХ СИНДРОМОВ	49
<i>Тирас Х.П.</i> ЕДИНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕПТИДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ МОРФОГЕНЕЗА ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ НА МОДЕЛИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЛОСКИХ ЧЕРВЕЙ — ПЛАНАРИЙ	51
<i>Фадеева И.С., Минайчев В.В., Кирсанова П.О., Одинцова О.А., Акатов В.С.</i> МИКРО- И НАНОРАЗМЕРНЫЙ ГИДРОКСИАППАТИТ В РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ХИРУРГИИ КОСТНОЙ ТКАНИ	53
<i>Фомкина М.Г., Замятина Е.А., Аппазов Н.О., Ибадуллаева С.Ж.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ ПОВЫШЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ, ПОМЕЩЕННЫХ В ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КАПСУЛЫ И МИКРОЯЧЕИСТЫЙ ПОЛИМЕРНЫЙ МАТЕРИАЛ	55
<i>Харечкина Е.С., Никифорова А.Б., Круглов А.Г.</i> РОЛЬ ЦИТОЗОЛЬНЫХ ПИРИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ	

СУПЕРОКСИДНЫХ ВСПЫШЕК В МИТОХОНДРИЯХ	56
<i>Хижняк Е.П., Хижняк Л.Н.</i> ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МИНИАТЮРНЫХ ИНФРАКРАСНЫХ КАМЕР НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ В МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ	58
<i>Хундерякова Н.В., Захарченко М.В., Ячкула Т.В., Федотчева Н.И., Литвинова Е.Г., Баранич Т.И., Сухоруков В.С., Артемьева С.Б., Косякова Н.И., Шварцбург П.М., Кондрашова М.Н.</i> ИНТЕГРАЛЬНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ИНТЕНСИВНОСТИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ У ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИХ ОСЛАБЛЕНИИ — МИОПАТИЯ У ДЕТЕЙ, ПОЖИЛОЙ ВОЗРАСТ — И В ХОДЕ ЛЕЧЕНИЯ	60
<i>Цеб В.Э.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКЗОТЕРМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В МИКРО, НАНО-ОБЪЕМАХ ВНУТРИ ЖИВОЙ КЛЕТКИ И РАЗРАБОТКА НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЕЙ	61
<i>Шемяков А.Е., Смирнова Е.Н., Розанова О.М., Заичкина С.И., Сорокина С.С., Дюкина А.Р., Балакин В.Е.</i> ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСА ПРОТОННОЙ ТЕРАПИИ «ПРОМЕТЕУС» ДЛЯ РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ЖИВОТНЫХ	62
<i>Шноль С.Э.</i> «ЛИКИ ВРЕМЕНИ» И СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ	64
<i>Шумейко С.А., Бобылёва Л.Г., Вихлянец И.М., Бобылёв А.Г., Якупова Э.И.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА АМИЛОИДНЫМИ АГРЕГАТАМИ ГЛАДКОМЫШЕЧНОГО ТИТИНА <i>IN VITRO</i>	66
<i>Шумейко С.А., Якупова Э.И., Бобылёв А.Г., Уланова А.Д., Салмов Н.Н., Вихлянец И.М., Бобылёва Л.Г.</i> ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АМИЛОИДНОЙ АГРЕГАЦИИ МИОЗИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО С-БЕЛКА	67

РЕПАРАЦИЯ яДНК И ГЕТЕРОПЛАЗМИЯ мтДНК В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС, ОБЛУЧЕННЫХ ПРОТОНАМИ 150 МЭВ

Абдуллаев С.А., Губина Н.Е., Евдокимовский Э.В., Газиев А.И.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
e-mail: saabdullaev@gmail.com

Исследования молекулярно-клеточных нарушений, возникающих на начальных этапах после воздействия ионизирующих излучений (ИИ) на головной мозг, представляются важными для поиска путей снижения индукции онкогенеза и когнитивных дисфункций. Мы исследовали репарацию ядерной ДНК (яДНК) и изменения общего количества копий митохондриальной ДНК (мтДНК), а также гетероплазмию (уровень мутантных копий) мтДНК в трех регионах мозга (в гиппокампе, коре и мозжечке) крыс, облученных протонами в дозе 3 и 5 Гр ($E = 150$ МэВ) на установке фазотрон медико-технического комплекса Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ, Дубна. В работе использованы методы количественной ПЦР на протяженных фрагментах ДНК (ПЦР-ПФ) и ПЦР в реальном времени, а также метод расщепления гетеродуплексов продуктов ПЦР мтДНК Surveyor нуклеазой. Результаты показывают, что репарация яДНК в трех областях мозга крыс протекает медленно в течение 24 часов после облучения. Гораздо медленнее происходит репарация яДНК в гиппокампе. Восстановление мтДНК в трех участках мозга крыс после их облучения происходит более активно, по сравнению с яДНК. Наблюдаемое резкое восстановление мтДНК, возможно, обусловлено пострадиационной активацией биогенеза митохондрий с синтезом мтДНК в тканях мозга облученных крыс. Предполагаемая пострадиационная активация биогенеза митохондрий согласуется с результатами анализов, полученных методом ПЦР в реальном времени, которые показывают, что количества копий мтДНК увеличиваются относительно яДНК в трех регионах мозга в течение 24-х часов после облучения. При инициации репликативного синтеза с вовлечением поврежденных мтДНК, посредством ДНК-полимеразы γ , можно было ожидать появление новых копий мтДНК с мутациями и делециями в клетках головного мозга крыс после их облучения. Для оценки мутантных копий мтДНК после облучения крыс в дозе 3 Гр дополнительно использовались временные

точки — через две недели, один и два месяца. От исследований после облучения в дозе 5 Гр в эти же сроки воздержались, так как возможна гибель животных. Результаты этих анализов показывают, что во всех трех участках головного мозга облученных крыс возникает резкое увеличение количества мутантных копий мтДНК. Так, к 24 часам после облучения в дозе 5 Гр количество мутантных копий мтДНК в участках мозга достигает около 25—35% от общего количества копий мтДНК в этих тканях. При облучении крыс в дозе 3 Гр максимальный уровень мутантных копий мтДНК регистрируется через две недели и составляет около 20—30%, в последующие сроки после облучения количество мутантных копий существенно снижается. В регионе гиппокампа наблюдается самый большой уровень мтДНК с мутациями.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что активность репарации яДНК, синтез мтДНК и уровень ее мутантных копий, различаются в гиппокампе, коре и мозжечке головного мозга облученных протонами крыс в различных дозах и в разное время после их облучения. Эти изменения могут привести к митохондриальной дисфункции с повышением окислительного стресса в регионах головного мозга и могут быть сопряжены с развитием отдаленных последствий воздействия ИИ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-29-01007 офи_м.

РАЗРАБОТКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ КЕТОГЛУТАРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЦИТОБИОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ И ЕЕ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИЕЙ В ОРГАНИЗМЕ

Акуленко М.В., Кондрашова М.Н.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
e-mail: mkondrashova23@inbox.ru

Продолжающейся темой исследований группы, руководимой М.Н. Кондрашовой, является развитие открытия системы физиологической регуляции, состоящей во взаимодействии двух половин единой гормональной системы — симпатической и парасимпатической

через два гормона — адреналин (АДР) и ацетилхолин (АЦХ) с митохондриальными процессами через два субстрата окисления — янтарную (ЯНТ) и альфа-кетоглутаровую (КГЛ) кислоты. Эта система была названа автором субстратно-гормональной (С-Г). Данные по взаимодействию симпатической половины через АДР с окислением ЯНТ сукцинадегидрогеназой (СДГ) были достаточно выражены в чисто биохимических исследованиях. Однако, мы стремились получить бо́льшую амплитуду изменений, сопоставимую с ответами физиологических функций на АДР в организме. разработав улучшенный вариант цитохимического метода — ЦитоБио-Химический (ЦБХ). Этот метод более чувствительно выявляет изменения активности ферментов в организме. Исследования проводят в неповрежденных лимфоцитах крови на мазке.

Использование более чувствительного метода было особенно необходимо для получения четких изменений во взаимодействии АЦХ и окисления КГЛ кетоглутаратдегидрогеназой (КДГ). По непонятным причинам она не выявлялась в цитохимических исследованиях, хотя ее активность в биохимических исследованиях сопоставима с активностью других дегидрогеназ. Мы предположили, что причиной является достоинство биохимического метода — сохранение структуры митохондрий в клетках. Особенно хорошо она сохраняется в условиях улучшенного, ЦБХ, метода. В биохимических же исследованиях митохондрии набухают и, становятся более проницаемыми. Поэтому активность КДГ искусственно по отношению к ткани увеличивается, и определяется. Также следует учесть, что КДГ находится в самом центре метаболического мультиферментного комплекса — метаболона, куда субстрату нужно добираться через заряженные макромолекулы. Возможно, АЦХ и в этом случае работает как в синапсах, облегчая передачу. Поэтому, и на основании своих предшествующих данных об активирующем действии АЦХ на активность КДГ, мы ввели добавление АЦХ в ЦБХ определение активности КДГ. Добавление АЦХ сочетали с добавкой ионов Ca^{2+} , необходимого для активации КДГ. Оказалось, что такое экзотическое сочетание АЦХ и условий определения активности КДГ действительно пробуждает фермент.

Активность все равно очень низка. Выявляемая активность КДГ на порядок ниже активности СДГ. Однако, в этом диапазоне возможно уверенно работать ЦБХ методом.

Этот способ определения используется нами в исследованиях при разных состояниях человека и кроликов — животных с ХЭ регуляцией более близкой к человеку, чем у крыс и мышей. Цель этих исследований — выявление связи между активностью КДГ и регуляцией АЦХ. Данный показатель очень важен, так как АЦХ, особенно обнаруженный в 2000 г. группой Кавашима в Японии, содержащийся в лимфоцитах крови обладает многими регуляторными свойствами. Среди них очень важное действие, открытое ранее И.А. Аршавским в России — обеспечение восстановительных процессов, которое ответственно за отдых и устойчивость организма. Данное действие выпадает из круга зарубежных исследований и является предметом наших работ.

Определение активности КДГ является очень удобным показателем уровня регуляции АЦХ в организме.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА ТИТИНА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ АМИЛОИДНЫХ АГРЕГАТОВ *IN VITRO*

Бобылёв А.Г.¹, Якупова Э.И.¹, Бобылёва Л.Г.¹, Вихлянцев И.М.^{1,2}

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

² Пущинский государственный естественно-научный институт, Россия

e-mail: bobylev1982@gmail.com

Гигантский мышечный белок титин (тайтин, коннектин, м.м. 500—3700 кДа) является самым большим из известных на сегодняшний день белков. В поперечно-полосатых мышцах он формирует третью филаментную систему наряду с актиновыми и миозиновыми нитями. Локализация данного белка в гладких мышцах пока остается неизвестной. Наши исследования, опубликованные в 2016 г., показали, что титин гладких мышц (изоформа с м.м. 500 кДа) способен формировать амилоидные агрегаты *in vitro*, которые оказывали токсическое действие на культуру гладкомышечных клеток [Bobylev A.G. *et al.*, Biosci Rep., 2016]. Также было показано, что гладкомышечный титин способен формировать *in vitro* амилоидные агрегаты различного типа. Они имели кросс-бета структуру, но отличались по способности связываться с красителями Конго красным и тиофлавином Т [Yakupova E.I. *et al.*, J. Biomol. Struct. Dyn., 2018]. В данной работе мы провели

исследование структурных характеристик различных типов амилоидных агрегатов титина *in vitro*. Ранее проведенные исследования показали, что при агрегации изоформы гладкомышечного титина (м.м. 500 кДа) отсутствует лаг-период, который наблюдается при агрегации всех ранее изученных амилоидных белков. Полученные результаты указывают на то, что при агрегации титина не происходит образования промежуточных форм — олигомеров, либо они присутствуют уже в молекулярной форме белка. При исследовании агрегатов титина методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье было обнаружено, что в процессе формирования амилоидных агрегатов двух типов изменений во вторичной структуре белка не происходит. Результаты изучения структуры агрегатов титина методом малоуглового рентгеновского рассеяния не выявили значительных конформационных отличий двух типов амилоидных агрегатов вышеуказанной изоформы гладкомышечного титина. Полученные результаты указывают на одинаковые радиусы инерции, полученные для молекулярного титина и его агрегатов, сформированных в условиях 200 mM KCl, 10 mM имидазола, pH 7,5: 18,4 нм и 19,5 нм, соответственно. В то же время средний радиус R_g агрегатов титина, сформированных в условиях 0,15 M Глицин-КОН, pH 7,0, был равен 14,0 нм, что не существенно отличалось от предыдущих образцов.

Таким образом, на основании результатов, полученных с использованием инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье и малоуглового рентгеновского рассеяния, можно заключить, что при формировании агрегатов в условиях 200 mM KCl, 10 mM имидазола, pH 7,5 не происходит изменений в структуре титина (м.м. 500 кДа). Учитывая то, что речь идет об обратимой амилоидной агрегации с наличием у агрегатов доказанной кросс-бета структуры [Yakupova E.I. et al., J. Biomol. Struct. Dyn., 2018], мы предполагаем, что механизм агрегации титина может быть заложен в самой молекуле белка для выполнения определенных функций. Эти функции могут быть обусловлены в способности осуществлять структурные переходы с наименьшими затратами энергии, которые заложены на уровне первичной структуры. Это предположение подтверждается данными о высокой скорости агрегации и реагрегации титина, описанными в работе, и данными, полученными в первый год выполнения проекта.

Работа выполнялась при финансовой поддержке осуществляемой в рамках проекта РФФИ № 18-04-00125.

1. *Bobylev A.G., Galzitskaya O.V., Fadeev R.S., Bobyleva L.G., Yurshenas D.A., Molochkov N.V., Dovidchenko N.V., Selivanova O.M., Penkov N.V., Podlubnaya Z.A., Vikhlyantsev I.M.* Smooth muscle titin forms *in vitro* amyloid aggregates // *Biosci Rep.*, 2016, 36(3), pii: e00334. doi: 10.1042/BSR20160066. Print 2016 Jul.
2. *Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., Bobyleva L.G., Penkov N.V., Timchenko A.A., Timchenko M.A., Enin G.A., Khutzian S.S., Selivanova O.M., Bobylev A.G.* Different amyloid aggregation of smooth muscle titin *in vitro* // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2018, 36, № 2237—2248.

ПОСТРОЕНИЕ 3-D МОДЕЛЕЙ КЛЕТОК МЕТОДАМИ ТРЕХМЕРНОЙ ГРАФИКИ

Буданцев А.Ю., Демьянов А.Ю., Погорелова М.А.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;
Лаборатория аналитической микроскопии биоструктур
e-mail: budantsev@mail.ru

Волоски тычиночных нитей (ВТН) представляют цепочки клеток, в основном продуцируемых до полного развития волоска линейно расположенными терминальными клетками, которые являются меристемными [4]. Крупные размеры и линейное расположение клеток в ВТН позволяют проводить на них тонкие исследования молекулярных механизмов внутриклеточной регуляции с использованием методов микроинъекции и биохимии [3, 5 и др.]. Клетки ВТН чувствительны к действию мутагенов разной природы и используются как тест для радиобиологических и экологических исследований [1, 2 и многие др.].

Для изучения объемных морфометрических характеристик клеток ВТН (площадь поверхности и объем клеток) предложен метод построения объемных моделей клеток с использованием программы 3D Studio Max 2009. После выделения ВТН из *Tradescantia pallida* клетки фотографировались (микроскоп Олимпус 71, цифровой фотоаппарат Олимпус-330). Во всех изученных клетках в момент фотографирования наблюдалось активное струйное движение цитоплазмы. Для измерения линейных размеров клеток применялась Программа AnalySIS-Olympus5. Измерение объема и площади поверхности клеток проводилось на объемных моделях клеток, построенных с использованием программы 3D-studio MAX 2009, параллельно с 3-D реконструкцией клеток (конфокальный микроскоп Leica TCS SPE).

Результаты сравнения объемов клеток ВТН полученные на конфокальном микроскопе и рассчитанные на 3-D моделях, показало, что оба использованных метода дают сравнимые результаты определения объема клеток и площади их поверхности в пределах $\pm 4\%$ ($n = 18$).

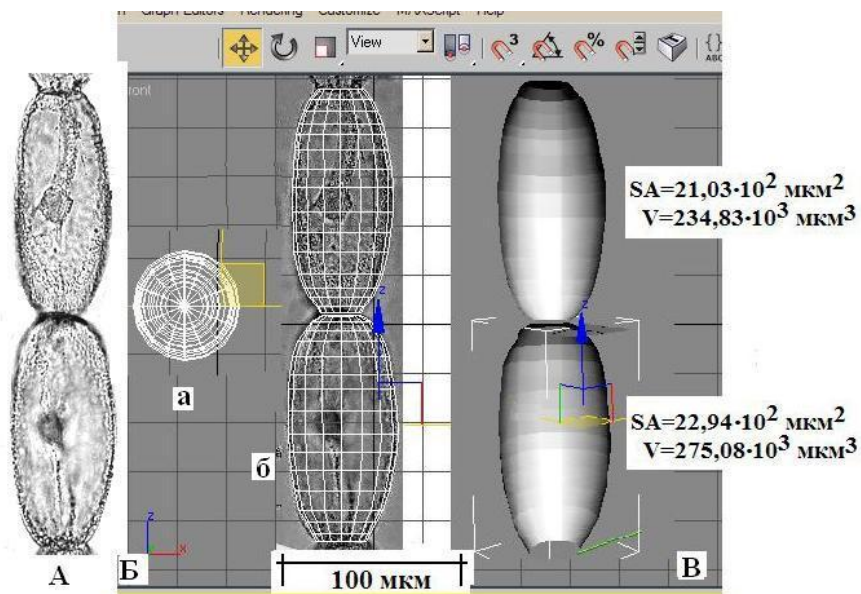


Рис. 3-D модели клеток: А — микрофотография двух клеток ВТН; Б — сетчатая модель клеток, а — вид модели сверху, б — вид спереди; В — гладкие модели клеток; Об. 40х; SA — площадь поверхности; V — объем клеток.

На рисунке показан пример построения 3-D моделей двух клеток (3D-studio MAX 2009, модификатор Lathe).

Работа поддержана Грантом РФФ № 17-76-20014.

1. *Евсеева Т.И., Гераськин С.А.* Сочетанное действие факторов радиационной и нерадиационной природы на традесканцию. Екатеринбург УрО РАН, 2001, 156 стр.
2. *Cesniene T. et al.* // *Mutat.Res. Gen.Tox.En.*, 2017, 823, 65—72.
3. *De Pass A.L. et al.* // *Planta*, 2001, 213, 518—524.
4. *Ichikawa S. et al.* // *Radiation Botany*, 1969, 9, 195—211.
5. *Molchan T.M. et al.* // *Planta*, 2002, 214, 683—693.

О ВОЗМОЖНОМ УЧАСТИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ NO-ЗАВИСИМОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ ДЫХАНИЯ И ЦИКЛОСПОРИН-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ПОРЫ МИТОХОНДРИЙ

Дынный В.В., Гришина Е.В., Федотчева Н.И.

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

Многочисленными исследованиями показано, что цитозольные вторичные мессенджеры оксида азота (NO), cGMP и протеинкиназа G (PKG1) играют важную роль в регуляции гибели клеток по типу некроза или апоптоза, участвуя в регуляции индукции митохондриальной поры (MPTP), вызываемой окислительным стрессом, избытком ионов кальция (Ca^{++}), длинноцепочечными жирными кислотами и др. В сравнении с цитоплазматической сигнальной системой, включающей NO/cGMP/PKG, участие митохондриальной кальций-зависимой NO-синтазы (mtNOS) в контроле MPTP изучено гораздо меньше. Более того, возможное функционирование в митохондриях сигнальной системы mtNOS/гуанилатциклаза (GC)/PKG (mtNOS/GC/PKG) и ее влияние на дыхание и MPTP почти не исследовано. Для решения этой задачи нами были проведены эксперименты на изолированных митохондриях печени крысы с применением специфических ингибиторов NOS, GC и PKG. Митохондриальное дыхание поддерживалось пируватом и глутаматом или сукцинатом плюс ротенон в присутствии гексокиназы и АДФ. Полученные результаты показывают, что L-аргинин и NO-доноры (SNP, SNAP) оказывают двунаправленное, зависимое от концентрации влияние на дыхание митохондрий и на открытие MPTP, индуцируемое ионами кальция или избытком пальмитоилкарнитина. В низких концентрациях L-аргинин (от 10 до 200 мкМ) и NO-доноры (от 10 до 50 мкМ) активируют дыхание и повышают пороговые концентрации кальция и пальмитоилкарнитина, необходимые для диссипации митохондриального мембранного потенциала и открытия поры. Ингибиторы NOS, GC и PKG устраняют оба эффекта, что свидетельствует об участии mtNOS/GC/PKG в активации дыхания и замедлении открытия MPTP. В высоких концентрациях L-аргинин и NO-доноры, напротив, ингибируют дыхание и способствуют открытию MPTP. Наблюдаемое изменение в направлении действия L-аргинина и NO-доноров

позволяет предположить, что ингибирование, вызванное избытком митохондриального NO, может доминировать над защитой, обеспечиваемой mtNOS/GC/PKG. Предварительные результаты опубликованы ранее [1]. Полученные результаты показывают, что функционирование кальций-зависимой mtNOS/GC/PKG, участвующей в комплексном взаимодействии Ca⁺⁺ и NO в митохондриях, может обеспечить прямую активацию митохондриального дыхания и снижение чувствительности МРТР к избытку кальция и пальмитоилкарнитина.

Grishina E.V. et al. Induction of cyclosporine-sensitive mitochondrial permeability transition pore by substrates forming acetyl-CoA under normal conditions and in type 2 diabetes. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2016, 10(1), 11—18. DOI: 101134/S1990747815050049

ДЕЙСТВИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА МЫШЕЙ *IN VIVO*

Дюкина А.Р.^{1}, Заичкина С.И.¹, Розанова О.М.¹, Сорокина С.С.¹, Смирнова Е.Н.¹, Поцелуева М.М.¹, Наумов А.А.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

Одним из ведущих направлений биомедицинских исследований является использование в диагностике и лечении новых лазерных технологий. В настоящее время фемтосекундные (ФС) лазеры являются наиболее перспективными в таких областях как физика, биология, медицина и другие прикладные сферы. Характерными чертами ФС лазеров является малая длительность и высокая средняя интенсивность импульса. Имеющиеся в литературе результаты по исследованию биологических реакций и их последствий у животных, облучённых ФС лазерным излучением трудно сопоставимы между собой в связи с использованием разных объектов, мощностей и доз облучения, а также особенностей самих источников излучения. Поэтому понимание закономерностей действия ФС лазера на живые системы и необходимых условий для их медицинской адаптации является крайне важным.

Цель исследования заключается в проверке эффективности использования неионизирующего низкоинтенсивного импульсного ФС лазерного излучения в качестве фактора активации естественной защиты организма с помощью теста «адаптивный ответ» и поиска безопасного диапазона используемых доз. Эксперименты проводили на двухмесячных самцах мышей линии SHK. Животных облучали в область носа ФС лазером (АВЕСТА, РФ) (525 нм, 200 фс, 70 МГц) при мощностях 0,05, 0,5 и 5 мВт, и экспозиции от 1 до 50 с, что соответствует дозам излучения 0,1—52 мДж/см². В качестве положительных контролей животные были облучены непрерывным He-Ne лазерным излучением (632,8 нм, 0,7 мВт, 0,16 мВт/см²) в течение 5 и 100 с (2 и 40 мДж/см²) и рентгеновским излучением в дозе 0,1 Гр (4 мДж/см²). Через сутки все группы животных дополнительно облучали рентгеновским излучением в дозе 1,5 Гр (60 мДж/см²) по отработанной ранее нами схеме (0,1 Гр + 1,5 Гр). На каждую экспериментальную точку использовали не менее пяти мышей. С помощью стандартных методик был проведен гематологический анализ, определен уровень продукции АФК в цельной крови методом люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции (СHEMILUM-12, Россия), индекс массы тимуса и селезенки и уровень цитогенетических повреждений в костном мозге с помощью микроядерного теста.

Обнаружено, что при всех исследованных дозах клеточный состав крови, уровни цитогенетических повреждений в кроветворных органах и продукции АФК в цельной крови не отличаются от спонтанного фона. Предварительная обработка животных ФС лазером в дозах 3 мДж/см² (0,05 мВт), 10,4 и 31 мДж/см² (0,5 мВт) и 10 мДж/см² (5 мВт) и последующим воздействием рентгеновского излучения в дозе 1,5 Гр приводила к индукции адаптивного ответа по микроядерному тесту в клетках костного мозга и уровню продукции АФК в цельной крови, как и в случае положительных контролей. Другие дозы ФС лазера не индуцировали защитный эффект. Предобработка мышей всеми дозами ФС лазера не защищала тимус и селезенку от уменьшения клеточности, в отличие от He-Ne лазерного и рентгеновского излучений в дозах 2 и 4 мДж/см², соответственно. Таким образом, при воздействии на мышей неионизирующими импульсным ФС и непрерывным He-Ne лазерами и ионизирующим рентгеновским излучением наблюдается активация естествен-

ной защиты организма по тесту «адаптивный ответ» в одном и том же диапазоне доз, что позволяет предположить схожий механизм её индукции. Полученные данные могут быть использованы для стандартизации условий применения ФС лазеров в биологии и медицине.

ИЗМЕНЕНИЯ В УРОВНЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК, А ТАКЖЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В МИТОХОНДРИЯХ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС, ОБЛУЧЕННЫХ ПРОТОНАМИ 150 МЭВ

Евдокимовский Э.В., Губина Н.Е., Абдуллаев С.А., Газиев А.И.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
e-mail: onletaet@gmail.com

Достигнутые в последнее время успехи в области радиобиологии показывают, что митохондриальная ДНК (мтДНК) является важной мишенью для ионизирующего облучения. Помимо непосредственного повреждения структуры мтДНК, вызванного действием ионизирующего излучения, в клетках могут происходить изменения и на эпигенетическом уровне, даже спустя значительные сроки с момента воздействия ионизирующего излучения. Такие изменения могут иметь важные последствия для нормального функционирования клеток. Мы исследовали изменение уровня метилирования мтДНК, а также изменения в экспрессии митохондриальных и ядерных генов, контролирующих функции митохондрий в гиппокампе, коре и мозжечке крыс, облученных протонами в дозе 3 и 5 Гр ($E = 150$ МэВ) на установке фазотрон медико-технического комплекса Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ, Дубна. Для исследования были выбраны митохондриальные гены ND2, CytB, ATP6, кодирующие субъединицы I и III комплекса дыхательной цепи митохондрий, а также субъединицу митохондриальной АТФ-синтазы. Также для исследования были выбраны ядерные гены, считающиеся критически важными для полноценного функционирования митохондрий: TFAM (митохондриальный транскрипционный фактор), PGC-1 α (коактиватор биогенеза митохондрий), Fis1 (белок-регулятор слияния митохондрий), Mfn1 (белок-регулятор деления митохондрий). Результаты, полученные нами с помощью метода ПЦР в реальном времени, показали, что во всех трёх исследованных тканях, происходит снижение экспрессии

митохондриальных генов через 6 и 24 часа после облучения протонами, независимо от дозы облучения. При этом снижения количества транскриптов ядерных генов в исследованных тканях не происходит. Это может говорить о нарушении целостности мтДНК, являющейся основной мишенью для воздействия ионизирующего излучения.

Для того, чтобы изучить отдалённые последствия воздействия тяжелых заряженных частиц на функционирование мтДНК, нами исследовался уровень метилирования мтДНК во всех трёх тканях головного мозга крыс после облучения их протонами в дозе 3 Гр, а также рентгеновским облучением в дозе 5 Гр. Нами обнаружено, что в мозжечке не происходит значимых изменений в уровне метилирования мтДНК по сравнению с контролем, как при облучении протонами, так и рентгеновским излучением. В коре головного мозга, а также в гиппокампе, происходит снижение уровня метилирования мтДНК на 30% через четыре и восемь недель после облучения, независимо от типа ионизирующего излучения. Полученные нами результаты могут представлять интерес при изучении отдалённых последствий влияния ионизирующего излучения на эпигенетические факторы регуляции митохондриального генома, в частности, при изучении последствий лучевой терапии при облучении онкобольных.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-29-01007 офи_м.

ОБРАЗОВАНИЕ ДОЛГОЖИВУЩИХ АКТИВНЫХ ФОРМ БЕЛКОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕПЛА В РАСТВОРАХ ЖЕЛАТИНА И КАЗЕИНА

Иванов В.Е.¹, Черников А.В.¹, Гудков С.В.^{2,3,4}, Брусков В.И.¹

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

² Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия;

³ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия;

⁴ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

e-mail: iwe88@rambler.ru

Ранее было установлено, что умеренный нагрев водных растворов в присутствии растворенного кислорода воздуха вызывает образование

активных форм кислорода (АФК) [1]. Белки из-за своей распространенности и высокой реакционной способности к окислению являются основными и наиболее уязвимыми мишенями для взаимодействия с АФК. Ранее установлено, что в растворах бычьего сывороточного альбумина и гамма-глобулина под действием тепла происходит образование долгоживущих активных форм белков (ДАФБ) [2]. В данной работе методом хемилюминесценции показано образование ДАФБ для желатина, казеина и гидролизата казеина с периодом полураспада около 4 ч, вызванных умеренной гипертермией. Установлено, что ДАФБ и гидролизат казеина вызывают длительную генерацию H_2O_2 и рассмотрен механизм этого процесса с участием синглетного кислорода, гидроксильных и гидроперекисных радикалов. Он свидетельствует о новом фундаментальном свойстве всех белков и ряда пептидов. Может сложиться впечатление, что концентрация H_2O_2 , продуцируемая активными формами белков в данных экспериментах *in vitro*, слишком мала, чтобы оказывать заметное биологическое действие. Однако нами регистрируется средняя концентрация пероксида водорода в сильно разбавленных растворах, а его локальная концентрация вблизи поверхности белка может быть существенно выше. Поэтому можно полагать, что тепловые воздействия, используемые в медицинской практике, приводят к образованию ДАФБ различных белков, которые в свою очередь длительно генерируют пероксид водорода. Это может приводить к сигнально-регуляторному лечебному и адаптивному ответу в организме человека. Более того, возможно, что повышение температуры у теплокровных организмов при различных заболеваниях, сопровождающееся образованием ДАФБ и длительной генерацией ими H_2O_2 , является одним из механизмов активации защитных клеточных механизмов, способствующих преодолению болезни. Поскольку в настоящее время установлено, что АФК не только вызывают окислительные повреждения молекул, но и выполняют необходимую для жизнедеятельности роль, связанную с поддержанием окислительно-восстановительного гомеостаза в клетках. Этот сигнально-регуляторный процесс осуществляется путем активации защитных и репарационных систем клеток в результате экспрессии соответствующих генов. Наиболее существенную роль при этом выполняет пероксид водорода как наиболее долгоживущая форма АФК. Детально результаты этой работы изложены в статье [3] 2018 год.

Работа выполнена по Госзаданию ИТЭБ РАН № 007-00-94-18-00, частично поддержана грантами РФФИ 17-44-500476 р-а и Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых МК-4521.2018.8.

1. *Штаркман И.Н., Гудков С.В., Черников А.В., Брусков В.И.* // Биофизика, 2008, 53 (1), 1.
2. *Bruskov V.I., Popova N.R., Ivanov V.E. et al.* // Biochem. Biophys. Res. Commun., 2014, 443, 957.
3. *Иванов В.Е., Черников А.В., Гудков С.В., Брусков В.И.* // Биофизика, 2018, 63 (5), 873.

**ОБРАЗОВАНИЕ ДОЛГОЖИВУЩИХ АКТИВНЫХ ФОРМ
БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ
РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ.
ГЕНЕРАЦИЯ ИМИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА
И ВЛИЯНИЕ НА ЭТОТ ПРОЦЕСС МЕКСИДОЛА**

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

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
e-mail: silisti@bk.ru, bruskov_vi@rambler.ru

Активные формы кислорода (АФК) постоянно образуются в аэробных клетках под действием различных факторов среды и в результате метаболических процессов. Белки из-за их наибольшего содержания и высокой реакционной способности к окислению являются основными и наиболее уязвимыми мишенями для взаимодействия с АФК. В присутствии кислорода окисление белков АФК приводит к образованию долгоживущих активных форм белков (ДАФБ). Однако, белки лишь в начальный период проявляют антиоксидантные свойства как перехватчики АФК, а затем становятся прооксидантами и длительно продуцируют АФК в результате разрушения ДАФБ. Изучение данного процесса — одна из наиболее актуальных проблем в области изучения ОС. В данной работе исследовано образование ДАФБ под влиянием рентгеновского излучения и генерация ими пероксида водорода в растворах основных белков сыворотки крови — альбуминов (БСА) и глобулинов (БГГ)

с концентрациями близкими к физиологическим. Впервые показано, что эти белки приводят как к генерации H_2O_2 , и так и ее разложению. Выявлена модификация этих эффектов в условиях ограниченного доступа воздуха.

Образование ДАФБ и генерации ими пероксида водорода проводили на растворах белков в 0,9% растворе NaCl с 1 мМ фосфатным буфером (рН 7,4) при рентгеновском облучении в дозе 15 Гр в интервале времен от 0 до 6 ч после облучения. Показано, что через 1 ч после облучения в пробах БСА при концентрации 10 мг/мл со свободным доступом воздуха образуется на 65% меньше H_2O_2 , чем без доступа воздуха. Для БГГ в той же молярной концентрации без доступа воздуха регистрируется на 25% меньше H_2O_2 . Таким образом, для данных белков преобладание их антиоксидантных или прооксидантных свойств индивидуально зависит от газообмена с внешней средой. Этот результат может свидетельствовать об образовании гидропероксидов белков, как основной промежуточной формы при образовании ДАФБ.

Изучено влияние на эти процессы эффективного отечественного антиоксиданта и антигипоксанта — мексидола (сукцинат 2-этил-6метил-3-оксипиридина) широко используемого в медицинской практике. В растворе БГГ мексидол в концентрации 1 мМ проявляет высокую антиоксидантную активность, которая весьма значительно зависит от концентрации белка. При концентрации 5 мг/мл БГГ антиоксидантная эффективность мексидола через 1 ч после облучения в 4 раза выше, чем для раствора с 10 мг/мл. Эффективность мексидола в случае БСА существенно варьирует в зависимости от свободного доступа воздуха. За 30 мин после облучения в присутствии мексидола происходит распад около 0,5 мкМ H_2O_2 без доступа воздуха и 0,25 мкМ H_2O_2 с доступом воздуха. Таким образом, установлено, что мексидол защищает белки от образования ДАФБ индуцированного рентгеновским излучением и существенно уменьшает генерацию H_2O_2 . Это позволяет предполагать, что данный лекарственный препарат позволит значительно ослабить окислительный стресс *in vivo* и это задача для наших дальнейших исследований.

Работа выполнялась по госзаданию ИТЭБ РАН тема № 05 направление 59.

ТРИ ЭТАПА В ИССЛЕДОВАНИИ УНИВЕРСАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ УТРАИВАЮЩИХСЯ ПЕРИОДОВ

Коломбет В.А., Лесных В.Н., Коломбет А.Е., Елистратов А.В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
e-mail: v.kolombet@rambler.ru

Универсальная система утраивающихся периодов (УСУП) наблюдается в процессах всевозможной природы. Эмпирическая формула С. Петца $T_{k,m}/T_0 = 3^k/2^m$, описывающая двумерную сеть периодов УСУП, была предложена для процессов геофизических и астрономических масштабов. В 2009 году С. Петцем была опубликована книга-манифест на эту тему, а в 2014 г. С. Петц опубликовал вместе с соавторами из США и Канады основополагающую статью в журнале *Chaos, solitons & fractals (Elsevier, IF = 2,2)*.

1. Мы изучаем УСУП с начала 2015 г. На примерах биофизических и технических систем мы довели отношение $(T_{k,m})_{\max}/(T_{k,m})_{\min}$ до 10^{30} , откуда стало ясно, что физика в столь широком диапазоне явлений может быть общей, пожалуй, только если она основана на свойствах пространства-времени, гравитации и пр. Отсюда смелая идея расширения диапазона УСУП еще в 10^{30} раз, т.е. до окрестности планковского времени 10^{-43} с.

2. Мы предложили модель УСУП: ультрамикроскопический дискретный автомат-трипликатор утраивает периоды у стыка еще неоднородного планковского пространства-времени (где есть черные дыры, кротовые норы и пр.) и уже гладкого в более крупном масштабе классического пространства-времени. В основу модели трипликатора положен итерационный алгоритм роста мега-треугольника Серпинского, где длина образующей линии растет как 3^k . Доступная нашему анализу часть работы трипликатора — это УСУП. Сомножитель 3^k , обеспечивающий утроение периода, отвечает правильной работе трипликатора, а частное 2^m есть проявление $|m|$ шт. редких сбоев, мутаций, возможных в каждом из двух тактов предложенного алгоритма двухтактной работы трипликатора. Трипликатор гомологичен создающему нашу биосферу дубликатору — автомату, работающему у стыка масштабов атомно-молекулярной, т.е. еще дискретной структуры вещества и структуры вещества в возросших масштабах уже фактически сплошной.

3. Принципиальное сходство периодов УСУП позволяет, изучая свойства любого диапазона этих периодов, строить предположения о свойствах

процессов в других, в том числе в удаленных диапазонах. Границами диапазона периодов сейчас взяты значения 0,03 с и 30 с. В эксперименте используются генераторы электрических колебаний, звуковая карта компьютера и внешний микроконтроллер. Эксперимент заключается в медленном (иногда околосемянном) дискретном линейном сканировании генератором окрестностей вычисленной частоты УСУП. На каждой промежуточной частоте изучается до 0,1 млн одинаковых периодических колебаний, а затем производится очередной небольшой скачкообразный прирост частоты, и все повторяется сначала. Усредненные за полминуты периоды записываются ежечасно на диск компьютера в файлы, подлежащие дальнейшей обработке. Первые итоги сканирования окрестностей T_{km} оказались весьма перспективными, поэтому сейчас продолжается накопление результатов и поиск аномалий, общих для выбранного диапазона периодов.

1. Коломбет В.А., Лесных В.Н., Бондарь А.Т. Треугольник Серпинского как удобная математическая модель для описания УСУП // Известия ИИФ, 2018, № 47, 63—68.
2. Коломбет В.А., Архипов В.Ю., Елистратов А.В., Лесных В.Н., Коломбет Е.В., Серая О.Ю. Стохастика и мутации в УСУП // Известия ИИФ, 2018, № 48, 56—62.
3. Коломбет В.А., Лесных В.Н., Коломбет Е.В. УСУП и музыкальный строй // Известия ИИФ, 2018, № 49, 88—90.
4. Коломбет В.А., Лесных В.Н., Коломбет Е.В. Новые перспективы приложений УСУП // Известия ИИФ, 2018, № 50, 62—66.
5. Коломбет В.А., Лесных В.Н., Елистратов А.В., Станкевич А.А. УСУП — салют с уровня квантовой гравитации? Система «Планета Земля» — М.: URSS, 2019, 100—115.

ГИПЕРАКТИВАЦИЯ ДЫХАНИЯ — ПРИЧИНА ПОДАВЛЕНИЯ ГЛИКОЛИЗА В ЛИМФОЦИТАХ ПРИ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА, ВОССТАНОВЛЕНИЕ ГЛИКОЛИЗА ОДНОВРЕМЕННО С НОРМАЛИЗАЦИЕЙ САХАРА КРОВИ ВАКЦИНАЦИЕЙ БЦЖ

Кондрашова М.Н., Шварцбургд П.М.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
e-mail: mkondrashova23@inbox.ru

Явление, которое обнаружено в цитобиохимической группе лаборатории Энергетики биосистем (тезисы Хундерякова и соавторы), а именно, гиперактивация сукцинатдегидрогеназы, СДГ — показателя

дыхания митохондрий, как причина снижения активности лактатдегидрогеназы, ЛДГ — показателя гликолиза, обнаруженное в лимфоцитах, ЛФ, у детей, больных миопатией, или у людей пожилого возраста, в точности совпадает с выводами работ зарубежных групп при других патологиях [1—4], в частности, аутоиммунном диабете первого типа, Д1Т. Они даже используют то же нетрадиционное выражение, что и мы — гиперактивность. Они также считают, на основании других соображений, что гиперактивация дыхания является причиной снижения гликолиза из-за недостатка глюкозы. Самое интересное состоит в том, что оказывается возможным без применения инсулина повысить поступление глюкозы благодаря переключению обмена ЛФ на снижение дыхания. Это приводит к усилению гликолиза, повышению поступления пирувата в цикл Кребса и нормализации восстановительных процессов, которые поддерживаются гликолизом. Переключение путей метаболизма вызывается разрабатываемым на протяжении полувека способом — вакцинацией БЦЖ! Эффект вакцинации развивается и сохраняется длительное время — годы. Защитное действие вакцинации БЦЖ выявлено и при других аутоиммунных заболеваниях — хронических нервных заболеваниях и при аллергии, включая пищевую.

Исследования биохимических процессов проведены с применением ядерного магнитного резонанса, неудобного для массового использования. Ставится вопрос о необходимости создания быстрого неинвазивного теста на крови. Созданный в нашей группе метод идеально соответствует такой задаче, так как он не травмирует человека и тканевой препарат и проводится на ЛФ, в которых происходят метаболические перестройки.

Способ изменения метаболизма и иммунных реакций вакцинацией БЦЖ называется «Тренировка иммунитета». Ристори и др. [1] предполагает, что «дружественный контакт с микробами, особенно „старыми друзьями“, которые коэволюционировали с человеком миллионы лет, может помочь противостоять условиям, вызывающим хроническое воспаление и повреждение тканей».

1. *Ristori G. et al.* Bridging the gap between vaccination with Bacille Calmette-Guerin (BCG) and immunological tolerance: the cases of type 1 diabetes and multiple sclerosis // *Current Opinion in Immunology*, 2018, 55, 89—96.
2. *Stienstra R. and Netea M.G.* Firing Up Glycolysis: BCG Vaccination. Effects on Type 1 Diabetes Mellitus // *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2018, 29 (12), 813—814.

3. *Kühtreiber W.M. and Faustman D.L.* BCG Therapy for Type 1 Diabetes: Restoration of Balanced Immunity and Metabolism // *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2019, 30(2), 80—92.
4. *Kiraly N. et al.* BCG for the prevention of food allergy — exploring a new use for an old vaccine // *Med J Aust.*, 2015, 202(11), 565—6.

**ФЛАВОНОИДЫ ПОДАВЛЯЮТ УВЕЛИЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ
АНГИОТЕНЗИН ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА
В АОРТЕ КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ
ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ.**

*Корыстова А.Ф.¹, Кублик Л.Н.¹, Левитман М.Х.¹, Самохвалова Т.В.²,
Шапошникова В.В.², Ким Ю.А.¹, Корыстов Ю.Н.²*

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

² Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

e-mail: ykorystov@rambler.ru

Целью работы являлось исследование изменения активности ангиотензин превращающего фермента (АПФ) в аорте крыс в ранние сроки после облучения крыс в дозах, используемых в одной фракции при радиотерапии опухолей. Крыс самцов Вистар облучали полностью или локально (только грудную клетку) рентгеновскими лучами 200 кВ дозами от 1 до 7,5 Гр. Активность АПФ в сегментах аорты определяли через 1—48 ч после облучения по гидролизу гиппурил-гистидин-лейцина. Показано, что после общего облучения крыс дозой 2,5 Гр активность АПФ в аорте увеличена через 1—24 ч с максимумом через 2 ч после облучения. После локального облучения активность АПФ также увеличена через 2 ч, но к 24 ч снижалась до контрольного уровня. При дозах больше 2,5 Гр через 2 ч после общего облучения активность АПФ уменьшалась и при дозе 7,5 Гр достигала контрольного уровня. После локального облучения снижения эффекта с увеличением дозы не происходило. Показано, что процент прикрепленных моноцитов из крови тотально облученных крыс к пластику уменьшается с дозой облучения, а прикрепление моноцитов, выделенных из крови локально облученных крыс дозой 7,5 Гр такое же как в контроле. Фукоидин, блокатор рецепторов эндотелия осуществляющих адгезию к эндотелию лейкоцитов и флавоноид дигидрокверцетин (ДГК), ингибитор экспрессии молекул адгезии на эндотелии отменяли увеличение активности АПФ в аорте крыс после облучения. Эти результаты,

совместно с литературными данными свидетельствуют о том, что увеличение активности АПФ в аорте после облучения обусловлено прикреплением моноцитов к эндотелию, а снижение эффекта с увеличением дозы объясняется повреждением моноцитов облучением.

Была изучена также сравнительная активность семи флавоноидов по предотвращению увеличения активности АПФ в аорте после облучения крыс ионизирующей радиацией. Показано, что активность флавонов (флаван, 6-гидроксифлаван, байкалеин) снижается с увеличением ОН групп в кольце *A*, а активность флавонолов (кемпферол, кверцетин, мирицетин) с увеличением количества ОН групп в кольце *B*. Уменьшение активности флавоноидов внутри классов коррелирует со снижением их липофильности при увеличении количества ОН групп в молекулах. Сравнение активности и липофильности флавоноидов разных классов свидетельствует о том, что класс флавононолов (ДГК) активнее флавонолов, а последний активнее флавонов.

1. *Korystova A.F., Kublik L.N., Levitman M.Kh., Samokhvalova T.V., Shaposhnikova V.V., Korystov Yu.N.* // Bull. Exp. Biol. Med., 2018, 165, № 2, 216—219.
2. *Korystova A.F., Kublik L.N., Kim Yu.A., Levitman M.Kh., Shaposhnikova V.V., Korystov Yu.N.* // Bull. Exp. Biol. Med., 2018, 165, № 3, 360—363.
3. *Kim Y.A., Korystova A.F., Kublik L.N., Levitman M.Kh., Shaposhnikova V.V., Korystov Y.N.* // Eur. J. Pharmacol., 2018, 837, 33—37.

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ СПОСОБОВ КОМПЕНСАЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ ЛЕТАЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

*Куликов А.В.¹, Архипова А.Ю.², Филюшкин Ю.Н.³, Архипова Л.В.¹,
Мндлян Е.Ю.¹, Гаврилюк В.Б.¹, Мойсенович М.М.², Куликов Д.А.³*

- ¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;
 - ² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;
 - ³ Московский областной научно-исследовательский институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия
- e-mail: kulikov@iteb.ru*

Смертность от последствий повреждения желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) очень высока. Одной из основных проблем является нехватка

донорских тканей и органов, что активно стимулирует развитие тканевой инженерии, предлагающей альтернативные источники материалов для регенеративной медицины. Одной из важнейших задач тканевой инженерии является разработка матриксов (скаффолдов), которые могут служить основой для пролиферации и дифференцировки клеток, обеспечивающих регенерацию утраченного или поврежденного органа/ткани [1]. В процессе регенерации происходит формирование матрикса на поверхности скаффолда, в то время как сам скаффолд, используемый в качестве временного матрикса, впоследствии деградирует и резорбируется [2, 3].

В своей работе для компенсации последствий повреждения ЖКХ мы использовали скаффолды из фиброина шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori*, заполненные клетками костного мозга с высоким пролиферативным потенциалом. Повреждение на тощую кишку наносили двух типов — овальное отверстие 5×7 мм и, более сложный вариант, полное пересечение кишки. В первом случае на месте повреждения фиксировали заплатку, во втором — трубочку из фиброина шелка, пропитанную клетками костного мозга.

По результатам экспериментов удалось разработать два способа компенсации последствий повреждения ЖКТ. Скаффолды способствовали прорастанию сквозь них собственной ткани реципиента с восстановлением всех его слоев и полной проходимости кишечника. Сами скаффолды полностью рассасывались на третьей-четвертой неделе после операции. Ушивание места повреждения у контрольной группы крыс приводило к перитониту и гибели животных в течение одной недели.

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

1. *Ma P.X.* Scaffolds for tissue fabrication // *Mater. Today*, 2004, 7, № 5. 30—40.
2. *Ma P.X.* Biomimetic materials for tissue engineering // *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, 60, № 2, 184—198.
3. *Гончаренко А.В., Котлярова М.С., Мойсенович А.М., Архипова А.Ю., Куликов Д.А., Коньков А.С., Куликов А.В., Машков А.Е., Агапов И.И. Мойсенович М.М., Кирпичников М.П.* Остеогенная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток на фиброиновых микроносителях // Доклады академии наук, 2017, 477, № 1, 97—100.

**ВЛИЯНИЕ HIS-TAG И СПОСОБА ОЧИСТКИ
НА АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРУ МЕТАЛЛОФЕРМЕНТА —
L-АЛАНОИЛ-D-ГЛУТАМАТПЕПТИДАЗЫ БАКТЕРИОФАГА T5**

Кутышено В.П., Микулинская Г.В.², Прохоров Д.А.¹, Паскевич С.И.¹.

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

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

e-mail: kutyshenko@rambler.ru

Присоединение His-tag к N- или C-концу рекомбинантного белка в настоящее время является едва ли не самой распространенной генноинженерной модификацией и взято за правило большинством ученых, работающих с рекомбинантными белками. Это объяснимо: наличие His-tag позволяет существенно упростить выделение и очистку целевого белка, сведя ее к одной стадии — хроматографии на металлосорбенте. В ряде случаев это является единственным действенным и простым способом выделить белок [1, 2]. Влияние 6His доведка на структуру и функцию конкретного белка исследователи проверяют не так часто, как хотелось бы. В то же время многие коллеги, а особенно важно, что и рецензенты публикаций в рейтинговых журналах различного профиля, задаются подобными вопросами. Отдельного исследования в случае металлопротеинов заслуживает способ очистки на никелевых сорбентах, ибо следовые концентрации никеля вполне способны вызвать изменение свойств таких белков в результате, например, конкурентного ингибирования. Наличие His-tag у рекомбинантных белков часто по умолчанию воспринимается как не влияющее на структуру и функцию белка. Однако в тех случаях, когда проводится сравнительный анализ His-tagged и untagged препаратов, часто оказывается, что влияние есть. Иногда изменения касаются структуры, иногда — функции белка, и они могут быть разнонаправленными.

В данной работе изучено влияние C-концевого His-tag, а также способа очистки белка при помощи металлохелатной хроматографии (ИМАС) на активность и структуру металлофермента — L-аланоил-D-глутаматпептидазы бактериофага T5 (EndoT5), чей сайт связывания цинка, а также каталитический аспартат расположены вблизи C-конца. Было показано, что сам по себе His-tag не оказывает существенного влияния ни

на активность, ни на сворачивание полипептидной цепи, ни на связывание ионов цинка и кальция; при хранении препарат His-tagged EndoT5 имеет повышенную склонность к самоассоциации и падению ферментативной активности. Однако катастрофическое влияние на активность фермента оказывает присутствие имидазола и ионов никеля, сопутствующих металлохелатной хроматографии. Активность препарата может быть увеличена в результате тщательного отмывания примесей путем продолжительного диализа в специально подобранных условиях [3].

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-04-00492.

1. *Kutyshenko V., Prokhorov D., Molochkov N., Sharapov M., Kolesnikov I., Uversky V.* Solution Structure and Micelle Interactions of the Retro-SH3-Domain, Retro-SHH-'Bergerac' // *J. Biomol. Struct. Dynamics*, 2014, 32, 257—272.
2. *Kutyshenko V.P., Mikoulinskaia G.V., Molochkov N.V., Prokhorov D.A., Taran S.A., Uversky V.N.* Structure and dynamics of the retro-form of the bacteriophage T5 endolysin // *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016, 1864, 1281—1291.
3. *Kutyshenko V.P., Mikoulinskaia G.V., Chernyshov S.V., Yegorov A.Y., Prokhorov D.A., Uversky V.N.* Effect of C-terminal His-tag and purification routine on the activity and structure of the metalloenzyme, L-alanyl-D-glutamate peptidase of the bacteriophage T5 // *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 124, 810—818.

ПОСТРАДИАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЯДЕРНОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В МОЧЕ КРЫС, ОБЛУЧЕННЫХ В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ ДОЗ, ИЛИ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ БЛЕОМИЦИНА

Минкабирова Г.М., Абдуллаев С.А.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

e-mail: saabdullaev@gmail.com

Клеточная гибель в тканях человека и животных представляет собой активный процесс, поддерживающий обновление клеточных популяций, функциональную целостность и гомеостаз тканей. С активностью клеточной гибели сопряжены уровни содержания фрагментов внеклеточной ДНК (вк-ДНК) в биологических жидкостях млекопитающих. Ранее в нашей Лаборатории было показано значительное повышение

содержания вк-ядерной ДНК (вк-яДНК) и митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) в плазме/сыворотке мышей, подвергнутых воздействию ионизирующей радиации. В настоящее время качественные и количественные изменения вк-ДНК в кровотоке человека рассматриваются как биомаркер для быстрой оценки лучевой реакции и как диагностическая и прогностическая «жидкая биопсия» в процессе радио-, химиотерапии опухолей. Учитывая интерес к данной проблеме, мы исследовали возможность повышения экскреций вк-яДНК и вк-мтДНК с мочой облученных крыс, а также после введения цитостатического препарата — блеомицина. Анализ трансрентальной вк-ДНК был интересен не только для тестирования ее содержания неинвазивным методом, но и для выяснения возможностей вк-ДНК преодолевать почечный барьер у облученных животных. В экспериментах были использованы 3-х месячные самцы крыс линии Wistar. Облучение крыс проводили на оборудовании ЦКП «Источники излучений» ИБК РАН — рентгеновской установке «РУТ-250-15-1» в дозах 3, 5 и 8 Гр. Блеомицин вводили внутривентриально в концентрациях 3, 7, и 10 мг/кг. Методом ПЦР-РВ было исследовано количественное содержание вк-яДНК и вк-мтДНК в образцах мочи, изучена динамика изменения общего количества копий мтДНК относительно яДНК в зависимости от дозы в разные сроки (от 6 часов до 30 дней) после облучения. Результаты анализов показали, что уровень общего количества мтДНК и яДНК в моче облученных крыс зависит как от пострadiационного времени, так и от дозы облучения. Показано, что содержание вк-яДНК и вк-мтДНК имеет линейную зависимость от дозы рентгеновского излучения. Так, самые большие количества копий мтДНК и яДНК регистрировались в период от 6 до 24-х часов после облучения. Количество продуктов ПЦР-амплификации вк-мтДНК в 2—3 раза выше, по сравнению с таковым вк-яДНК. Данные анализов содержания вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс после введения блеомицина также показали их повышенные уровни по сравнению с контрольными животными. Показано, что содержание вк-яДНК и вк-мтДНК линейно зависит от дозы препарата.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали возможность преодоления у животных вк-мтДНК и вк-яДНК трансрентального (почечного) барьера и их перехода в мочу после рентгеновского облучения, а также после введения блеомицина. Показано, что содержание вк-яДНК и вк-мтДНК линейно зависит как от дозы

облучения, так и от дозы блеомицина. Таким образом, повышенное содержание циркулирующей внеклеточной ДНК в моче можно рассматривать как потенциальный биомаркер для оценки уровня генотоксического груза при радиационном поражении организма, а также при воздействии других генотоксических агентов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 16-34-00832.

НОВЫЙ ПОДХОД К ПРЕДУПРЕЖДЕНИЮ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ОРГАНИЗМЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

*Миронова Г.Д.¹, Белослудцева Н.В.¹, Мосенцов А.А.¹, Розова Е.В.²,
Маньковская И.Н.²*

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

² Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина

e-mail: mironova40@mail.ru

Основным патогенным звеном при окислительном стрессе является, как известно, повреждение митохондрий, приводящее к изменениям в энергообеспечении ткани часто из-за нарушения стабильности мембран митохондрий, образующимися при гипоксии активными формами кислорода (АФК). Установлено, что до 85% перекисных соединений образуются в митохондриях, и их образование связано с состоянием дыхательных переносчиков. В настоящей работе, на известной модели Ca^{2+} -стимулируемых колебаний ионных потоков и других параметров митохондрий, нам удалось в динамике показать наличие реципрокной связи между скоростью дыхания и скоростью образования H_2O_2 в митохондриях. Это подтверждает предположение, что любая активация дыхания снижает скорость образования АФК, что снижает вероятность развития окислительного стресса. В последнее время развивается представление о том, что такая активация может запускаться активаторами митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала (мито K_{ATP}). В нашей лаборатории было воспроизведено шесть экспериментальных моделей различных заболеваний, связанных с развитием окислительного стресса, а именно: острый инфаркт миокарда у крыс; ишемия-реперфузия миокарда крыс; острый отек легкого при нормобарической гипоксии; воспаление, вызванное бактериальным токсином; острая гипоксия

миокарда при нормобарической гипоксии; плавание животных под нагрузкой. На всех используемых нами моделях было показано, что метаболический активатор мито K_{ATP} — уридиндифосфат (УДФ), концентрация которого увеличивается в тканях при введении проникающего в клетку уридина, предупреждает развитие окислительного стресса и, тем самым, защищают сердце от гипоксического повреждения. В то же время ингибитор канала (5НД) предупреждает защитное действие уридина. В настоящее время нами начата работа по предупреждению развития окислительного стресса при экспериментальной болезни Паркинсона (ЭП), развиваемой при введении животным ротенона. Ротеноновая модель является одной из моделей, которая вызывает нигростриальную дегенерацию, похожую по патогенетическим механизмам и симптомам на БП. Она также воспроизводит большинство симптомов расстройств движений и гистопатологические особенности БП (например, образование телец Леви). Нами установлено, что в продолговатом мозге почти половина митохондрий при ЭП были структурно повреждены, а общее количество органелл оказывалось ниже, чем в контроле. Кроме этого выявлялись значительные участки повреждения (деструкции) миелина, что является характерным признаком развития паркинсонизма. Активация K_{ATP} с помощью известного фармакологического активатора- диазоксида, существенно улучшала ультраструктуру тканей продолговатого мозга. В то же время введение уридина полностью устраняло проявления митохондриальной и эндотелиальной дисфункции в этой ткани и увеличивало общее количества митохондрий по сравнению с контролем. Кроме того, в исследуемой ткани выявлялись признаки активации синтеза белка, о чем свидетельствует увеличение (в среднем на 15%) количества свободных рибосом. Было также установлено, что уридин полностью устраняет структурные повреждения миелиновых волокон, так что ультраструктура ткани в его присутствии не отличалась от наблюдаемой в контроле. В то же время блокада мито K_{ATP} с помощью 5НД, способствовала развитию процессов нейродегенерации в продолговатом мозгу, а также отека тканей, клеток и клеточных структур.

Работа поддержана грантом РНФ № 16-15-00157, грантом Правительства РФ № 14.Z50.31.0028 и грантом РФФИ № 18-34-00297мол_а.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЛЬТРУЮЩИХ СВОЙСТВ СРЕДСТВ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ.

Михеев А.Ю.¹, Авсеенко А.В., Морозов В.Н.¹

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Чистота воздуха является важной составляющей экологической обстановки. В отличие от чистоты воды или продуктов питания чистоту воздуха сложнее контролировать. Обычно для очистки вдыхаемого воздуха от вредных аэрозольных частиц техногенного происхождения, а также от бактерий и вирусов используют медицинские или анатомические маски. Мы исследовали защитные свойства четырех коммерчески доступных анатомических масок: три из них компании Hubei Xianmeng Health Protection Commodity, (НХНРС, Китай) и одна ООО «Ньюфарм» (Россия).

Фильтрующие свойства анатомических масок оценивали по трем критериям: фильтрующие свойства материала, сопротивление материала потоку воздуха и прилегание масок к лицу. Пропускание частиц от 0,3—5 мкм определяли с помощью лазерного счетчика аэрозольных частиц Аэронанотех 4705. Для измерения пропускания более крупного аэрозоля была разработана специальная методика. Споры ликоподия, имеющие размер 28 ± 2 мкм [1], пролетали через материал масок, улавливались на нейлоновых фильтрах, разработанных нами ранее [2], и регистрировались с помощью микроскопа. Для исследования плотности прилегания масок к лицу определяли падение давления на маске при дыхании с помощью дифференциального измерителя давления. Плотность прилегания масок к лицу оценивали по отношению падения давления на маске при свободном и при плотном прилегании маски [3].

Результаты исследований показали недостаточное прилегание масок к лицу во всех случаях. Анатомические маски фирмы НХНРС без фильтрации пропускают 27—51% воздуха, а маски ООО «Ньюфарм» — до 65%. Задержание аэрозоля материалом фильтрующего элемента в среднем выше у маски MASKER'S NF (НХНРС) и составляет более 99,5% задержанных фильтрополотном частиц 0,3—5 мкм, в то время как задержание аэрозоля материалом остальных масок ниже и составляет 11—23% для частиц 0,3 мкм и 72—91% для частиц 5 мкм. Фильтрующий

материал всех масок одинаково хорошо задерживает более крупный аэрозоль ликоподия (более 99,99%).

1. *Eckhoff R.K.* Dust Explosions in the Process Industries // Gulf Professional Publishing,. 2003, 719 p.
2. *Mikheev A.Y., Shlyapnikov Y.M., Kanev I.L., Avseenko A.V., Morozov V.N.* Filtering and optical properties of free standing electrospun nanomats from nylon-4,6 // European Polymer Journal, 2016, 75, 317—328.
3. *Михеев А.Ю., Авсеенко А.В., Морозов В.Н.* Оценка защитных свойств некоторых видов анатомических масок // Лечащий врач, 2018, № 12, 59—64.

БАЛАНС АДЕНИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ И ГИБЕЛЬ НЕЙРОНОВ. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Мысин И.Е.¹, Попова И.Ю.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: imysin@mail.ru

Нейродегенеративные заболевания характеризуются прогрессирующей дисфункцией нервной системы и включают такие расстройства, как болезнь Альцгеймера, эпилепсию, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, хорея Хантингтона и многие другие [1—3]. Общей чертой многих нейродегенеративных заболеваний является гипометаболизм, характеризующийся сниженным потреблением глюкозы в мозге. Недостаточный метаболизм глюкозы может являться основным иницирующим фактором для этих заболеваний, а возникающая нейронная дисфункция дополнительно способствует метаболическому дисбалансу, создавая эффективную петлю положительной обратной связи [4]. В нашей работе проведено теоретическое исследование последствий нарушения энергетического метаболизма в нервной ткани на подробной биофизической модели метаболического сопряжения между нейронами и астроцитами в условиях афферентной стимуляции, имитирующей выброс глутамата в пресинаптическую щель. Основным результатом представленного модельного исследования стало обнаружение феномена аденилатного коллапса, суть которого состоит в необратимом падении концентрации АТФ после достижения критического порогового значения.

Данный эффект возникает в результате обращения реакции, катализируемой аденилаткиназой. При высоких значениях АТФ равновесие реакции смещено в сторону образования АДФ из АТФ и АМФ. При достижении порога равновесие смещается в противоположную сторону, т.е. происходит образование АМФ и АТФ из АДФ. Если данная ситуация сопровождается высоким расходом АТФ, то весь пул адениновых нуклеотидов переходит в АМФ. Однако АМФ не фосфорилируется, в отличие от АДФ в гликолизе и окислительном фосфорилировании, поэтому система быстро приходит к истощению АТФ. Таким образом, аденилатный коллапс может являться новым механизмом гибели клеток при развитии нейродегенеративных заболеваний.

Работа была выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» 2018г.

1. *Kudin A.P. et al.* Mitochondrial involvement in temporal lobe epilepsy // *Exp. Neurol.*, 2009, 218, № 2, 326—332.
2. *Jeon S.Y. et al.* Differential patterns of regional cerebral hypometabolism according to the level of cerebral amyloid deposition in patients with amnesic mild cognitive impairment // *Neurosci. Lett.*, 2016, 632, 104—108.
3. *Pan J.W. et al.* Neurometabolism in human epilepsy // *Epilepsia*, 2008, 49(3), 31—41.
4. *Zilberter Y., Zilberter M.* The vicious circle of hypometabolism in neurodegenerative diseases: Ways and mechanisms of metabolic correction. // *J. Neurosci. Res.*, 2017, 95, № 11, 2217—2235.

ЭНДОНУКЛЕАЗА РЕСТРИКЦИИ BSPD6II — НОВЫЙ ТЕРМОФИЛЬНЫЙ ИЗОШИЗОМЕР ФЕРМЕНТА ESO57I

Перевязова Т.А., Юнусова А.К., Артюх Р.И., Железная Л.А.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
e-mail: anatolia19@mail.ru

Из штамма *Bacillus species D6* выделена и охарактеризована эндонуклеаза рестрикции BspD6II. В двуязыковой ДНК она узнает асимметричный участок 5'-CTGAAG-3'/3'-GACTTC-5'. Определены места гидролиза ДНК этим ферментом. Они находятся вне участка узнавания на расстоянии 16 нт по направлению к 3'-концу ДНК от

последовательности 5'-CTGAAG-3' и 14 нт по направлению к 5'-концу в противоположной цепи. Ту же самую последовательность узнают и гидролизуют ее в идентичных позициях ДНК другие эндонуклеазы рестрикции — изошизомеры. В базе данных REBASE зарегистрированы три изошизомера ЭР VspD6II: Eco57I (прототип), AclI и VspKT5I.

Все эти рестриктазы выделены из мезофильных микроорганизмов с оптимумом роста от 20 до 37 °С, тогда как штамм-продуцент эндонуклеазы VspD6II термофилен (оптимум роста 55 °С). Мы показали, что ЭР VspD6II с высокой эффективностью гидролизует ДНК при 50 °С, в то время как оптимальной температурой функционирования ЭР Eco57I и ЭР AclI является 37 °С, а у ЭР VspKT5I максимум активности приходится на 28 °С. Таким образом, ЭР VspD6II является первым известным термофильным изошизомером ЭР Eco57I. Другим несомненным достоинством ЭР VspD6II по сравнению с коммерческими аналогами является ее способность катализировать исчерпывающий гидролиз субстратной ДНК без добавления в реакционную смесь S-аденозил-L-метионина. Такая способность не отмечена для ЭР Eco57I.

ЭР Eco57I относится к подтипу G эндонуклеаз рестрикции II типа и сочетает в одной молекуле эндонуклеазную и метилтрансферазную функции. Для него характерна регуляция гидролитической активности с помощью *Met(Ado)*. Параллельно с расщеплением ДНК ЭР Eco57I катализирует перенос метильной группы в одну из цепей узнаваемого участка, что предотвращает последующее расщепление ДНК. К подтипу G относится и ЭР AclI. Ее гидролитическая активность также регулируется с помощью *Met(Ado)*. Однако в отличие от ЭР Eco57I ЭР AclI в присутствии *Met(Ado)* катализирует исчерпывающий гидролиз субстратной ДНК. Согласно классификации Робертса и соавт., узнавание асимметричного участка, гидролиз ДНК на некотором расстоянии от него и отсутствие метилтрансферазной функции, позволяет отнести ЭР VspD6II и ЭР VspKT5I подтипу S эндонуклеаз рестрикции типа II. Таким образом, выделенная нами ЭР VspD6II имеет несомненные преимущества перед ее коммерчески доступными изошизомерами. Для ее эффективного функционирования не требуется присутствия в реакционной смеси *Met(Ado)*. Благодаря своим термофильным свойствам, ЭР VspD6II менее склонна к тепловой

денатурации и, следовательно, более стабильна в ходе очистки, хранения и транспортировки.

Перевязова Т.А., Юнусова А.К., Артюх Р.И., Вирясов М.Б., Кубарева Е.А., Железная Л.А. Эндонуклеаза рестрикции BspD6II — новый термофильный изоизомер фермента Eco57I // Биоорганическая химия, 2018, 44 (6), 648—654

ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА В ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТЫХ МЫШЦАХ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА (*SPERMOPHILUS UNDULATUS*) В ПЕРИОДЫ ЗИМНЕЙ АКТИВНОСТИ

Попова С.С.¹, Уланова А.Д.¹, Грицына Ю.В.¹, Салмов Н.Н.¹,
Рогачевский В.В.², Михайлова Г.З.¹, Бобылёв А.Г.¹, Моренков О.С.²,
Захарова Н.М.², Вихлянцев И.М.^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия;

² Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр „Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук“», Россия;

³ Пущинский государственный естественно-научный институт, Россия
e-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

Молекулярные механизмы, лежащие в основе предотвращения мышечной атрофии или уменьшения степени её развития у гибернирующих животных, широко обсуждаются в последние годы [Chang *et al.*, Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics, 2018]. В частности, обсуждается роль NFAT-кальцинейрин сигнального пути в развитии гипертрофии миокарда и в снижении развития атрофии скелетных мышц у тринадцатиполосного суслика (*Ictidomys tridecemlineatus*) в период гибернации [Zhang, Storey, Mol. Cell Biochem., 2016; Zhang, Storey, Cell Stress Chaperones, 2016]. Важную роль в активации этого сигнального пути играют кальпаины [Wu *et al.*, J. Biol. Chem., 2004].

Кальпаины — цитозольные кальций-активируемые цистеиновые протеазы [Goll *et al.*, Physiol. Rev., 2003]. Показано, что ряд саркомерных

белков, в том числе, гигантские белки титин и небулин, подвергаются протеолизу кальпаинами, в частности, кальпаином-1 [Mohrhauser, Underwood, Weaver, J. Anim. Sci., 2011]. Высказано предположение, что белковый обмен в мышечных клетках инициируется кальпаин-зависимым протеолизом титина, небулина и других саркомерных белков с последующей деградацией их фрагментов до аминокислотных остатков по убиквитин-протеасомному пути [Goll et al., J. Anim. Sci., 2008].

Цель нашего исследования заключалась в проверке предположения, что увеличение активности кальпаина-1, а также гиперактивация белкового синтеза в периоды «зимней» активности вносят вклад в предотвращение развития атрофии миокарда и уменьшение степени её развития в скелетных мышцах длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus*). Эксперименты проводились на животных, которые были разделены на три экспериментальных группы: «Летняя активность» (нормотермия, 38 °С, май—июль); «Гипотермия» (глубокое оцепенение, декабрь—март, температура сердечной мышцы 1,5—2,0 °С, продолжительность периода гипотермии 4—11 суток); «Зимняя активность» (нормотермия, 36—37 °С, периодически повторяющиеся временные промежутки (не более суток) между периодами гипотермии, взятие материала проводилось через 10—14 ч эутермного состояния после пробуждения).

Методом Вестерн-блоттинга обнаружено повышенное содержание аутолитических фрагментов кальпаина-1 в миокарде левого желудочка сердца (в 1,53 раза, $p \leq 0,01$, $n = 7$), *m. longissimus dorsi* (в 1,61 раза, $p \leq 0,01$, $n = 7$) и *m. soleus* (в 1,55 раза, $p \leq 0,01$, $n = 6$) активных «зимних» сусликов. Результаты свидетельствуют об увеличении активности кальпаина-1 в поперечнополосатых мышцах сусликов в период «зимней» активности. Значительных сезонных различий в содержании кальпаина-3/p94, кальпастина (ингибитора кальпаинов), Hsp 70 и Hsp 90 в исследованных мышцах не выявлено. С помощью нерадиоактивного метода определения скорости синтеза белка (SUnSET) обнаружено уменьшение скорости синтеза общего белка (в диапазоне м.м. 15—180 кДа) в миокарде (в 3,0 раза, $p \leq 0,01$, $n = 3$), *m. longissimus dorsi* (в 2,3 раза, $p \leq 0,01$, $n = 3$) и *m. soleus* (в 2,1 раза, $p \leq 0,01$, $n = 3$) активных «зимних» сусликов. Скорость синтеза тяжелых цепей миозина (м.м. 205 кДа), небулина (м.м. 700 кДа) и титина (м.м. 3000—3700 кДа) в мышцах активных «зимних» сусликов не отличалась от таковой в мышцах активных «летних» животных. Обнаружено восстановление массы *m.*

soleus и объема мышечных волокон *m. longissimus dorsi*, атрофированных в период спячки, а также выявлен тренд к увеличению массы сердечной мышцы у активных «зимних» животных. При этом наблюдалось восстановление нормального содержания титина, сниженного в исследуемых поперечнополосатых мышцах в период гипотермии. Вывод: гиперактивация кальпаина-1 в поперечнополосатых мышцах длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus*) в период «зимней» активности сопровождается преимущественным синтезом гигантских белков толстых и тонких нитей, что вносит вклад в предотвращение мышечной атрофии или уменьшение степени её развития.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-00326.

ГЕНЕРАЦИЯ ТЕПЛА В ПРОЦЕССЕ ЩЕЛОЧНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА РЕЗУЛЬТАТЫ «КОМЕТА ТЕСТА»

Сирота Н.П., Хижняк Е.П., Кузнецова Е.А.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

e-mail: sirota@iteb.ru

Метод электрофореза нуклеоидов индивидуальных клеток широко используется в исследованиях, направленных на оценку повреждений и репарации ДНК в индивидуальных клетках человека, животных и растений. При сравнении межлабораторных результатов обнаруживается существенная вариабельность в представляемых данных. Анализ литературы показал, что существенные различия наблюдались даже в исследованиях, проводимых по согласованным протоколам. Нами было высказано предположение, что одной из причин вариабельности результатов могут быть температурные изменения, происходящие в процессе электрофореза. Целью настоящей работы было: провести изучение динамики генерации тепла в условиях щелочного электрофореза в модельных экспериментах и оценить влияние теплообразования на изменение уровня повреждений ДНК клеток животных.

Использовали электрофоретическую камеру «SE-1/S-1N» (ООО «Компания Хеликон», Россия), объем буфера 250 мл, напряжение 27 В (напряженность электрического поля 2,0 В/см). Для измерения

температурных распределений использовалась неохлаждаемая ИК камера на диапазон 8—12 мкм типа JADE UC, фирмы CEDIP, Франция, с пространственным разрешением 384×288. Температурный эквивалент шума (NEdT), рассчитанный по всему полю регистрации, не превышал 0,05 °С при скорости регистрации 50 кадров в секунду. ИК камера была откалибрована на диапазон температур от 5° до 40 °С. 14-разрядная система оцифровки ИК данных обеспечивала возможность регистрации термограмм во всем указанном диапазоне температур. Регистрация ИК изображений начиналась за 1 минуту до включения напряжения на электродах и продолжалась на протяжении 15 минут после начала электрофореза. ИК данные, зарегистрированные за 1 минуту до начала электрофореза усреднялись, и усредненное ИК изображение вычиталось из всей последовательности ИК изображений, которые записывались в процессе электрофореза, используя систему обработки изображений «ALTAIR». Это позволяло устранить исходную температурную неравномерность и рассчитать приращение температур при электрофорезе.

Нами впервые показано, что в процессе щелочного электрофореза происходит неомогенное теплообразование в электрофоретическом растворе. Электрохимические процессы, протекающие на электродах, вносят несущественный вклад в разогрев электрофоретического раствора. Генерация тепла происходит в центральной части платформы для гелей в пристеночной области. Конвекционные потоки жидкости, образующиеся в результате газообразования на электродах, создают температурную неравномерность в области платформы для гелей. Максимальный прирост температуры составляет 7 °С к 15 минуте электрофореза. Начиная с пятой минуты, перепад температур в разных областях платформы составляет 2—2,5 °С. Сопоставление данных по идентичным слайдам, расположенным в разных местах камеры, показало отсутствие статистически значимых различий по средним значениям, как доли ДНК в хвосте кометы, так и расстояния миграции ДНК. То есть, мы показали, что температурная неоднородность электрофоретического раствора, возникающая в процессе электрофореза, не вызывает статистически значимых различий между препаратами, подвергающимися электрофорезу одновременно. Существенные различия между идентичными препаратами наблюдаются в случае, когда такие препараты подвергаются электрофорезу в различных экспериментах, и стартовая температура электрофоретического раствора различается более чем на 5 °С.

ДЕЙСТВИЕ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПРОЦЕСС ХИНОИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ, МОДЕЛИРУЮЩИЙ ОДИН ИЗ МЕХАНИЗМОВ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Сирота Т.В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизика РАН, Пушкино, Россия
e-mail: sirotatv@rambler.ru

Известно, что хиноидный путь окисления катехоламина (КА) дофамина приводит к образованию соответствующего аминокрома, который может превращаться в «темный пигмент» нейромеланин, обнаруживаемый в патологических так называемых тельцах Леви, возникающих в дофаминэргических нейронах при болезни Паркинсона (БП). Такой химический процесс является одним из механизмов прогрессирующего нейродегенеративного заболевания БП. Известно, что этот процесс сопровождается и одноэлектронным восстановлением молекулярного кислорода, что приводит к образованию супероксид радикалов. Низкая активность ферментов моноаминоксидазы (МАО) и катехол-*орто*-метилтрансферазы (СОМТ) не позволяет полностью удалить КА и «включается» путь неферментативного хиноидного окисления КА. Не «может помочь» в этой ситуации и фермент ДТ-диафораза и антиоксидантные системы клетки. Такова сложная биохимия БП, а первопричина ее возникновения вообще неизвестна [1—3]. В исследованиях с 1999 г. [4] реакция хиноидного окисления катехоламина адреналина, как супероксидгениерирующая модель, применяется нами для выявления про/антиоксидантных свойств различных материалов и для определения активности СОД [4—5]. Используя эту модель, в настоящей работе мы исследовали антиоксидантные свойства таких серосодержащие соединения как цистеин (Cys), глутатион восстановленный (GSH) и глутатион окисленный (GSSG), таурин и метионин, предполагая, что, возможно, эти вещества могут быть ингибиторами хиноидного окисления КА и, таким образом, претендовать на роль нейропротектора. Антиоксидантные свойства некоторых из них, известны, однако прямых экспериментальных данных, демонстрирующих антиоксидантную активность в опытах *in vitro*, мы не обнаружили. Интересно было испытать и вещества с дисульфидной связью (окисленный глутатион). Установлено,

что Cys, GSH и GSSG являются ингибиторами хинойдного окисления и антиоксидантами. В используемой модели не обнаружено ингибирующее действие метионина, а также аминокислоты таурин, в молекуле которой атом серы находится в полностью окисленном состоянии. Обнаруженные свойства Cys, GSH и GSSG могут найти применение для профилактики и лечения БП, но не как лекарственные формы, так как проблематична их биодоступность, а через активацию пути их биосинтеза в организме. В этом направлении и ведутся современные исследования: например, активация редокс-чувствительного сигнального пути Nrf2-ARE как эффективное средство предотвращения дофаминергической гибели нейронов у пациентов с болезнью Паркинсона [6].

1. *Muñoz P., Huenchuguala S., Paris I., Segura-Aguilar J.* // *Parkinsons Dis.*, 2012; 2012:920953. 10.1155/2012/920953.
2. *Segura-Aguilar J.* // *Oncotarget.*, 2017, Jul. 11, 8(28), 45036—45037, doi: 10.18632/oncotarget.18353.
3. *Segura-Aguilar J., Huenchuguala S.* // *Front Neurosci.*, 2918, 2018, Mar. 13, 12:106, doi: 10.3389/fnins.2018.00106.
4. *Сирота Т.В.* // *Вопр. мед. химии*, 1999, 45(3), 263—272.
5. *Sirota T.V.* // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2017, 11, № 2, 128—133.
6. *Izumi Y. Yakugaku Zasshi.* 2013, 133(9), 983—8.

**ГИДРОКСИКОБАЛАМИН (ВИТАМИН В12)
КАТАЛИЗИРУЕТ ОКИСЛЕНИЕ ДИЭТИЛДИТИОКАРБАМАТА
И ПОВЫШАЕТ ЕГО ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ
НЕЗАВИСИМО ОТ ИОНОВ МЕДИ**

*Соловьева М.Е.¹, Шаталин Ю.В.¹, Фадеев Р.С.¹, Соловьев В.В.²,
Сазонов А.В.², Кутышенко В.П.¹, Акатов В.С.¹*

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

² ЗАО «ВІОСАД», Санкт-Петербург, Россия

e-mail: akatov.vladimir@gmail.com

Ранее в наших исследованиях было показано, что гидроксикобаламин (витамин В_{12b}) в сочетании с некоторыми широко применяемыми антиоксидантами, например, аскорбатом, тиолами (GSH, NAC и DTT), способен катализировать образование до 200 мкМ пероксида водорода в

физиологических растворах. В результате такого ROS катализа наблюдался значительный цитотоксический эффект, вызванный железо-зависимым окислительным стрессом в клетках. Другой интересной и широко применяемой группой тиол-содержащих соединений являются дитиокарбаматы. Они являются основой для создания новых пестицидов, удобрений, а также лекарств. Известно, что некоторые металлы (Cu, Zn, Cd, Au) заметно повышают токсический эффект тиокарбаматов. Мы впервые показали, что витамин гидроксикобаламин, в состав которого входит кобальт, значительно повышает цитотоксичность диэтилдитиокарбамата (DDC), снижая в 3—5 раз величину его IC₅₀ в культурах клеток опухолевых линий. В отличие от реакции с простыми тиолами (GSH, NAC, DTT), этот эффект не был вызван накоплением пероксида водорода в растворах DDC + V_{12b}, хотя мы также наблюдали восстановление кислорода в этих растворах, и каталаза в 2 раза замедляла эту реакцию. Каталаза, а также антиоксиданты N-ацетилцистеин (NAC) и глутатион (GSH) частично ингибировали цитотоксический эффект DDC + V_{12b}. Таким образом, реакция DDC с витамином V_{12b} также является окислительно-восстановительной. Добавление V_{12b} в растворы DDC (>1 мМ) вызывало формирование кристаллического осадка, которое ингибировалось в присутствии GSH/NAC. По результатам УФ- и ЯМР-спектроскопии, хромато-масс анализа мы пришли к выводу, что основными продуктами реакции DDC + V_{12b} является дисульфирам (DSF), выпадающий в осадок, а также его растворимые окисленные формы — сульфоны и сульфоксиды. Ионы меди не влияли на цитотоксический эффект комбинации DDC + V_{12b}, в отличие от их добавления к растворам дисульфирама. Совокупность полученных результатов позволяет предполагать, что основной причиной синергичного повышения цитотоксического эффекта в растворах DDC + V_{12b} является формирование сульфонов и сульфоксидов дисульфирама. В результате совместного действия DDC + V_{12b} наблюдалась быстрая гибель клеток, которая имела ряд морфологических и биохимических отличий от апоптоза и некроза: отсутствовали межнуклеосомная фрагментация ДНК, блеббинг плазматической мембраны клеток, активация каспазы-3 и дестабилизация лизосом. В результате действия DDC + V_{12b} наблюдалась обширная вакуолизация цитоплазмы распластанных клеток, обратимая на начальных этапах, без нарушения целостности цитоплазматической мембраны. Образующиеся вакуоли формировались из эндоплазматического

ретикулума (данные электронной микроскопии и конфокальной микроскопии). В целом полученные результаты указывает на параптозоподобный тип гибели клеток, индуцированной сочетанием DDC + B_{12b}. Этот тип гибели является в настоящее время малоизученным. Изучение механизмов его индукции и регуляции представляет интерес при разработке препаратов для терапии опухолей, устойчивых к апоптоз-индуцирующим агентам.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта правительства РФ 14.Z50.31.008 с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН.

Solovieva M.E., Shatalin Yu.V., Solovyev V.V., Sazonov A.V., Kutysenko V.P. and Akatov V.S. Hydroxycobalamin Catalyzes the Oxidation of Diethylthiocarbamate and Increases its Cytotoxicity Independently of Copper Ions // Redox Biology, 2019, 20, 28—37, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.09.016>

ВЛИЯНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПУЧКОВ ПРОТОНОВ И ИОНОВ УГЛЕРОДА НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ МЫШЕЙ В ОТДАЛЁННЫЕ СРОКИ

Сорокина С.С.^{1}, Заичкина С.И.¹, Розанова О.М.¹, Шемяков А.Е.¹,
Смирнова Е.Н.¹, Дюкина А.Р.¹, Мальков А.Е.¹, Балакин В.Е.², Пикалов В.А.³*

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

² Физико-технический центр Физического института им. П.Н. Лебедева РАН, Протвино, Россия;

³ Институт физики высоких энергий НИЦ «Курчатовский институт», Протвино, Россия

e-mail: sv0723@yandex.ru

Лучевая терапия вот уже более века является одним из наиболее эффективных методов лечения онкологических заболеваний. Известно, что каждый год более 200 000 пациентов подвергаются облучению головного мозга, во время которого здоровые ткани также подвергаются воздействию, вызывая различные длительные неврологические симптомы у пациентов. Речь идёт как об острой и хронической радиационно-индуцированной травме мозга, так и о радиационной энцефалопатии, фокальных неврологических дефицитах, вторичной эпилепсии, психическом и поведенческом расстройстве, повышенном внутричерепном давлении и прогрессирующем ухудшении гиппокампа-

опосредованного обучения и памяти, что может значительно сказаться на качестве продлённой жизни пациентов. В последнее время всё больше радиотерапевтических центров стараются перейти на использование интенсивно-модулированной лучевой терапии (IMRT) на базе линейных ускорителей с выводом пучков протонов или углерода, чтобы безопасно и безболезненно доставлять точные дозы облучения к опухоли при минимизации нагрузки на окружающие здоровые ткани. Литературные данные о влиянии разных видов излучений на нейрогенез и когнитивные функции лабораторных животных достаточно противоречивы и зависят от вида объекта, дозы и режима облучения, применяемых методик и сроков тестирования.

Целью работы является сравнительная оценка отдалённых последствий влияния разных схем терапевтического облучения протонами и ускоренными ионами углерода на когнитивные функции (общая исследовательская активность, пространственное обучение, долговременная, кратковременная и эпизодическая гиппокамп-зависимая память) у мышей.

Эксперименты проводили на самцах мышей колонии SHK. Животных облучали либо однократно краниально в дозе 1,8 Гр тонким пучком протонов (Комплекс протонной терапии «Прометеус», ФТЦ ФИАН, Протвино), либо подвергали однократному тотальному воздействию пучка ядер углерода в дозе 1,5 Гр (ИФВЭ НИЦ «Курчатовский институт», Протвино).

Полученные результаты продемонстрировали, что облучённые животные не проявляют изменённую модель поведения: уровень тревожности не увеличен, ярко выражена исследовательская модель поведения, не наблюдается дефицит гиппокамп-зависимой и эпизодической памяти. Кроме того, в тесте долговременной памяти группа животных, облучённая протонами, совершает меньшее число ошибок в нахождении скрытой норки-«мишени», что может свидетельствовать об отсутствии негативного влияния однократной терапевтической дозы облучения головы мышей тонким сканирующим пучком протонов на когнитивные функции, и возможном побочном влиянии тотального облучения на общую физическую активность и когнитивные навыки животных.

Поскольку 2 Гр соответствует терапевтической фракции при гипофракционированном режиме облучения и не отражает клиническую

картину при суммарной дозе, получаемой пациентом при радиотерапии, нами также проведена сравнительная оценка облучения головы рентгеновским облучением и протонами в диапазоне доз 7,5—15 Гр в отдалённые сроки после воздействия. Результаты работы находятся в стадии обсуждения.

ТЕОРИЯ ДИНАМИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЕЙ — ПРОРЫВНЫЕ РЕШЕНИЯ В СТРАТЕГИЧЕСКОЙ ЦЕЛИ НАУКИ В ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА ЖИЗНИ РОССИЯН

Тараненко А.М.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Несомненная важность успехов иммунотерапии и биохимии стресса в открытии подходов к терапии ранее не лечимых массовых заболеваний в кардиологии и неврологии, психиатрии, как показали теоретические и клинические данные, сами по себе не могут привести к успеху в лечении [Мезенцева, 2014]. Причина: болезни — это на самом деле «динамические болезни» [Гласс, Мэски, 1991], и управление параметрами «силы» иммунитета и биохимической защиты клетки необходимо проводить под контролем роли негауссовых статистик динамики поведения энергетического метаболизма и процессов биохимической коррекции или ревитализации. Изучение материалов конференции ИТЭБ 2018 г. также показывает, что предложенные в докладах новые пути исследования лечения патологий упускают это важнейшее поле работы. Внедрение у ИТЭБ новых медицинских методов также содержит в идеях разработок это ключевое упущение. В условиях конкуренции института на международном уровне также необходимо несомненное использование наших преимуществ в наработках ИТЭБ, продолжая глубокие идеи проф., д.ф.-м.н. Е.Е. Селькова в амфиболической нелинейной регуляции. Классическая биохимическая коррекция в терапевтических подходах основана на предположении о ступенчатом или колебательном поведении метаболизма и на временном гауссовом распределении биохимических параметров. Это резко сужает постановку задачи и приводит к потере подлинных терапевтических решений для болезней. Например, к выводам, что болезни неизлечимы или поддаются лишь частичному прекращению прогресса заболевания. Кроме того, как показывают обширные

биохимические и клинические данные, поведение метаболизма описывается и не периодическими и не стохастическими колебаниями, а реальные временные статистики оказываются негауссовыми [статистика Леви, 1928 и др.]. Кроме того, можно показать, что без участия механизма клеточных часов Е.Е.Селькова управление как периодическими процессами, так и хаосом, позволяющее добиться излечения, например, методами гипо- и гипербарической оксигенации [Глушко А.А., 2014] не приводит к удовлетворительным результатам. Управление хаосом в аритмиях сердца и мозга и при возрастных и психотических изменениях ЭЭГ широко изучается в мировой и отечественной науке. В настоящей работе показано, что

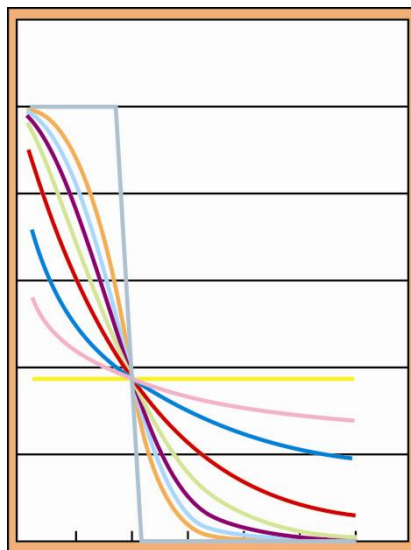


Рис. Диаграмма Леви для различных фрактальных режимов.

опора на эффект фрактальной сингулярности, в сочетании с методами серии переключений часов организма дает путь к реализации условий гиперрезонанса А.А. Глушко, дающего хорошие эффекты для сердечно-сосудистых, психиатрических и наркологических заболеваний (*рис.*).

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗРЫВНЫХ ДИНАМИЧЕСКИХ РЕЖИМОВ ДЛЯ НОВЫХ МЕТОДОВ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ В ЛЕЧЕНИИ АДДИКТИВНЫХ СИНДРОМОВ

Тараненко А.М.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
e-mail: taranenko1@rambler.ru

В работе впервые дается нелинейное объяснение эффекта успешного лечения аддикций А.А. Глушко и др. [1] (ГБУЗ «Московский научно-

практический центр наркологии», Москва) подачей газовых смесей с заданными интервалами экспозиции. Методика Глушко связана с управляемым падением парциального давления O_2 (ПДО) в последовательности ветвлений сосудов легких и сердечно-сосудистой (СС) системы. Глушко предположил, что это дает степенной (фрактальный) закон управления $V_{\text{вых}} = a (V_{\text{вх}})^{-n}$ (где a — параметр, зависящий от временной экспозиции и просвета сосудов; параметр n зависит от скорости подачи смеси) для повышения роли входного воздействия на мишень (митохондрии). Это позволило в разы [1] увеличить процентную долю улучшения состояния пациентов при лечении алкоголизма, наркомании и некоторых неврозов и психических расстройств. Для нелинейного объяснения эффекта следует учесть резонансные явления стресса с периодическими процессами в нервной (резонансы $T = T_0 2^n$) и СС системе (резонансы $M : N$, где M и N небольшие целые числа, 1, 2, 3... 6), и роль резонансов стресса с фрактальными шумами [2] на базе режимов странных аттракторов (СА) в отделах нервной и СС системы [2—3]. Изменение ПДО может вызывать изменение фрактальной размерности [2] для burst колебаний и спайков для СА мозга, и активацию резонансных периодик. Это приводит в модели к усилительным степенным эффектам, улучшающим лечение. Картина смены роли ряда СА и периодик изучена нами ранее [4—5], методом модельного обобщения клинических данных ([2] и многие другие) об этих колебаниях. С точки зрения подсчета энтропии хаос содержит больший порядок, чем периодики (Климонтович). Рост стресса смесями с O_2 вначале приводит к появлению новых СА в нескольких подсистемах сердца и мозга, что увеличивает общий порядок. И подавляет роль резонансных периодик. В дальнейшем включаются резервные механизмы подкрепления периодик, и они уменьшают запредельное, патологическое умножение хаотизации. При этом возникает фрактальное равновесие по П. Баку. Таким образом оксигенация создает новое, более упорядоченное по энтропии равновесие и при этом улучшается энергетика, возникает лечебный эффект [4]. Периоды такого равновесия образуют спектр Питца $[3^N / \text{if}(2 \& 4)]_{\text{mod} T}$. 3^N — это вклад гиперфлуктуаций от СА, порождаемых «тяжелыми хвостами» распределения Леви-Мандельброта для них: $p(x) = p_0 \exp(-ax^\beta)$, где $1 < \beta < 2$. Они увеличиваются в «отображении пекаря», входящего в отображение Эно (Henon) для СА. Член $\text{if}(2 \& 4)$ моделирует периодики, операция $[]_{\text{mod} T}$ моделирует буферные эффекты

энергетики за счет резервов депо, имеющих суточный период T . Спектр Питца, как видим, требует переходов хаоса в порядок и порядка в хаос в равновесии по П. Баку.

1. Брюн Е.А., Глушко А.А., Копоров С.Г. Инновационные технологии биофизической наркологии. Часть 1 Высокодифференцированная нормобарическая оксигенация — перспективы применения в наркологии.
2. Анищенко В.С., Вадивасона Т.Е. Лекции по нелинейной динамике : учеб. пособие для вузов. — М.—Ижевск : НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2011, 516 с.
3. Мезенцева Л.В. Теоретические основы нарушений сердечного ритма при экстремальных внешних воздействиях : дисс. ... д-ра биол. наук. — М., 2014.
4. Тараненко А.М. Биоинформационная модель управления окном «лечащего» фрактального поведения (управление метаболическим хаосом) // Естественные и технические науки, 2017, № 9, 77—82.
5. Тараненко А.М. Использование теоретических методов для коррекции кардиосклероза медленным управлением динамическим хаосом // Естественные и технические науки, 2013, № 2, 118—122.

ЕДИНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕПТИДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ МОРФОГЕНЕЗА ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ НА МОДЕЛИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЛОСКИХ ЧЕРВЕЙ — ПЛАНАРИЙ

Турас Х.П.^{1,2}

¹ Пушинский государственный естественно-научный институт, Россия;

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

Пептидная регуляция является одним из основных элементов клеточных взаимодействий. Ранее было показано, что пептиды высших позвоночных и человека также являются морфогенами — то есть управляют процессами морфогенеза животных [1]. Универсальные процессы пролиферации и дифференцировки клеток лежат в основе роста и морфогенеза как растений, так и животных. Однако, общие механизмы регуляции морфогенеза животных и растений на эпигенетическом уровне до настоящего времени изучены мало. Это относится к механизмам пептидной регуляции морфогенеза.

В настоящей работе исследовано действие синтетического пептидного регулятора роста растений — CLV-3 (Arg – Thr – Val – Pro – Ser – Gly –

Pro – Asp – Pro – Leu – His – His), который стимулирует рост корней резуховидки Таля *Arabidopsis thaliana*, а также экспрессируется в организме фитогельминтов — соевых цистообразующих паразитических нематод *Heterodera glycines*.

Было изучено действие данного пептида на генерацию сверхслабой фотонной эмиссии и регенерацию плоских червей — планарий *Girardia tigrina*, как известной биологической модели для изучения слабых химических и физических воздействий на морфогенез [2].

Исследование ССФЭ проводили параллельно на двух группах (экспериментальной и контрольной) из 30 декапитированных животных на двух люминометрах Биотокс-7а. После операции декапитации контрольную и экспериментальную группы планарий помещали в люминометр на 24 ч. Всплеск ССФЭ наблюдали сразу после перерезки в ходе регенерации, затем в течение часа ССФЭ релаксировала до уровня излучения интактного животного. Через 10—12 ч после декапитации наблюдали всплеск ССФЭ, совпадающий по времени с пиком пролиферации стволовых клеток – необластов в ходе морфогенеза. Это было подтверждено экспериментами по определению уровня пролиферации в посбластеме планарий в первые 24 ч после перерезки в суспензии необластов.

Затем на 72 и 120 ч после операции эти планарии были проанализированы методом ПКМ. В первые 2 ч регенерации пептид ускорял выход в релаксацию уровня ССФЭ в два раза по сравнению с контролем. Также вдвое был выше уровень ССФЭ через 12 ч действия пептида. Эффект стимуляции пролиферации был подтвержден методом подсчета митотического индекса в суспензии клеток планарий. Далее этот эффект стимуляции регенерации был отмечен через 72 и 120 ч после перерезки после определения динамики регенерации планарий методом ПКМ.

Таким образом, было показано, что пептиды — регуляторы морфогенеза растений, также влияют на регенерацию животных. С учетом того факта, что данный пептид синтезируется в теле паразитических круглых червей, можно допустить, что он также может быть фактором обеспечения дистантного взаимодействия фитогельминтов с растениями.

1. Шейман И.М., Тирас Х.П., Балобанова Э.Ф. Морфогенетическая функция нейропептидов // Физиологический ж. СССР, 1989, 75(5), 619—625.

2. Воробьева У.М., Новиков К.Н., Бурлакова О.В., Емельяненко В.И., Тирас Х.П. Система неинвазивного контроля морфогенеза планарий как альтернативный подход к биотестированию // Вестник ВолГУ. Серия 11, Естественные науки, 2018, 8, № 1, 21—26.

МИКРО- И НАНОРАЗМЕРНЫЙ ГИДРОКСИАПАТИТ В РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ХИРУРГИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Фадеева И.С.^{1,2}, Минайчев В.В.¹, Курсанова П.О.¹, Одинцова О.А.³,
Акатов В.С.^{1,2}

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

² Пущинский Государственный естественно-научный институт, Россия;

³ Тульский государственный университет, Россия

e-mail: aurin.fad@gmail.com

В современной реконструктивной хирургии и тканевой инженерии костной ткани наибольший интерес в качестве одного из самых перспективных материалов, по-прежнему, представляет синтетический гидроксиапатит (ГАп) — $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Первоначально для получения ГАп использовался метод высокотемпературного твердофазного синтеза, однако полученные на его основе материалы оказались нерезорбируемыми в организме реципиента и не способными к стимуляции неостеогенеза на месте введения [1]. Предпосылкой для следующего этапа исследований и разработок, связанных с использованием ГАп в качестве остеопластического материала стало обнаружение зависимости биологических свойств материала от его физико-химических характеристик. Так, например, было установлено, что одними из главных факторов, определяющих успешную биоинтеграцию ГАп в организме является температура синтеза ГАп, а также размер и форма его частиц [1, 2]. Исследование микроразмерного, полученного при высоких температурах (900—1180 °С) ГАп *in vivo* показало его слабую резорбцию, а также зависимость ответа организма от формы кристаллов, сопровождающуюся повышенной секрецией клетками провоспалительных цитокинов и матриксных металлопротеиназ, что часто приводило к развитию неконтролируемого воспаления на материал вплоть до его отторжения [1].

В дальнейшем, с развитием технологий получения наноразмерного ГАп (нГАп), открылись новые перспективы его применения в качестве остеопластического материала благодаря его схожести с ГАп нативной костной ткани [2]. Однако исследования остеопластических материалов на основе нГАп (таких как Ostim[®], nanOss[®], Cerabone[®], BoneSave[®], ReproBone[®] и др.) выявили выраженный дозозависимый эффект его применения.

В данной работе, в экспериментах *in vitro* нами не наблюдалось развития цитотоксического эффекта в присутствии водной Ostim-подобной пасты на основе 100% нГАп, но отмечалось нарушение адгезии клеток к поверхности материала и значительное подавление степени их пролиферации [3]. В дальнейшем, на модели гетеротопической имплантации крысам было обнаружено, что введение вышеуказанной 20%-ой, но не 10%-ой, нГАп-пасты вызывает воспалительную инкапсуляцию материала с последующим его отторжением уже к четвертой неделе имплантации. В тоже время было обнаружено, что добавление остеокондуктивного компонента (деминерализованной костной крошки) не только предотвращало развитие отторжения 20%-ой нГАп-пасты, но и способствовало активной миграции клеток в материал, активному неокollaгенезу и инициации процессов неоостеогенеза на имплантированном материале. Таким образом, было установлено, что негативный дозозависимый эффект водных Ostim-подобных паст на основе нГАп может быть купирован предотвращением агломерации частиц нГАп за счет дополнительного введения остеокондуктора (в частности, деминерализованной костной крошки). Полученные исследования также позволили выявить, что наиболее перспективным для дальнейших исследований и разработок нГАп-материалом является 10%-ая водная нГАп-паста.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН.

1. Панкратов А.С., Фадеева И.С., Минайчев В.В., Кирсанова П.О., Сенотов А.С., Юрасова Ю.Б., Акатов В.С. Проблемы биоинтеграции микро- и нанокристаллического гидроксиапатита и подходы к их решению // Гены & Клетки, 2018, XIII, № 3, 46—51.
2. Телешев А.Т., Горшениев В.Н., Яковлева М.А., Фомичев В.А., Фадеев Р.С., Минайчев В.В., Акатов В.С. Гидроксиапатит для замещения дефектов костной ткани // Медицинская техника, 2018, № 1 (307), 13—16.

3. *Minaychev V.V., Teleshev A.T., Gorshenev V.N., Yakovleva M.A., Fomichev V.A., Pankratov A.S., Menshikh K.A., Fadeev R.S., Fadeeva I.S., Senotov A.S., Kobyakova M.I., Yurasova Yu.B. and Akatov V.S.* Limitation of biocompatibility of hydrated nanocrystalline hydroxyapatite // IOP Con. Series: Materials Science and Engineering, 2018, 347: 012045.

ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ ПОВЫШЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ, ПОМЕЩЕННЫХ В ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КАПСУЛЫ И МИКРОЯЧЕЙСТЫЙ ПОЛИМЕРНЫЙ МАТЕРИАЛ

Фомкина М.Г.¹, Замятина Е.А.¹, Анпазов Н.О.², Ибадуллаева С.Ж.²

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

² Кызылординский государственный университет им. Коркыт Ата, Республика Казахстан

Создание высокочувствительных сенсоров, способных быстро и надежно регистрировать присутствие биологически активных соединений в объектах аналитического контроля, является одним из приоритетных направлений развития современной аналитической химии. Разработанный в ИТЭБ РАН метод иммобилизации ферментов в тонкопленочный микроячейстый полимерный материал представляет собой комбинацию противоположно заряженных полиэлектролитов, физически адсорбированных на твердой подложке, между слоями которых находятся микрокапсулы из этих же полиэлектролитов содержащие функционально-активные молекулы фермента [1—3]. Каталитическая активность ферментов, подвергшихся процедуре инкапсулирования, снижается довольно значительно по сравнению с активностью свежеприготовленного свободного фермента [1, 4, 5]. Поэтому в настоящем исследовании ставилась задача получения инкапсулированных ферментов с каталитической активностью сравнимой с активностью свободного фермента.

Показано, что для реализации максимальной каталитической активности конкретных инкапсулированных и иммобилизованных ферментов требуется использование разных типов полиэлектролитов для формирования оболочки микрокапсул. Для фермента уреазы предпочтительно использование в качестве внутреннего слоя оболочки, контактирующего с ферментом, полиэлектролита ПСС (знак заряда «←»), а

для пероксидазы хрена предпочтительно использование полиэлектролита ПААГ (знак заряда «+»).

Показано что при удалении кальций-карбонатной компоненты из микрокапсул в процессе изготовления полимерного микрореактора с помощью хелатирующего агента ЭГТА активность инкапсулированных или иммобилизованных ферментов выше, чем при использовании ЭДТА (общепринятый способ).

При соблюдении двух условий: а) формирование оболочки с учетом знака заряда полиэлектролитов, образующих внутренний слой оболочки, и б) удаление кальций-карбонатной компоненты из микрокапсул с помощью ЭГТА, можно достичь высокой каталитической активности инкапсулированных (иммобилизованных) ферментов. В этом случае активность инкапсулированных ферментов составляет около 70% активности свободного свежеприготовленного фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (проект AP05134201).

1. *Терновский В.И., Чернохвостов Ю.В., Фомкина М.Г., Монтрель М.М.* // Биофизика, 2007, 52(5), 825.
2. *Монтрель М.М., Терновский В.И., Фомкина М.Г., Петров А.И.,* Патент № 2333231 // Б.И., 2008, № 25 (52).
3. *Фомкина М.Г., Минкабирова Г.М., Монтрель А.М.* Патент № 2567320 // Бюл. № 31 от 10.11.2015.
4. *Petrov A.I., Volodkin D.V., Sukhorukov G.B.* // Biotechnology Progress, 2005, 21(3), 918.
5. *Сухоруков Б.И., Тихоненко С.А., Сабурова Е.А. и др.* // Биофизика, 2007, 52(6), 1041.

РОЛЬ ЦИТОЗОЛЬНЫХ ПИРИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ СУПЕРОКСИДНЫХ ВСПЫШЕК В МИТОХОНДРИЯХ

Харечкина Е.С., Никифорова А.Б., Круглов А.Г.

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

Увеличение проницаемости внутренней мембраны митохондрий для ионов и низкомолекулярных соединений является ключевым событием, инициирующим клеточную гибель при самых разных патологических

состояниях: ишемическая болезнь сердца и мозга, нейродегенерация, мышечная дистрофия, интоксикация микробными токсинами и др. [1, 2]. Главным механизмом пермеабилзации внутренней мембраны при наиболее значимых патологических состояниях является открывание неспецифической митохондриальной поры (мРТР). Регуляция открывания мРТР хорошо изучена. Активные формы кислорода (АФК), окислители и дитиоловые реагенты стимулируют, тогда как Mg^{2+} , АТФ/АДР, NAD(P)(H) и ингибиторы циклофилина D подавляют открывание мРТР, вызванное ионами Ca^{2+} [3]. Открывание мРТР вызывает всплеск генерации АФК в изолированных митохондриях [4, 5]. Также, вспышка продукции АФК происходит в клетках при патологических состояниях, которые могут вызывать открывание мРТР [6—9]. Было предложено несколько механизмов для объяснения всплеск АФК при индукции мРТР и в условиях, облегчающих её индукцию. Однако до настоящего времени эти механизмы были неясны. В настоящей работе мы показали, что пермеабилзация митохондриальных мембран при индукции мРТР или порообразующим пептидом аламетицином вызывает вспышку продукции супероксид аниона (СА) и пероксида водорода, и ингибирование аконитазы матрикса. С помощью СА-зонда 3,7-дигидро-2-метил-6- (4-метоксифенил) имидазол [1,2-а] пиазин-3-он (MCLA) было показано, что субстраты НАД-зависимых дегидрогеназ, ингибиторы дыхательной цепи, и NAD(P)H в миллимолярных концентрациях подавляет или задерживает вспышки СА. В присутствии добавленных NADH и NADPH вспышки СА наблюдались только после значительного окисления пиридиновых нуклеотидов. Продукция СА была максимальной при окислительно-восстановительных потенциалах NADPH и NADH от -315 до -295 мВ и от -325 до -270 мВ, соответственно, в зависимости от концентрации NAD(P)H. NADPH поддерживал в несколько раз более мощную генерацию СА, чем NADH. В интактных митохондриях NADPH- и NADH-зависимая генерация СА была незначительной. Субстраты дыхания в физиологических или более низких концентрациях были неспособны подавить вспышку СА, поддерживаемую NADPH. Особенности NADPH-зависимой генерации СА могут свидетельствовать об участии аденодоксинредуктазы и аденодоксина матрикса в генерации всплеск СА при пермеабилзации митохондриальных мембран.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, договор № 17-75-10122.

1. *Rasola A., Bernardi P.* // Apoptosis, 2007, 125, 815—833.
2. *Halestrap A.P., Richardson A.P.* // J. Mol. Cell Cardiol., 2015, 78, 129—141.
3. *Bernardi P. et al.* // Physiol. Rev., 2015, 95, 1111—1155.
4. *Korge P.G. et al.* // J. Biol. Chem., 2017, 292, 9882—9895.
5. *Batandier C. et al.* // J. Biol. Chem., 2004, 279, 17197—17204.
6. *Zorov D.B. et al.* // J. Exp. Med., 2000, 192, 1001—1014.
7. *Wang W. et al.* // Antioxid. Redox Signal., 2016, 25, 534—549.
8. *Webster K.A.* // Future Cardiol., 2012, 8, 863—884.
9. *Liu X. et al.* // Exp. Neurol., 2015, 271, 122—130.

**ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ
МИНИАТЮРНЫХ ИНФРАКРАСНЫХ КАМЕР
НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ
В МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ**

Хижняк Е.П., Хижняк Л.Н.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Температура является важнейшей характеристикой состояния здоровья человека. Медицинский термометр уже давно стал первичным инструментом медицинской диагностики. Однако существует целый ряд заболеваний, при которых интегральная температура тела человека остается нормальной, а меняется только локальная температура в области патологических процессов. Пространственное распределение температур на поверхности тела позволяет определить локализацию патологических процессов, которые могут быть связаны с различными формами нарушений кровотока, воспалительными процессами, спазмом, локальными нарушениями метаболизма и иннервации биологических тканей, развитием онкологических новообразований.

Инфракрасная (ИК) термография является наиболее совершенным методом дистанционной регистрации пространственного распределения температур. Этот метод диагностики абсолютно безопасен для человека, так как в его основе лежит принцип регистрации температурных распределений по собственному тепловому излучению объектов в ИК диапазоне длин волн. Поэтому он может без каких-либо ограничений использоваться в ходе профилактических обследований пациентов с целью раннего выявления патологических процессов.

Важным фактором, сдерживающим широкое применение метода ИК термографии в медицинской диагностике, является очень высокая стоимость ИК камер. В последнее время появились миниатюрные ИК камеры, стоимость которых сравнима со стоимостью сотовых телефонов. На их базе могут быть созданы портативные медицинские диагностические ИК системы для медицинских учреждений первичного звена (районных и сельских поликлиник) и машин скорой помощи. В перспективе возможно создание персональных диагностических ИК систем для использования в домашних условиях [7, 11], при этом для первичного обследования человеку не обязательно посещать поликлинику, зарегистрированные ИК термограммы могут быть переданы врачу по интернету для дальнейшего анализа.

Работа посвящена оценке перспективных возможностей применения миниатюрных матричных инфракрасных (ИК) камер нового поколения в медицинской диагностике. Приведен анализ реальных технических параметров миниатюрных ИК камер разных типов, по результатам которых даются рекомендации о возможности использования конкретных моделей в качестве приёмного устройства ИК излучения в медицинских диагностических системах. Показано, что температурная чувствительность и пространственная неравномерность миниатюрных ИК камер не превышают $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, что достаточно для медицинской диагностики. Однако без дополнительных доработок ни одна из камер не обеспечивает необходимой точности температурных измерений. Реальная ошибка измерения абсолютных значений температур может достигать $4\text{--}5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в диапазоне от 20 до $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для использования этих камер в медицинских целях необходимо применять процедуру коррекции результатов температурных измерений для улучшения точности регистрации температур до $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Приводятся результаты пробных диагностических обследований, проведенных с использованием лабораторного макета диагностической ИК системы и базового пакета программ первичной обработки ИК данных.

**ИНТЕГРАЛЬНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ИНТЕНСИВНОСТИ
ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ У ЧЕЛОВЕКА
ПРИ ИХ ОСЛАБЛЕНИИ — МИОПАТИЯ У ДЕТЕЙ,
ПОЖИЛОЙ ВОЗРАСТ — И В ХОДЕ ЛЕЧЕНИЯ**

*Хундерякова Н.В.¹, Захарченко М.В.¹, Ячкула Т.В.¹, Федотчева Н.И.¹,
Литвинова Е.Г.¹, Баранич Т.И.², Сухоруков В.С.², Артемьева С.Б.²,
Косякова Н.И.³, Шварцбург П.М.¹, Кондрашова М.Н.¹*

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

² ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия;

³ ФГБУЗ Больница Пущинского научного центра РАН, Россия

e-mail: nkhunderyakova@gmail.com

На основе авторского нетравмирующего цитобиохимического метода определения активности ферментов митохондрий и гликолиза внутри лимфоцитов в капле крови на мазке разработан интегральный показатель, отражающий уровень защитных восстановительных процессов при миопатии (МП) у детей, характеризующейся ослабленной функцией мышц. Наличие одного интегрального числового показателя сильно облегчает оценку состояния больного и результата лечения. Для контроля биохимических процессов выбраны всего два ключевых фермента, которые позволяют определить направление общих потоков превращения веществ — в сторону их использования, как топлива — катаболизм — наиболее мощный фермент дыхания — сукцинатдегидрогеназа (СДГ), а также в противоположном направлении — для восстановления трат на работу — биосинтезов — анаболизм — противоположный по значимости фермент гликолиза — лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Но еще более информативным показателем является отношение активности ЛДГ/СДГ, которое по нашему предложению используется, как показатель, аналогичный классическому эффекту Варбурга (ЭФВ), отражающему отношение гликолиза к дыханию.

В нашей работе впервые показано увеличение активности и СДГ, и ЛДГ при МП. Однако, это, казалось бы, благоприятное изменение, связано со снижением отношения ЛДГ/СДГ или ЭФВ. Снижение ЭФВ противоположно его широко известному значительному увеличению в интенсивно растущих раковых клетках. Учитывая это, снижение ЭФВ

может отражать ослабление восстановительных процессов при МП. Ведущую роль при этом играет повышение активности СДГ, которая уменьшает более сильную активацию ЛДГ, необходимую для преобладания над активностью СДГ и повышения ЭФВ. Таким образом, благоприятным для улучшения состояния больных МП, возможно, следует считать снижение активности СДГ, а не повышение, к которому обычно стремятся клиницисты. Особенно информативен наш интегральный показатель $ЛДГ / СДГ = ЭФВ$.

Вывод о том, что снижение ЛДГ/СДГ отражает ослабление восстановительных анаболических процессов, согласуется с нашими результатами выявления такого же сдвига у пожилых людей также с ослаблением роста.

По нашим предварительным данным ЭФВ снижается при кратких курсах введения Цитофлавина и Элькара, поэтому их использование для лечения МП требует дальнейших исследований нашим методом. Следует отметить, что выбор препаратов для конкретного больного в настоящее время проводится без контроля их действия.

Биохимический контроль влияния позволяет впервые осуществлять такой подбор не «вслепую, а с открытыми глазами». Он позволяет также предложить новые, более подходящие средства для коррекции патологических отклонений.

Работа выполнялась при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-04-00342 и 16-04-00636.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКЗОТЕРМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В МИКРО-, НАНО-ОБЪЕМАХ ВНУТРИ ЖИВОЙ КЛЕТКИ И РАЗРАБОТКА НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЕЙ

Цеев В.Э.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Было проведено исследование влияния ультралокальных температурных градиентов на ускоренный рост отростков нейронов в первичной культуре нейронов гиппокампа крысы

Для создания ультралокальных температурных градиентов нами был использован инфракрасный лазер 1455 нм с максимальной мощностью

160 мВт Значительное поглощение водой излучения сфокусированного инфракрасного лазера на частоте 1455 нм при мощностях порядка 12—16 мВт (замеренных непосредственно с объектива микроскопа) позволили нам реализовать экспериментальную конфигурацию на базе флуоресцентной станции Nikon Eclipse Ti-e, дающую возможность выстраивать вблизи одиночных живых клеток ультралокальные стационарные температурные градиенты порядка 2 °С на дистанции в 20 микрометров и исследовать явление ускоренного направленного роста отростков нейронов по предустановленному в определенной пространственной точке ультралокальному градиенту.

Получены данные, демонстрирующие воздействие на нейроны постоянного ультралокального градиента температуры созданного сфокусированным лучом ИК лазера 1455 нм. Обнаружено явление направленного аномально быстрого роста ньюритов (прядка 10 микрон в минуту) к точке фокусировки луча инфракрасного лазера.

Было проведено исследование исследование стабильности гибридных полиэлектролитных микрокапсул (гПЭМК), а также исследование скорости высвобождения инкапсулированных модельных гидрофильных и гидрофобных соединений из них. Изучение взаимодействия перитонеальных макрофагов с гПЭМК показало, что полученные контейнеры успешно проникают внутрь клеток. В течение 48 часов происходит частичная деградация микрокапсул с высвобождением как содержимого из гидрофильного (BSA-FITC) и гидрофобного слоя (RBITC) внутрь клетки.

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСА ПРОТОННОЙ ТЕРАПИИ «ПРОМЕТЕУС» ДЛЯ РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ЖИВОТНЫХ

*Шемяков А.Е.^{1,2}, Смирнова Е.Н.¹, Розанова О.М.¹, Заичкина С.И.¹,
Сорокина С.С.¹, Дюкина А.Р.¹, Балакин В.Е.²*

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

² Физико-технических центр ФИАН им. П.Н. Лебедева РАН, Протвино, Россия

e-mail: alshemyakov@yandex.ru

В настоящее время протонная терапия (ПТ) используется для лечения многих видов онкологических заболеваний. Она особенно подходит в тех

случаях, когда способы лечения ограничены, а традиционная лучевая терапия представляет большой риск для пациента. ПТ применяется для лечения опухолей глаза и глазной впадины, опухолей мозга, расположенных вблизи ствола головного или спинного мозга, рака предстательной железы и детской онкологии. В России существует пять центров ПТ: на базе ПИЯФ в г. Гатчина; на базе ОИЯИ в г. Дубна; ЛДЦ МИБС, Санкт-Петербург; МРНЦ, г. Обнинск; на базе ФТЦ ФИАН, г. Протвино. Большинство этих центров являются медицинскими учреждениями или находятся на территории медицинских комплексов, что накладывает ограничения на использование данных установок для исследовательских целей.

На базе ФТЦ ФИАН в г. Протвино комплекс протонной терапии «Прометеус» разрабатывается и эксплуатируется в рамках научно-исследовательского предприятия, что предоставляет возможность проведения физических и биологических экспериментов. Данный комплекс состоит из компактного синхротрона диаметром 5 м и массой 15 т, встроенной рентгеновской трубки и детектора, кресла для иммобилизации пациента, программного обеспечения. Установка способна ускорять протоны в диапазоне энергий 30—330 МэВ. Облучение объектов-мишеней осуществляется в импульсном режиме методом сканирования тонким лучом заданного объема. Диаметр луча зависит от энергии и составляет 5—20 мм. На терапевтической установке «Прометеус» можно формировать протонные пучки с модифицированным пиком Брегга, тонкий сканирующий пучок, облучать до пика, в пике и после пика Брегга. Для проведения экспериментов на животных была разработана специальная платформа для размещения животных в поле облучения. В программу контроля и управления установкой были внесены дополнения, позволяющие быстро составлять планы облучения по заданным координатам на платформе и с заданной интенсивностью пучка. Для каждого эксперимента проводится как минимум одна процедура съемки проекций при вращении платформы на 360° и восстанавливается трехмерный объект для анализа и планирования облучения. Все данные по текущему эксперименту: расположение объекта, проекции, трехмерная модель, планы облучения и т.д. вносятся в базу данных, параллельную базе данных пациентов. Таким образом, каждый эксперимент может быть восстановлен из архива и воспроизведен повторно без проведения долгих подготовительных процедур. Появление такого оборудования создало

предпосылки для создания исследовательского модуля, на котором проводятся также эксперименты на культурах нормальных и опухолевых клеток мышей, лимфоцитах здоровых и с разными формами и стадиями онкозаболеваний людей и животных в условиях тотального и локального облучения разных частей тела.

В результате был проведен комплекс радиобиологических исследований в условиях *in vivo* и *in vitro* с использованием разнообразных методик в зависимости от способов доставки пучков протонов, дозы и объемов облучения. Эксперименты на модельных объектах внесли важный вклад при освоении и отладке оборудования, апробирования разных вариантов позиционирования, контроля корректной доставки дозы, решения проблем дозиметрии. Полученные данные открывают новые возможности для ПТ.

«ЛИКИ ВРЕМЕНИ» И СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

Шноль С.Э.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцдино, Россия
e-mail: Shnoll@mail.ru

1. В 1951—1953 годы, при работах по совершенствованию методов измерений радиоактивности по тематике «советского атомного проекта», была обнаружена высокая степень сходства форм гистограмм, построенных по «Оптимально Малым» числам результатов измерений процессов разной природы, что противоречило «статистическим традициям» (закону Больших чисел, Критериям Согласия гипотез «вероятностным методам «обработки» результатов измерений). Статистические методы были созданы на основе теории вероятностей для преодоления «Разброса результатов» и построения статистических распределений — усреднений, — нивелирующих флуктуации = «разброс», нарушений «Принципа *Ceteris paribus*». Однако, эти методы сопряжены с потерей значительной части получаемого материала. Альтернативой «статистической, вероятностной» оценки получаемых результатов является сравнение формы гистограмм, что предложено Платоном и Аристотелем.

2. К 1959—1979 годам мы показали, что формы таких «оптимально малых гистограмм» вообще не зависят от природы измеряемого процесса, а определяется только свойствами времени. Это было показано по сходству формы гистограмм, построенных при измерениях флуктуаций всех видов радиоактивного распада, броуновского движения, скоростей химических и биохимических реакций, физиологических процессов, сейсмических колебаний земной коры, шумов в электронных или полупроводниковых схемах и в компьютерах.

3. В 2002 году мы обнаружили, что формы гистограмм изменяются при изменениях времени и направления векторизованных процессов — потоков световых лучей и потоков альфа-частиц при в коллиматорах. Таким образом, формы таких гистограмм являются характеристиками изменений метрики пространства-времени.

4. К 2019 году были выполнены тысячи опытов как в наземных лабораториях во всех континентах Земли, на Северном Полюсе, в Арктике, и в Антарктике, так и на самолетах, в морских экспедициях на кораблях во всех океанах (Тихом, Индийском, Атлантическом, Северном Ледовитом).

5. Мы показали, что формы гистограмм закономерно изменяются в зависимости от взаиморасположении, скорости и направления движения небесных тел — восходов, заходов, моментов равноденствий, затмений планет Луны и Солнца, Новолуний, двумя суточными периодами — звездным (1436 мин) и солнечным (1440 мин), большом числе 25—27 суточных и трех годовых = годичных) периодов (календарным, равными 365 средних суток, тропическим (равным 365 суток + 5 ч 48 мин), сидерическим — равным 365 суток + 6 ч 9 мин).

По совокупности свойств, гистограммы, получаемые по оптимально малым числам результатов измерений, были названы «Лики времени».

6. В 1999—2019 годы рассматривается предположение, что «Лики времени», наблюдаемые в опытах различной постановки, могут быть «навигационными сигналами» для ориентации в космическом пространстве в условиях экранировки от электромагнитных полей.

Шноль С.Э. Космофизические факторы в случайных процессах / ред. Д.Д. Рабунский. — Stockholm : изд-во Svenska Fisikarkivet, 2009. 388 стр.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА АМИЛОИДНЫМИ АГРЕГАТАМИ ГЛАДКОМЫШЕЧНОГО ТИТИНА *IN VITRO*

Шумейко С.А.¹, Бобылёва Л.Г.¹, Вихлянцев И.М.^{1,2}, Бобылёв А.Г.^{1,2},
Якупова Э.И.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия;

² Пущинский государственный естественно-научный институт, Россия

e-mail: yakupova.mira@mail.ru

Одной из врожденных защитных реакций организма является система комплемента. Реакция обеспечивается последовательной работой 20 и более протеаз, способных быстро активироваться по каскадному механизму и образовывать мембраноатакующий комплекс (пору) на чужеродных клетках, что приводит к их лизису. Системе комплемента также отнесена важная роль в удалении апоптотических клеток. Однако в результате неадекватной активации системы комплемента могут быть атакованы нормальные клетки, что приводит к развитию патологических процессов в тканях. Действительно, неконтролируемая активация системы комплемента была признана в качестве патогенетического фактора при многих сердечно-сосудистых, иммунных, почечных и неврологических заболеваниях [1].

Воспалительные процессы и развитие нейродегенеративных заболеваний у человека также сопровождаются активацией системы комплемента. Обнаружено, что C1q и C3b белки, запускающие весь каскад реакции, связываются с амилоидными агрегатами при болезни Альцгеймера и Паркинсона, относящимися к заболеваниям, называемым амилоидозами [2]. Амилоидозы по настоящее время считаются неизлечимыми заболеваниями человека и животных, которым характерно сопутствие хронического воспаления.

Показано, что мышечный белок титин способен формировать *in vitro* амилоидные агрегаты, обладающие цитотоксичностью [3]. Нельзя исключить, что титин может входить в состав амилоидных отложений, обнаруженных в поперечно-полосатых мышцах и меди сосудов при развитии системных амилоидозов или амилоидозов мышц [4]. Цель настоящего исследования заключалась в проверке предположения, что амилоидные агрегаты титина способны активировать систему комплемента (связываться с белками C1q и C3b).

Агрегаты титина гладких мышц были сформированы в двух буферных растворах: 0,15 М глицина, рН 7,0—7,5 и 200 мМ КСl, 10 мМ имидазола, рН 7,2—7,4. При помощи метода рентгеновской дифракции подтверждена амилоидная природа агрегатов [5]. ELISA анализ не выявил статистически значимых отличий связывания С1q и С3b компонентов системы комплемента с амилоидными агрегатами гладкомышечного титина при сравнении связывания С1q и С3b с БСА. Аналогичные данные были получены и при использовании человеческой сыворотки крови: не наблюдалось связывания С1q и С3 из сыворотки с агрегатами титина. Таким образом, наши результаты показывают, что гладкомышечный титин не может быть вовлечен в активацию системы комплемента во время развития мышечных амилоидозов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-315-00012.

1. *Janeway C.A. Jr, Travers P., Walport M. et al.* Immunobiology: The Immune System in Health and Disease / 5th edition. The complement system and innate immunity. — New York : Garland Science, 2001.
2. *Akiyama H., Barger S., Barnum S. et al.* Inflammation and Alzheimer's disease // *Neurobiol. Aging.*, 2000, 21(3), 383—421.
3. *Bobylev A.G., Galzitskaya O.V., Fadeev R.S. et al.* Smooth muscle titin forms in vitro amyloid aggregates // *Biosci. Rep.*, 2016, 36(3): e00334.
4. *Uversky V.N., Fink A.L.* Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded // *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1698(2), 131—53.
5. *Yakupova E.I., Vihlyantsev I.M., Bobyleva L.G.* Different amyloid aggregation of smooth muscles titin *in vitro* // *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2018,36(9), 2237—2248.

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АМИЛОИДНОЙ АГРЕГАЦИИ МИОЗИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО С-БЕЛКА

*Шумейко С.А.¹, Якупова Э.И.¹, Бобылёв А.Г.¹, Уланова А.Д.¹, Салмов Н.Н.¹,
Вихлянцев И.М.^{1,2}, Бобылёва Л.Г.¹*

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия;

² Пущинский государственный естественно-научный институт, Россия
e-mail: liamar@rambler.ru

Агрегация белков — достаточно распространенный процесс, происходящий в клетках живых организмов. В настоящее время белковой агрегации уделяется большое научное внимание. В наибольшей степени

это касается амилоидной агрегации, которую связывают с различными заболеваниями организма человека и животных — амилоидозами.

В данной работе мы исследовали особенности амилоидной агрегации миозин-связывающего С-белка (МуВР-С) скелетных мышц млекопитающих. МуВР-С — белок саркомерного цитоскелета поперечно-полосатых мышц. Он расположен в А-диске саркомера и связан с белками толстых и тонких нитей. МуВР-С состоит из Ig-подобных и FnIII доменов. Две скелетные изоформы этого белка экспрессируются в медленных и быстрых мышечных волокнах. Исследования, проведенные нами с помощью электронной и атомно-силовой микроскопии, показали, что МуВР-С скелетных мышц кролика в условиях с низкой ионной силой формирует аморфные агрегаты и фибриллы. Изучение кинетики агрегации методом динамического светорассеяния выявило способность белка формировать крупные агрегаты уже в первые минуты понижения ионной силы. Помимо крупных агрегатов данным методом был выявлен процесс формирования олигомеров, состоящих из 5—7 молекул белка, в первые 12 часов агрегации.

Структурные исследования агрегатов МуВР-С, проведенные методом рентгеновской дифракции, выявили наличие рефлексов, которые предполагают наличие четвертичной кросс-бета структуры, свойственной амилоидным агрегатам. Методом кругового дихроизма показано, что в процессе агрегации МуВР-С не происходит изменений во вторичной структуре белка. Полученные результаты указывают на то, что в процессе агрегации МуВР-С происходят внутримолекулярные перестройки, которые протекают без значительных энергетических затрат на формирование кросс-бета структуры. Можно предположить, что формирование кросс-бета структуры происходит как за счет частичного или полного разворота доменов внутри белка, так и между доменами соседних молекул белка. Полученные результаты расширяют представления о процессе агрегации мультидоменных мышечных белков.

Работа выполнялась при финансовой поддержке осуществляемой в рамках проекта РФФИ № 18-015-00268.