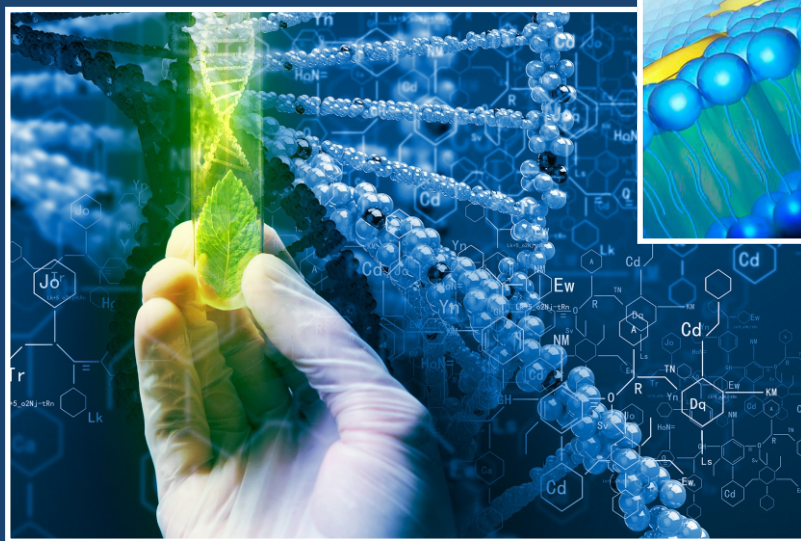
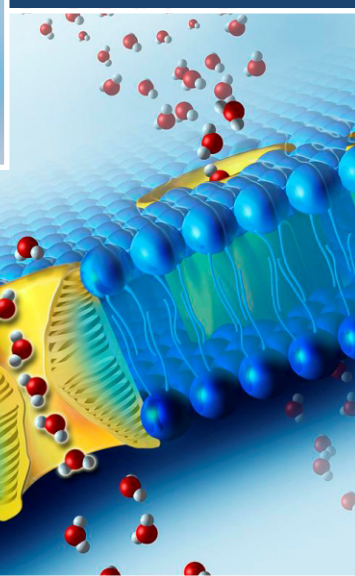
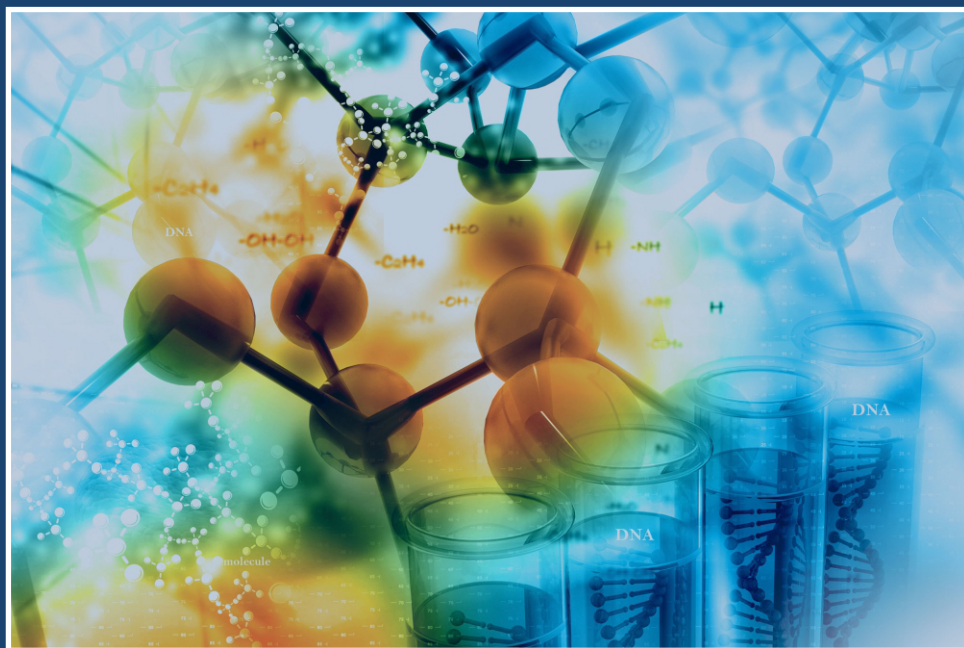


Том. 1



17 - 23.04.2023 (г. Краснодар)

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

Организационный комитет

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

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

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

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

Программный комитет

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

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

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

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

Локальный организационный комитет

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

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

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



**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ VII СЪЕЗДА БИОФИЗИКОВ
РОССИИ: в 2 томах, том 1 – Краснодар: Типография ФГБОУ
ВО «КубГТУ», 2023**

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

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

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

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

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

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

Партнеры VII Съезда биофизиков России:

Stormoff®



Кубанский государственный технологический университет
2023

Краткое оглавление

Краткое оглавление.....	3
Пленарные доклады	4
Молекулярная биофизика. Структура и динамика биополимеров и биомакромолекулярных систем.....	29
Биофизика клетки. Мембранные и транспортные процессы.....	135
Механизмы трансформации энергии. Биоэнергетика. Молекулярные моторы	211
Биомеханика. Биологическая подвижность.....	227
Биофизика сложных многокомпонентных систем. Математическое моделирование. Биоинформатика.....	262
Биофотоника. Фотобиология. Фотосинтез. Биолюминесценция. Фоторецепция. Оптогенетика	361
Полное оглавление	418
Авторский указатель.....	438

Пленарные доклады

Что такое сознание человека

Иваницкий Г.Р.^{1*}

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН. 142290, Московская обл. Пущино, Институтская ул. 3, Российская Федерация;
ivanitsky@iteb.ru

Показано, что одним из существенных результатов творчества людей в XXI веке стало создание андроидных роботов, снабженных искусственным интеллектом. Уровень совершенства этих роботов становится столь высоким, что по внешним признакам и по поведению установить их отличие от живых людей вскоре будет невозможно. Это приводит к логической ошибке ставить знаки равенства между людьми и креативными андроидными роботами, предполагая, что они имеют сознание. Существующие тесты А. Тьюринга и Дж. Сирла несостоятельны. Они расширяют понимание феномена сознания, но проблемы с его определением не исчезают. В докладе приводятся доказательства того, что приложение термина сознания к роботам может привести к серьезным последствиям, т.е. к подмене реального мира внешней среды виртуальным миром.

Литература

1. Zemskov E.P., Tsyganov M.A., Ivanitsky G.R. and Horsthemke W. Solitary pulses and periodic wave trains in a bistable FitzHugh-Nagumo model with cross diffusion and cross advection. *Physica Review E* 105.014207(2022)
2. Иваницкий Г.Р. "Неопределенности сравнения человека и андроидного робота" *Успехи физических наук* (2023), принята к публикации.
3. Иваницкий Г.Р. "Робот и Человек. Где находится предел их сходства?" *УФН* 188 965–991 (2018).
4. Иваницкий Г.Р. "Самоорганизующаяся динамическая устойчивость биосистем, далёких от равновесия" *УФН* 187 757–784 (2017)

Физические принципы организации 3D- структуры и динамики биополимеров

Шайтан К.В.^{1*}

¹Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия;
shaytan49@yandex.ru

Рассматриваются физические особенности химического строения линейных биополимеров, которые оказались важны с точки зрения формирования уникальных 3D- структур. Обсуждаются кинематические связи между узлами полимерной цепи и динамические эффекты вязкости, которые обеспечивают тенденцию к образованию различных спиральных структур.

Показано, что динамика фолдинга длинной полимерной (биополимерной) цепи в вязкой среде (жидкости) подчиняется двум экстремальным принципам:

- максимальной скорости потери потенциальной энергии и
- минимальной скорости диссипации энергии

Получены также правила для движения репрезентативной точки по многомерной поверхности потенциальной энергии:

- средние скорости изменения потенциальной энергии равномерно распределены по узлам цепи и
- средние скорости диссипации энергии также равномерно распределены по узлам цепи.

Эти статистические правила движения репрезентативной точки по многомерной поверхности потенциальной энергии [1] диктуют выбор наиболее плавных траекторий движения, что способствует преодолению парадокса Левинтала и достижению глобального минимума энергии за разумное время.

Предложен новый подход к изучению многомерных энергетических ландшафтов полимеров и биополимеров, основанный на принципах симметрии относительно перестановок в полимерной цепи одинаковых мономерных звеньев и топологии конфигурационного пространства макромолекул [2]. Анализ топографии энергетических ландшафтов макромолекул проводится с использованием теории Морса и разложения поверхности потенциальной энергии в многомерный ряд Фурье. В гауссовском приближении изучается эффект слабого нарушения симметрии относительно перестановки мономерных звеньев (например, за счет некоторой модификации боковых групп), что приводит к топографии энергетических ландшафтов с множеством вложенных энергетических воронок. В этом случае имеется самая глубокая центральная воронка и

менее глубокие сателлитные воронки, отделенные друг от друга энергетическими барьерами. Обсуждаемые топографии энергетических воронок соответствуют ряду эффектов, наблюдаемых в кинетике фолдинга белков. В частности, возникает вулканообразный профиль поверхности свободной энергии, чувствительность рефолдинга белков к способу денатурации (разворачиванию пространственной структуры), зависимость кинетики и результата фолдинга от области исходных конформаций цепи. Последнее может быть существенным для понимания механизмов котрансляционного фолдинга.

При вычислении топографии поверхности свободной энергии возникает характеристический температурный параметр T' , который определяется как выигрыш энергии при сворачивании цепи на одну конформационную степень свободы. Показано, что при температуре $T > 0,26T'$ пространственная структура глобулы разрушается. Параметр T' и температура денатурации в рассматриваемой системе вытекают из основных топологических и геометрических принципов для формирования энергетических ландшафтов в конфигурационном пространстве торсионных углов и соображений симметрии относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев. Отметим, что при температурах денатурации биополимеров около 60°C это соотношение приводит к оценке энергии невалентных связей мономеров около 2,5 ккал/моль на одну конформационную степень свободы, что очень похоже на водородные связи в полипептидах в водной среде.

Эффекты вязкости и симметрии относительно перестановки мономерных звеньев при определенных условиях могут действовать вместе. Возникающие эффекты могут представлять интерес с точки зрения физико-химической эволюции макромолекул в направлении образования пула линейных полимеров с уникальными пространственными структурами (мы полагаем, что они могут приводить к «стреле молекулярной дбиологической эволюции»).

Текст доклада проиллюстрирован результатами молекулярно-динамических расчетов и видеороликами процессов складывания различных типов линейных полимеров в вязких и невязких средах.

[1] Shaitan K.V. Variational Principles in the Mechanics of Conformational Motions of Macromolecules in a Viscous Medium. *Biophysics*, 63, 1(2018). DOI: 10.1134/S0006350918010165

[2] Shaitan K.V. Hidden Symmetry Effects in the Dynamics of Linear Polymers and Biopolymers. *Biophysics*, 67, 386(2022). DOI: 10.1134/S0006350922030204

Фемтосекундная лазерная спектроскопия и фемтосекундный лазерный микромашининг в биофизике

Надточенко В.А.^{1,3*}, Черепанов Д.А.^{1,2}, Семенов А.Ю.^{1,2}, Айбуш А.В.¹, Гостев Ф.Е.¹, Шелаев И.В.¹,
Титов А.А.¹, Осыченко А.А.¹, Залесский А.Д.¹, Мартиросян Д.Ю.¹, Сырчина М.С.¹

¹Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н.Семенова Российской академии наук, Косыгина 4, Москва, Россия, 119991;

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Ленинские горы 1 стр.40, Москва, Россия, 119991;

³Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Колмогорова, 1, Москва, Россия, 119991;
nadtochenko@gmail.com

Доклад посвящен применению фемтосекундного импульсного лазерного излучения для исследования быстропротекающих биофизических процессов в реакционных центрах фотосинтеза, для 2D и 3D химического картирования биологических клеток и тканей методами фемтосекундной рамановской микроскопии-спектроскопии и для фемтосекундной лазерной нанохирургии клеток, эмбрионов и биологических тканей.

Применение фемтосекундной лазерной спектроскопии к исследованию фотосистем ФС I и ФС II содержащих молекулы хлорофилла Chl d, Chl f позволило выявить новые особенности в механизме и кинетике преобразования кванта света в химически активные ион-радикальные состояния. Спектральные особенности Chl d и Chl f существенно отличные от Chl a, а также известные структурные данные о сайтах локализации Chl d и Chl f в фотосистемах позволили определить кинетику и последовательность элементарных актов переноса энергии и электрона в фотосистемах ФС I и ФС II.

Специфика фемтосекундных лазерных импульсов заключается в их высокой пиковой интенсивности и большой спектральной ширине. Первое обстоятельство позволяет эффективно наблюдать нелинейные оптические процессы, в т.ч. высоконаправленные когерентные процессы рамановского рассеяния: CARS (Coherent anti-Stokes Raman scattering), SRS (Stimulated Raman scattering). Второе обстоятельство позволяет одновременно получать спектральный диапазон колебательных частот образца в сотни обратных сантиметров.

По сравнению с традиционными рамановскими микроскопами использование созданного в ФИЦ ХФ РАН уникального фемтосекундного микроспектрометра имеет преимущества для следующих задач:

- В задачах где необходимо иметь максимально возможное пространственное разрешение при сканировании образца (до 200 нм). Такое разрешение достигается за счет нелинейности генерируемых оптических процессов в исследуемом образце.

- В задачах где определение рамановских частот в стоксовой области сильно затруднено. В этом случае в фемтосекундном микроспектрометре сигнал собирается из антистоксовой области (CARS), свободной от люминесценции образца.

- В задачах где необходимо максимально быстрое 2D/3D картирование в узком диапазоне колебательных частот (~10 1/см). Увеличение скорости сканирования до 3х порядков достигается за счет использования быстрых гальванических зеркал и ФЭУ. Данная конфигурация особенно подходит для тех образцов где нежелательны механические перемещения исследуемого образца. Для образцов с низкими концентрациями веществ или слабыми интенсивностями рамановских линий может быть использована спектральная фокусировка лазерных импульсов. А этом случае, сканируемый интервал колебательных частот может быть уменьшен до 2-3 1/см.

- В задачах, где необходимо быстрое 2D/3D картирование заданного диапазона колебательных частот (шириной до 1200 1/см) со спектральным разрешением 10 1/см. Скорость сканирования в десятки раз выше, чем в традиционных рамановских микроскопах.

Методика была апробирована в исследованиях:

- GFP белков, родопсинах, ксантофиллах, липидно-белковых смесях, пигмент-белковых комплексах (в т.ч. хлорофилл содержащих), оммохромах беспозвоночных.;

- Клеточных культур, срезах тканей животных и человека (печени, мозга, жировой ткани, липидные капли, липофузиновые гранулы).

- Живых биологических объектов: ооцитов, сперматозоидов, стволовых клеток.

Использование остросфокусированных фемтосекундных лазерных импульсов позволяет создавать микро- и наноразрезы в биологическом материале без теплового разогрева. Фемтосекундный лазер ближнего ИК диапазона; непрерывные лазеры видимого и ближнего ИК диапазона; оптический микроскоп с моторизованной 2D платформой; пространственные световые модуляторы света (SLM) позволяют проводить малоинвазивные микро- и нанохирургических операции, манипуляций с отдельными клетками, эмбрионами и тканями. Совместное использование непрерывного лазера и SLM позволяет получать сложные распределения электромагнитных полей в объеме образца, например, создавать множественные независимые лазерные фокусы. В частности, каждый из таких лазерных фокусов может представлять из себя оптическую ловушку для клеток или органелл клетки. При надлежащем выборе параметров эксперимента можно осуществлять удерживание, вращение или независимое перемещение данных объектов, в т.ч. растаскивание или сближение нескольких объектов одновременно (оптический мультиплексор). Это дает богатую информацию о силах между органеллами, упругих свойствах биологических образцов. Данная установка позволяет решать задачи:

- Лазерная диссекция тканей и клеток.

- Оптическая трансфекция (введение внешнего генетического материала в клетки через созданные в клеточной мембране каналы).

- Искусственное лазерное слияние двух или более клеток.

- Лазерная инактивация хромосом клетки.

- Терапевтическое лазерное клонирование.

- Изучение упругих свойств биообъектов на разных этапах развития; сил взаимодействия между отдельными частями биологической системы (органеллами, органеллами и мембранами и др.).

Развита принципиально новая технология и разработано необходимое материально-техническое оснащение для проведения минимально инвазивной нанохирургии эмбрионов млекопитающих с использованием лазеров с излучением в окне прозрачности биологической ткани. Разработана технология перспективна для получения генетически модифицированных доимплантационных эмбрионов млекопитающих.

Изучение белок-белковых взаимодействий методами молекулярного моделирования

Коваленко И.Б.^{1*}, Федоров В.А.¹, Хрущев С.С.¹, Ризниченко Г.Ю.¹, Рубин А.Б.¹

¹МГУ, биологический факультет;

ikovalenko78@gmail.com

В большинстве биологических систем белковые молекулы играют ключевую роль. С использованием методов рентгеноструктурного анализа и ядерного магнитного резонанса изучены пространственные структуры

множества разных белков и их комплексов. Однако, до сих пор остается невыясненным в деталях, в какой степени электростатические и гидрофобные взаимодействия влияют на скорость образования комплексов белков на различных этапах сближения молекул.

Образование белкового комплекса — это сложный многостадийный процесс, требующий учета множества факторов, таких как дальнедействующие электростатические взаимодействия между поверхностями белков, геометрическая и химическая комплементарность областей связывания, молекулярная подвижность в белок-белковом интерфейсе, гидрофобные взаимодействия. Нами разработан оригинальный подход, позволяющий, благодаря совместному использованию методов броуновской и молекулярной динамики, предсказать структуру образовавшегося комплекса и молекулярные механизмы, приведшие к его образованию. В данном подходе метод броуновской динамики используется для моделирования образования двумя белками столкновительного комплекса с учетом процессов диффузии и электростатических взаимодействий, а молекулярная динамика используется для моделирования трансформации предварительного комплекса в финальный с учетом подвижности атомов, конформационных изменений и молекул растворителя.

Данный подход позволил нам выявить роль электростатических и гидрофобных взаимодействий в образовании комплекса белков пластоцианина и цитохрома *f* в цианобактериях, зеленых водорослях и высших растениях, и показать, что их роль в формировании комплекса меняется вместе с эволюционными изменениями в белковых последовательностях.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - кандидатов наук МК-2931.2022.1.4.

Роль скоррелированных движений отдельных фрагментов белков в их функции: фотофизика цветных флуоресцентных белков

Савицкий А.П.^{1*}, Хренова М.Г.¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН;
apsavitsky@inbi.ras.ru

Флуоресцентные белки имеют достаточно жесткую структуру бета-бочонка, тем не менее локальная конформационная подвижность значительно влияет на их свойства. Так, например, скоррелированность движений отдельных фрагментов белка приводит к возможности цис-транс изомеризации хромофорной группы, а наличие разных конформеров боковых цепей отдельных остатков определяет скорость этих превращений. Изучение распределений геометрических параметров внутри хромофора, относящихся к альтернированию двойных и одинарных связей в системе позволяет судить о форме полосы поглощения и положении ее максимума, а по анализу динамического поведения С-О связи фенильного фрагмента хромофора можно судить о рКа этой группы. Таким образом, анализ динамических характеристик белков, получаемых из расчетов методами молекулярного моделирования, позволяет определять самые разнообразные свойства флуоресцентных белков.

От ДНК-белковых взаимодействий к пониманию функционирования геномов эукариот

Шайтан А.К.^{1*}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет;
alex@intbio.org

Прошло более 20 лет с момента расшифровки генома человека, но механизмы работы генома как целого пока остаются далеко неясными. Изначальный оптимизм, связанный с относительной простотой генетического кода и возможностью анализа генома как текста состоящего из линейной последовательности дискретных символов, столкнулся с осознанием того, что регуляторные функции в геноме осуществляются через сложную сеть трехмерных физических динамических взаимодействий между молекулами ДНК, РНК и белков. Атомистическая структура базового комплекса генома эукариот - нуклеосомы - была расшифрована более 25 лет назад. За последнее время наблюдается существенный прогресс в понимании динамики нуклеосом, структуре различных наднуклеосомных комплексов, влиянии динамики и модификаций нуклеосом на структуру хроматина. В конечном счете мы начинаем понимать, каким образом различные регуляторные и функциональные программы закодированы в геноме посредством тонкой настройки динамики взаимодействий между молекулами в хроматине. В докладе будет дан обзор современных представлений об устройстве

хроматина, сделан фокус на обсуждении увеличивающегося объема информации о взаимодействии нуклеосом с различными белками, продемонстрированы результаты, показывающие важность динамики нуклеосом в регуляции доступности ДНК для считывания транскрипционной машинерией. Работа поддержана грантом РНФ 18-74-10006 (<https://rscf.ru/en/project/18-74-10006/>).

Конденсация ДНК в бактериях

Крупянский Ю.Ф.^{1*}
¹ФИЦ ХФ РАН;
yurii@kru@gmail.com

ДНК организована в нуклеоиде активно растущей клетки иерархически с тремя уровнями компактизации ДНК: Нижний уровень (малый масштаб ≥ 1 кб п.о.) обеспечивается взаимодействием с гистоноподобными NAP белками. Активно растущие клетки поддерживают динамический, далекий от равновесия порядок благодаря метаболизму. При переходе клеток в покоящееся состояние (практически полное отсутствие метаболизма) обычные биохимические способы защиты ДНК перестают работать и клетки, адаптируясь к новым условиям, вынуждены использовать физические механизмы защиты ДНК. Проведено изучение структуры ДНК в нуклеоиде покоящихся клеток, образующихся при стрессе голодания, с помощью дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Экспериментальные результаты позволили визуализировать структуры нижнего иерархического уровня компактизации ДНК в нуклеоиде покоящихся клеток. Впервые проведенная серия дифракционных экспериментов свидетельствует о наличии периодической упорядоченной организации ДНК во всех изученных бактериях. ПЭМ позволила извлечь тонкую визуальную информацию о типе конденсации ДНК в нуклеоиде бактерии *Escherichia coli*. Обнаружены внутриклеточные нанокристаллические, жидкокристаллические и свернутые нуклеосомоподобные структуры ДНК. Свернутая нуклеосомоподобная структура наблюдалась впервые, она является результатом множественного сворачивания длинных молекул ДНК вокруг белка Dps и его ассоциатов. Обнаруженные нами различные типы конденсированного состояния ДНК в изучаемых покоящихся клетках *E. coli* (гетерогенность конденсации ДНК) дают дополнительные аргументы в пользу концепции, рассматривающей микробную популяцию, как многоклеточный организм. Проведено изучение изменений в архитектуре ДНК под влиянием химического аналога аутоиндуктора анабиоза 4-гексилрезорцина (4ГР). Рост концентрации 4ГР индуцирует переход части клеток популяции в анабиотическое покоящееся состояние, а затем и в мумифицированное состояние. Проведенные исследования структуры ДНК в анабиотическом и мумифицированном состояниях показывают спектроскопическую идентичность структуры ДНК в покоящемся анабиотическом состоянии и в покоящемся состоянии, образующемся при стрессе голодания. Исследования структуры ДНК в мумифицированном состоянии показывают сильное отличие от структуры ДНК в анабиотическом состоянии.

Стратегия лечения заболеваний, ассоциированных с возрастом

Глушкова О.В.^{1,2*}, Шарапов М.Г.¹, Парфенюк С.Б.¹, Лунин С.М.¹, Мубаракшина Э.К.¹, Хренов М.О.¹,
Кузкова А.А.^{1,2}, Новоселова Т.В.¹, Новоселова Е.Г.¹
¹ИБК РАН - ФИЦ ПНЦБИ РАН;
²Пуцинский государственный естественно-научный институт;
glushckova@mail.ru

Рост доли стареющего трудоспособного населения в России и в развитых странах сопровождается рядом экономических, социально-гигиенических и морально-этических проблем, что позволяет классифицировать старение и развитие заболеваний, ассоциированных с возрастом, как социально-значимую проблему. Известно, что важнейшим этапом старения организма млекопитающих и развития возраст-ассоциированных заболеваний является сенесценция клеток и накопление их в организме. Основными признаками сенесцентных клеток являются их необратимо утерянная способность делиться, повышенная устойчивость к апоптозу и способность секретировать провоспалительные факторы, формируя тем самым секреторный фенотип сенесцентных клеток (senescence-associated secretory phenotype / секреторный фенотип, ассоциированный со старением, SASP). Накапливаясь практически во всех тканях и органах, сенесцентные клетки способствуют паракринному старению организма. Недавно было показано, что элиминация стареющих клеток у мышей ослабляет прогресс

возраст-ассоциированных заболеваний, что привлекло повышенное внимание к этой новой геронтологической мишени. На сегодняшний день стратегией современной цитогеронтологии является поиск новых агентов, обладающих сенотерапевтической активностью. Одними из них являются соединения, называемые «сенолитиками», которые могут избирательно убивать стареющие клетки. Другая стратегия связана с возможностью нейтрализовать вредное воздействие SASP на стареющие клетки препаратами, называемыми «сеноморфными». Наиболее высоким потенциалом обладают комбинации ингибиторов ключевых противоапоптозных сигнальных путей сенесцентных клеток и антиоксидантов. Одними из перспективных сенолитиков на сегодня являются ингибиторы белков теплового шока 90 (HSP90). HSP90 являются регуляторами важнейших физиологических и патологических функций организма. Однако в случае сенесцентных клеток эти белки играют роль стимулятора паракринного старения, защищая сенесцентные клетки от апоптоза и потому могут являться мишенью сенолитической терапии. Сегодня известны ингибиторы HSP90, например, гелданамицин, панингинитор, связывающийся с белком на N-конце. Тем не менее, наличие изоформ этих белков – эндоплазматического Grp94, митохондриального TRAP1 и цитозольных α и β , предполагает изоформспецифическое различие функций. Даже цитозольные формы, несмотря на высокую гомологию, обладают рядом структурных и функциональных отличий, что позволило исследователям найти специфический ингибитор для HSP90 β (конституитивная форма). Так как самыми перспективными сенолитическими стратегиями на сегодняшний день являются комбинации сенолитических препаратов и антиоксидантов, в качестве природного антиоксиданта нами был предложен уникальный белок антиоксидант Prdx6, который был впервые выделен и охарактеризован в нашем институте. Этот белок способен действовать как антиоксидант, ограничивая окислительный стресс благодаря своей пероксидазной активности и участвовать в образовании окислителей за счет фосфолипазной. Это указывает на регулируемую роль этого фермента в окислительном стрессе. В настоящей работе мы исследовали перспективы сенолитического действия комбинации ингибиторов HSP90 и белка-антиоксиданта Prdx6. Исследования проводились как *in vitro*, на сенесцентных клетках линии 3T3/Balb (эмбриональные фибробласты), Raw 264.7 (моноцитарно-макрофагальная линия), RIN-m5F (бета-клетки поджелудочной железы) так и *in vivo*, на моделях возраст-ассоциированных заболеваний.

В докладе будут представлены результаты исследований о молекулярно-клеточных механизмах сенолитического действия предложенной композиции и обсуждены перспективы применения комбинации Prdx6 с ингибиторами HSP90 при разработке новых лекарств для лечения и профилактики возраст-ассоциированных заболеваний, таких как идиопатических легочный фиброз, хроническое воспаление, сопровождающее старение и сахарный диабет 2 типа. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-24-00041.

Вычислительная структурная биофизика термочувствительных ионных каналов семейства TRPV

Трофимов Ю.А.^{1,4}, Крылов Н.А.¹, Ефремов Р.Г.^{1,2,3*}

¹ИБХ РАН;

²НИУ ВШЭ;

³МФТИ;

⁴МИФИ;

r-efremov@yandex.ru

Понимание на молекулярном уровне механизма работы ионных каналов важно как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения - для разработки новых лекарственных препаратов и методов терапии ряда социально значимых заболеваний. Особый интерес в последние годы представляет изучение белков семейства TRPV (Transient Receptor Potential, Vanilloid type) – катионных каналов, экспрессирующихся преимущественно в сенсорных нейронах, чувствительных к изменениям температуры, pH, механическому напряжению и ряду химических агентов. Это обусловлено наличием определенных в экспериментах моделей пространственной структуры ряда представителей семейства TRPV, находящихся в различных функциональных состояниях – открытом, сенситизированном, закрытом и т.д. Важную информацию об особенностях работы каналов TRPV дают методы компьютерного моделирования, позволяя на основе экспериментально полученных моделей оценить тонкие детали их конформационной динамики, проанализировать эволюцию физико-химических свойств их поровых доменов, роль отдельных молекул связанных липидов и т.д. Результаты вычислений способствуют выявлению на атомарном уровне взаимосвязи указанных характеристик каналов разных типов с параметрами их работы в клетке. В докладе представлены результаты моделирования *in silico* ряда белков из семейства TRPV, находящихся в нескольких функциональных состояниях и встроенных в гидратированные липидные бислои, имитирующие клеточную мембрану. В качестве основных методов вычислительного

эксперимента использовали расчеты молекулярной динамики в полноатомном представлении, а также оригинальные компьютерные технологии картирования и визуализации физико-химических свойств белок-мембранных систем. Полученные результаты существенно дополняют информацию, получаемую на основании структурных моделей, установленных с помощью экспериментальных подходов. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 19-74-30014).

Доставка биологически активных веществ в компартменты живой клетки: достижения, проблемы и перспективы

Соболев А.С.^{1,2*}

¹*Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова;*

²*Институт биологии гена РАН;*

alsobolev@yandex.ru

Доклад суммирует результаты работ последних 4-х лет по созданию полипептидных средств доставки различных биоактивных веществ в заданные компартменты клеток-мишеней – модульных нанотранспортеров (МНТ). Принцип, положенный в основу дизайна МНТ – использование естественных процессов клеточного транспорта. Основные группы доставляемых биоактивных веществ – это 1) антителомиметики (монободы, нанободы и пр.), нацеленные на определенные внутриклеточные молекулы, и 2) цитотоксические агенты (радионуклиды, испускающие частицы с коротким пробегом). Приведены результаты экспериментов по блокировке в живой клетке факторов транскрипции и/или их ингибиторов (на примере Nrf2, Keap1, c-Myc) или вирусных белков (нуклеокапсидного N-белка вируса SARS-CoV-2) с помощью специфических антителомиметиков, доставляемых в клетки с помощью МНТ [1-4]. Описываются также результаты применения МНТ с антителомиметиками для узнавания клеток-мишеней, доставляющими в ядра этих клеток радионуклид In-111 – эмиттер электронов Оже [5]. Такие варианты МНТ уже вполне могут использоваться как инструменты для исследования функций живых клеток. Задача, ждущая своего решения, – разработка варианта МНТ для системного введения в организм.

Работа поддержана грантом РНФ № 22-14-00094.

1. Y. V. Khramtsov et al., Doklady Biochem. Biophys., 2022, 503, 90-92.
2. A. V. Ulasov et al., Life Sci., 2022, 291, 120111.
3. A. S. Sobolev, Acta Naturae, 2020, 12, 47-56.
4. Y. V. Khramtsov et al., Pharmaceutics, 2023, 15, 21.
5. T. S. Karyagina et al., Front. Pharmacol. 2020, 11, 176

Физико-химия монооксида азота и его соединений как детерминант их биологического действия

Ванин А.Ф.^{1*}

¹*Институт химической физики им. Н.Н.Семенова Российской академии наук;*

vanin.dnic@gmail.com

Решающим физико-химическим фактором, определяющим способность монооксида азота (оксида азота-NO) выступать во всех живых организмах в качестве универсального регулятора биологических процессов, является способность молекул NO связываться попарно с ионами двухвалентного железа с последующей реакцией диспропорционирования и образованием динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами. Включение NO в эти комплексы обеспечивает его защиту от губительного действия на него ионов супероксида и тем самым возможность переноса молекул NO внутри и между клетками и тканями (паракринное действие NO). Кроме того, это включение приводит к превращению половины этих молекул в ДНКЖ в катионы нитрозония (NO⁺). Таким образом ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами могут выступать в живых организмах в качестве доноров NO и NO⁺. Молекулы NO ответственны (преимущественно) за положительное (регуляторное) действие ДНКЖ, тогда как катионы нитрозония определяют, в основном, за их негативное (цитотоксическое) действие на биосистемы. Будут приведены примеры положительного действия ДНКЖ на животных и человека (антигипертоническое действие, ускорение заживления ран и др.). Что касается

негативного действия этих комплексов на биосистемы, в качестве примера этого в докладе будет рассмотрена способность ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами подавлять размножение бактерий, вирусов (в частности коронавируса Covid-19), эндометриом и злокачественных опухолей.

Перспективные ядерно-физические методы бинарной протонной терапии

Завестовская И.Н.^{1,2*}

¹Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН;

²НИЯУ МИФИ;

zavestovskayain@lebedev.ru

Доклад посвящен обзору работ по проекту «Разработка новых технологий диагностики и лучевой терапии социально значимых заболеваний протонными и ионными пучками с использованием бинарных ядерно-физических методов», реализуемого в ФИАН совместно с НИЯУ МИФИ и НМИЦ радиологии МЗ РФ по соглашению с Минобрнауки в рамках ФНТП «Развитие синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019-2027 гг.».

Несмотря на значительный прогресс в диагностике, лечении и профилактике онкологических заболеваний, достигнутый в настоящее время, эти заболевания остаются серьезной угрозой для человечества и являются второй основной причиной смертности в мире. Лучевая терапия является эффективным методом лечения онкологических заболеваний различных патологий. К высокотехнологичным и перспективным методам лучевой терапии относится адронная терапия - радиотерапия с использованием пучков частиц, таких как нейтроны, протоны, альфа-частицы, заряженные ионы и др. Наибольшее развитие в мире среди технологий адронной терапии получила протонная и ионная терапия. Это обусловлено фундаментальными свойствами взаимодействия протонных и ионных пучков с веществом, которые позволяют получить уникальные характеристики глубинного распределения поглощенной дозы адронов. Протоны и ионы быстро теряют энергию на последних нескольких миллиметрах проникновения в ткани, что дает ярко выраженный максимум дозового распределения (пик Брэгга) в локализованной области, которую можно регулировать по глубине, изменяя начальную энергию протонного пучка. Пик Брэгга может быть точно локализован в любом месте тела пациента за счет выбора энергии протонов, а несколько пиков Брэгга могут быть смещены по глубине для создания распределенного пика Брэгга, который и используется для облучения патогенной области. Данное преимущество можно использовать как для достижения тумороцидных значений дозы и ее высококонформную доставку, так и для значительного снижения доз в нормальных тканях, проксимальных и дистальных по отношению к мишенному объему.

Комплекс протонной терапии (КПТ) «Прометеус», на котором ведутся работы в проекте, представляет собой компактный протонный синхротрон, способный ускорять протоны в диапазоне значений энергии 30–330 МэВ. По своим характеристикам установка значительно превосходит ведущих мировых лидеров: малая масса (15 т), низкое энергопотребление (до 100 кВт) и компактные размеры (внешний диаметр – 5 м) позволяют размещать комплекс в обычных больницах, не возводя отдельные здания. Шаг выбора энергии на ускорителе составляет 0,1 МэВ, что делает возможным планирование процедуры облучения в направлении распространения пучка с субмиллиметровой точностью. При этом размер пучка в ортогональной плоскости составляет не более 3 мм при энергии пучка 150 МэВ, одной из наиболее часто используемых для облучения энергий. В проекте предусмотрена разработка, апробация и внедрение перспективных технологий лучевой терапии на модернизированном КПТ «Прометеус»:

- Разработка фундаментальных основ новых бинарных технологий протонной терапии на основе адресных технологий с использованием перспективных наночастиц, нанокompозитных материалов и многофункциональных систем на их основе в качестве радиосенсибилизаторов терапии и/или активных агентов для визуализации.

- Разработка фундаментальных основ новых технологий лучевой терапии на основе сочетанного действия редко-ионизирующего (протонного) и плотно-ионизирующего (нейтронного/ионов углерода) излучений, позволяющих создать высокий градиент доз между опухолевыми и нормальными тканями, и одновременно с этим, увеличить повреждающий эффект (в том числе, радиорезистентных опухолей) за счет воздействия ионов углерода/нейтронов, обладающих высокой относительной биологической эффективностью (ОБЭ).

- Математическое моделирование процессов, определяющих эффективность лучевых терапий: динамики изменения размеров и возможного движения опухоли в процессе облучения, режимов облучения (фракционирование, модулирование интенсивности, сенсибилизация наночастицами и др.) и пространственно-временного изменения радиочувствительности опухолевых клеток.

- Разработка на базе протонного синхротрона Физико-технического центра (ФТЦ) ФИАН метода протонной радиографии и томографии, позволяющего определять длину пробега протонов внутри тела пациента с миллиметровой и субмиллиметровой точностью и значительно повысить контраст изображения и тем самым существенно увеличить эффективность использования протонной терапии.

- Разработка технологий протонной и ионной терапии, учитывающих во время проведения сеанса протонной терапии движение и смещение опухоли и внутренних органов, возникающих из-за сердцебиения и дыхания или произвольных движений пациента, на основе сравнительного анализа различных методов облучения интрафракционно движущихся опухолей брюшной и грудной областей при проведении исследований на динамическом водном фантоме.

- Усовершенствование и модернизация протонного синхротрона ФТЦ ФИАН – комплекса протонной терапии (КПТ) «Прометеус» на основе решения поставленных в проекте крупных прикладных задач и разработанных в проекте технологий.

Новые технологии протонной терапии позволят дать конкретные рекомендации медицинскому сообществу, нацеленные на повышение эффективности протонной терапии.

Роль трипептида глутатиона в редокс-зависимой регуляции функционирования белков

Петрушанко И.Ю.^{1*}

¹ИМБ РАН;

irina-pva@mail.ru

В докладе рассмотрена роль внутриклеточного глутатиона в редокс-зависимой регуляции функционирования белков в различных клетках при физиологических и патологических условиях. Трипептид глутатион является основным низкомолекулярным тиолом клеток животных. В норме в клетках преобладает восстановленная форма глутатиона (GSH). Содержание GSH в клетках составляет 5-10 мМ, в то время как концентрация окисленной формы глутатиона (GSSG) в 100 раз ниже. Однако в условиях окислительного стресса соотношение GSH/GSSG может снижаться до 1. Редокс-потенциал данной редокс-пары фактически определяет внутриклеточный редокс-потенциал [1]. Глутатион вовлечен во множество редокс-зависимых процессов, являясь субстратом для глутатион пероксидаз, а также сам непосредственно участвуя в реакциях нейтрализации радикалов и модификации белков. Глутатионилирование белков – присоединение глутатиона к тиоловой группе белка с образованием дисульфидного мостика. Данная редокс-зависимая модификация защищает группы белка от необратимого окисления и способна изменять его функционирование, что играет важную роль при адаптации клеток к различным условиям.

Особенности регуляции функционирования белков глутатионом рассмотрены на примере Na,K-АТФазы, обеспечивающей поддержание трансмембранного градиента натрия и калия, и гемоглобина – основного белка эритроцитов, транспортирующего кислород.

Нами было показано, что каталитическая субъединица Na,K-АТФазы подвергается регуляторному и базальному глутатионилированию [2-4]. Регуляторное глутатионилирование реализуется в ответ на изменение редокс-статуса клеток, при окислительном стрессе и гипоксии, и приводит к ингибированию транспортной активности или изменению рецепторной функции фермента [2,3]. Установлены остатки цистеина, подвергающиеся регуляторному глутатионилированию, и ответственные за изменение транспортной и рецепторной функции белка [3]. При восстановлении нормальных редокс-условий происходит деглутатионилирование регуляторных остатков цистеина, и белок восстанавливает свою функциональность. Показано, что причиной ингибирования Na,K-АТФазы при глутатионилировании является нарушение связывания АТФ. Установлено, что глутатионилирование является причиной ингибирования Na,K-АТФазы при гипоксии и играет важную роль в адаптации клеток к недостатку кислорода, предотвращая истощение клеток по АТФ [2,3]. Выявлено, что индукция глутатионилирования Na,K-АТФазы с помощью производных глутатиона позволяет снизить повреждение клеток и продлить время нормальной сократимости кардиомиоцитов [5]. Нарушение рецепторной функции Na,K-АТФазы к кардиотоническим стероидам [3] связано с тем, что нарушается интерфейс взаимодействия между глутатионилированной Na,K-АТФазой и Src-киназой. Доступность цистеинов для регуляторного глутатионилирования зависит от конформации Na,K-АТФазы [6].

Базальное глутатионилирование Na,K-АТФазы – глутатионилирование остатков цистеина, которые недоступны в нативном ферменте, происходит при синтезе белка и наблюдается при длительном изменении редокс-условий, например, в условиях длительной гипоксии [4]. Найдены остатки цистеина, способные подвергаться базальному глутатионилированию. Роль базального глутатионилирования до конца не ясна, вероятно, оно может изменять стабильность белка и служить своеобразным маркером того, в каких редокс-условиях происходил его синтез.

В случае кислород-транспортирующего белка гемоглобина (Hb) важную роль в регуляции функции белка играет не только глутатионилирование остатков цистеина, но и образование нековалентного комплекса с GSH. Известно, что глутатионилирование приводит к возрастанию сродства Hb к кислороду [7]. Уровень глутатионилирования Hb растет при различных стрессовых воздействиях, и, вероятно, эта модификация является адаптационной, позволяющей частично компенсировать недостаток кислорода при стрессах. Недавно нами было установлено, что Hb способен формировать комплекс с GSH и образование этого комплекса зависит от оксигенации Hb [8]. Оксиформа Hb обладает большим сродством к глутатиону и может связывать четыре молекулы GSH, в то время как дезоксиформа способна связать только две молекулы GSH. Было установлено, что частичная диссоциация GSH от дезокси-Hb лежит в основе наблюдаемого возрастания уровня GSH в эритроцитах в условиях гипоксии [8]. Данное возрастание уровня GSH может играть важную роль в защите эритроцитов от окислительного стресса, развивающегося в тканях при недостатке кислорода. Поскольку в комплексе с GSH возрастает сродство Hb к кислороду, можно полагать, что образование данного комплекса играет также регуляторную роль [8]. Было выявлено, что образование комплекса GSH:Hb приводит к дестабилизации структуры и изменению в гемовой части белка, в то время как глутатионилирование Hb оказывает влияние на вторичную структуру гемоглобина.

Также рассмотрена роль глутатиона в редокс-зависимой регуляции эритроцитов при различных стрессовых воздействиях, в злокачественных клетках, клетках гематоэнцефалического барьера, нейрональных клетках и бактериях.

Полученные данные свидетельствуют о том, что глутатион является важным регулятором редокс-статуса клетки и способен существенно изменять функционирование белков вследствие глутатионилирования белков или путем образования нековалентного комплекса с белками, что играет важную роль в адаптации клеток к внешним воздействиям.

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

1. Schafer F.Q. and G.R. Buettner, Free Radic. Biol. Med. 2001; 30: 1191–1212.
2. Petrushanko IY. et al. J Biol Chem. 2012; 287(38): 32195-205.
3. Petrushanko IY et al. Redox Biol. 2017; 13: 310-319.
4. Mitkevich VA et al. Oxid Med Cell Longev. 2016: 9092328.
5. Poluektov YM et al. Sci Rep. 2019; 9(1):4872.
6. Poluektov YM et al. Biochem Biophys Res Commun. 2019; 510(1):86-90.
7. Metere A. et al. Antioxidants & redox signaling. 2014; 20 (3): 403-416.
8. Fenk S et al. Redox Biol. 2022; 58:102535.

Генетические механизмы, приводящие к атаксии

Rodríguez-Labrada R.^{1*}, Velazquez-Perez L.¹, Барышев М.Г.³, Hernandez-Caceres J.¹, Свидлов А.А.^{2,3},
Джимак С.С.^{2,3}, Дроботенко М.И.²

¹*Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias;*

²*Кубанский государственный университет;*

³*Южный научный центр РАН;*

roberto.rodriguez@cneuro.edu.cu

Спинно-мозжечковая атаксия типа 2 характеризуется генетическими расстройствами, связанными с прогрессирующей недостаточной координацией ходьбы, речи, и движений глаз, которые охватывают различные области мозжечка. Общая превалентность примерно 5-7 больных на 100 тыс. душ населения, но в некоторых районах, как муниципалитет Багуанос на востоке Кубы, достигает 142/100 тыс. – самая высокая во всем мире. Мутация, связанная с болезнью – это нестабильная экспансия полиглутаминового домена белка атаксина (вызванная наличием CAG-вставок в соответствующем гене). Длина CAG-вставки сильно влияет как на возраст появления симптомов, так и на тяжесть болезни [1].

Экспансия CAG-вставок приводит к нарушению белковой функции, а также к нейродегенерации. Функции атаксина-2 мало изучены. По-видимому, белок участвует в метаболизме РНК, и в регуляции трансляции. В частности, эффект проскальзывания полимеразы во время считывания в районе CAG-вставок был предложен как важный патофизиологический механизм [2].

В рамках угловой математической модели динамики ДНК [3,4] исследовано влияние торсионного воздействия, локализованного в промоторной области молекулы ДНК ATXN2, на возникновение зон открытых состояний (ОС).

Установлено, что величина внешнего торсионного воздействия, приводящего к возникновению ОС, зависит от длины CAG-вставки и уменьшается с увеличением длины вставки. Таким образом, при достаточно

большой длине CAG-вставки даже небольшое увеличение торсионного воздействия, необходимого для возникновения ОС в промоторной области, может привести к почти одновременному возникновению зоны ОС в области кодирования белка, расширяющейся в направлении промоторной области. Этот процесс может привести к сбою при считывании генетической информации.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Минобрнауки РФ № FZEN-2023-0006.

Литература

1. Velázquez Pérez L. et al. Molecular epidemiology of spinocerebellar ataxias in Cuba: Insights into SCA2 founder effect in Holguin. *Neuroscience Letters* 2009, 454, P. 157–160. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.03.015>
2. Krasilnikov A., Panyutin I., Samadashwily G., Cox R., Y. Lazurkin, Mirkin S. Mechanisms of Triplex-Caused Polymerization Arrest. *Nucleic Acids Research* 1997, 25(7), P. 1339–1346. <https://doi.org/10.1093/nar/25.7.1339>
3. Dzhimak S., Svidlov A., Elkina A., Gerasimenko E., Baryshev M., Drobotenko M. Genesis of Open States Zones in a DNA Molecule Depends on the Localization and Value of the Torque. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 4428. <https://doi.org/10.3390/ijms23084428>
4. Basov A., Drobotenko M., Svidlov A., Gerasimenko E., Malyshko V., Elkina A., Baryshev M., Dzhimak S. Inequality in the Frequency of the Open States Occurrence Depends on Single 2H/1H Replacement in DNA. *Molecules* 2020, 25, 3753. <https://doi.org/10.3390/molecules25163753>

Информатика на основе нанобиоэлектроники

Лахно В.Д.^{1*}

¹ИМПБ РАН - филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН;

lak@impb.ru

Биоинформатика, как раздел информатики, представляет собой область, которая развивает методы и программное обеспечение для анализа и обработки биологических данных и включает в себя анализ последовательностей, экспрессию генов и белков, анализ клеточной организации, создание Дата-центров и т. д. Новым и более общим направлением является рассмотрение биоинформатики как информатики, основанной на биокомпьютерных технологиях.

Молекула ДНК представляет собой уникальный пример хранилища данных и может быть использована для биокомпьютинга. Совершая одновременно миллионы операций ДНК-биокомпьютер позволяет экспоненциально увеличивать производительность с увеличением числа олигонуклеотидов. Ограничение производительности такого биокомпьютера обусловлено ограничением скорости проведения параллельных операций, измеряемых часами. Преодолеть эти ограничения призвана нанобиоэлектроника.

Центральной проблемой нанобиоэлектроники является реализация эффективного переноса заряда в биомакромолекулах. Наиболее перспективной для осуществления такого переноса является молекула ДНК. Компьютерное моделирование такого переноса в настоящее время способно заменить натурный эксперимент. Приведены результаты моделирования транспорта заряда в форме блоховских осцилляций, солитонного переноса, поляронной и бризерной динамики. Рассматриваются вопросы моделирования заряда при конечных температурах. Обсуждаются различные молекулярные устройства на основе ДНК. Их реализация создаст прочную основу для решения задач информатики на биомолекулярной основе.

Список литературы:

1. Lakhno V.D., DNA Nanobioelectronics, *Int. J. Quantum Chem.*, 2008, v.108, p. 1970-1981
2. Lakhno V.D., Theoretical basis of Nanobioelectronics, *EPJ Web of Conferences*, 2020, 226, 01008
3. Lakhno V.D., Vinnikov A.V., Molecular devices based on DNA, *MBB*, 2021, v. 16, p. 115-135

Биоинформатика и хемоинформатика в репозиционировании лекарств. Уроки пандемии COVID-19

Поройков В.В.^{1*}

¹Институт биомедицинской химии;

vvp1951@yandex.ru

Пандемия новой коронавирусной инфекции оказывает значительное влияние на все аспекты деятельности человечества. За истекшие три года научные знания о SARS-CoV-2 и течении инфекционного процесса COVID-

19 существенно расширились. Расшифрован геном вируса, установлены некоторые функции вирусных белков и определенные механизмы их взаимодействия с клетками человека, накоплены клинические данные о патогенезе и особенностях симптоматики у различных групп пациентов. Разработана стратегия широкого применения диагностических тест-систем и вакцинации населения, что позволило персонализировать и повысить эффективность клинических подходов к терапии заболевания.

Соблюдение санитарно-гигиенических рекомендаций и вакцинопрофилактика ограничивают распространение вируса в популяции, однако появление новых мутантных штаммов SARS-CoV-2 с повышенной вирулентностью снижает эффективность профилактических мероприятий. Недостаток знаний о патофизиологии вируса SARS-CoV-2 и механизмах развития патологического процесса требует дальнейшего проведения фундаментальных и поисковых биомедицинских исследований, определения основных клеточных и молекулярных мишеней поражения тканей и органов, поиска новых средств лечения и профилактики коронавирусной инфекции.

Репозиционирование лекарств – выявление новых показаний у разрешенных к медицинскому применению лекарственных препаратов – является единственно возможным оперативным ответом на пандемию COVID-19 и будущие биогенные угрозы. Наличие информации о фармакологических и токсикологических характеристиках известного препарата обеспечивает условия для его быстрого применения по новой нозологии. Поиск новых фармакологических эффектов у известных лекарств проводят *in silico* и *in vitro*. Компьютерные оценки получают путем моделирования взаимодействия анализируемых соединений с молекулярными мишенями, идентификацией аналогов на основе структурного сходства, анализом зависимостей «структура-активность», установлением ассоциаций методами сетевой фармакологии. Отбор потенциально активных соединений проводят путем виртуального скрининга *in silico*, с последующей экспериментальной валидацией компьютерных предсказаний *in vitro*. Определение антикоронавирусной активности *in vitro* осуществляют с использованием биохимических и клеточных модельных систем. Корреляция между результатами исследований, полученных *in silico*, в биохимических и клеточных тест-системах *in vitro*, и на экспериментальных животных *in vivo* невысока, что объясняется отсутствием стандартизации применяемых тест-систем и препаратов сравнения, которые могут быть использованы для соответствующей валидации.

С целью эффективного использования полученной в 2020-2023 г.г. информации мы ведем разработку портала Анти-COVID-19 (<https://way2drug.com/anticovidinfo/>) по репозиционированию лекарств для терапии SARS-CoV-2/COVID-19. На портале представлена информация о механизмах развития патологического процесса при COVID-19, влиянии этой инфекции на биологические процессы в организме, о фармакологических мишенях терапевтического воздействия, об антикоронавирусных препаратах, применяемых для лечения заболевания, а также об исследованиях с целью репозиционирования лекарств для терапии COVID-19.

Для оценки *in silico* характеристик репозиционируемых лекарств и новых фармакологических веществ реализованы веб-сервисы, обеспечивающие поиск структурных аналогов активных соединений среди 4000 разрешенных к медицинскому применению препаратов, прогноз антикоронавирусного действия, побочных эффектов и токсичности для планируемых к синтезу молекул, и т.д.

Анализ доступных экспериментальных данных по тестированию *in vitro* антикоронавирусной активности известных лекарственных препаратов позволил установить приоритеты для их дальнейшего исследования. Тремя коллективами из Института полиомиелита, ИОХ и ИБМХ, независимо было проведено молекулярное моделирование взаимодействия пятнадцати препаратов (дисульфирам, омепразол, силибинин, саквинавир, монтелукаст, иматиниб, атазанавир, дазатиниб, ципрофлоксацин, глицирризиновая кислота, дигидрохверцетин, нарлапревир, тейкопланин, бедаквилин, доксозонин) с главной протеазой 3CLpro SARS-CoV-2. В Институте полиомиелита установлено наличие антикоронавирусной активности для нарлапревира ($IC_{50}=2,75$ мкМ, $EC_{50}=64$ мкМ, $CC_{50}=106$ мкМ). Иматиниб ингибировал репликацию вируса в клеточной культуре с $EC_{50} = 40,0$ мкМ, однако был практически неактивен по отношению к главной протеазе 3CLpro.

В марте 2020 года был объявлен международный проект с целью виртуального скрининга потенциальных анти-SARS-CoV-2 соединений «JEDI Billion Molecules Against COVID-19 Grand Challenge» (<https://www.jedi.foundation/covid19challenge>). Участникам проекта было предложено провести скрининг *in silico* потенциальных антикоронавирусных соединений среди не менее чем 1 млрд доступных для синтеза и тестирования структур, по отношению к трем или более молекулярным мишеням, тремя независимыми компьютерными методами, и представить список из 10 тысяч наиболее вероятных «кандидатов» для проведения синтеза и биологического тестирования. Принявшие участие в проекте 130 коллективов из разных стран мира предложили для синтеза и тестирования 639024 «хитов»; 820 соединений синтезировано и протестировано; найдено 28 «активных» (процент «успеха» 3,19%). Нами был проведен скрининг *in silico* среди 1,08 млрд структур на 4 мишени (3CLpro, PLpro, RdRp, TMPRSS2); отобрано 10 тысяч «хитов»; мы вошли в число 20 коллективов, предложения которых отобраны для экспериментальной проверки; 36 молекул синтезировано; активность одной молекулы (ингибирование PLpro) подтверждена в эксперименте.

В докладе обсуждаются возможности и ограничения репозиционирования лекарств в условиях пандемии COVID-19 и пути для снижения опасности новых биогенных угроз в будущем.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№ 122022800499-6).

Вода как сенсор слабых воздействий на биологические системы

Лобышев В.И.^{1*}

¹МГУ, физический факультет;

lobyshev@yandex.ru

Представлен анализ проблемы, которая долго неоднозначно принимается научным сообществом. Стимулирующее влияние слабых воздействий на биологические системы разнообразных химических и физических факторов, ингибирующих эти системы при больших концентрациях или дозах, было обнаружено очень давно. Первые эксперименты, показывающие в малых дозах стимулирующее влияние различных химических соединений на развитие разнообразных биологических объектов, были опубликованы еще в конце XIX века. Этот феномен был назван гормезисом. Позднее стимулирующее воздействие аналогичного характера было обнаружено и для ионизирующего излучения и было названо радиационным гормезисом. На различных биологических моделях было показано, что, зависимость ответа на уменьшающуюся концентрацию активного вещества или дозу облучения имеет немонотонный характер и может характеризоваться несколькими экстремумами. При исследовании действия слабых неионизирующих электромагнитных полей также были обнаружены немонотонные эффекты, зависящие от интенсивности и частоты электромагнитных полей, в том числе естественного происхождения. Со второй половины 1970-х годов появляется нарастающий поток работ в которых исследуется широкий диапазон концентраций действующих биологически активных веществ на различные функции биологических и модельных систем. Более того, исследования физико-химических характеристик водных растворов в области малых и сверхмалых концентраций, проведенные в нашей стране и за рубежом, убедительно показывают появление аналогичных закономерностей. Качественной сходство биологических ответов на слабые воздействия различной природы, а также неклассическое проявление физико-химических свойств разбавленных растворов вынуждает к поиску единой причины наблюдаемых эффектов, вероятным кандидатом которой является вода.

Можно считать уже надежно установленным, что неклассическое поведение разбавленных водных растворов связано с образованием мезочастиц размером порядка сотни нанометров. Во многих случаях образование мезочастиц не наблюдается при выдерживании образцов водных растворов в условиях ослабленного магнитного поля Земли. Нами впервые была показана высокая корреляция между физическими характеристиками сильно разбавленных растворов и биологическим откликом одноклеточных, что было затем подтверждено другими исследователями. Наблюдаемые эффекты выходят за рамки классических представлений о растворах, что приводит к необходимости внимательного изучения свойств воды. В действительности реальная вода даже в лабораторных условиях является раствором и практически всегда неравновесна, что подробно описано в [1]. Природа гетерогенности разбавленных водных растворов и состав регистрируемых мезочастиц все еще не ясны. Наиболее вероятным кандидатом на эту роль являются нанопузырьки или их комплексы, стабилизированные ионами, находящимися в растворе [2]. Спонтанное или индуцированное внешними механическими и другими воздействиями схлопывание этих пузырьков влечет за собой эффекты кумуляции энергии в малом объеме, приводящие к высокоэнергетическим процессам. В результате генерации электронов появляются активные формы кислорода, азота, углекислого газа, регистрируемые в эксперименте даже при выдерживании воды при повышенной температуре [3]. Инициаторами таких процессов могут также служить источники естественного ионизирующего излучения на Земле. Как пример, появления активных форм кислорода регистрируются в виде повышенного содержания перекиси водорода в поверхностных водах океана и в изменении окислительно-восстановительного потенциала в микрокаплях тумана и облаков [4]. Ясно, что в присутствии биологически активных веществ в растворе будут происходить еще более сложные химические процессы существенные для живых организмов и модельных систем.

Технология приготовления растворов малых и сверхмалых концентраций предполагает итерационную процедуру разбавления раствора с последующим интенсивным механическим воздействием. Измерения высокочастотного импеданса свидетельствуют о немонотонном сложном изменении электропроводности растворов с увеличением числа итераций разбавления. Качественный характер немонотонной зависимости сохраняется при степенях разбавления, при которых понятие концентрации теряет смысл. Этот результат подкрепляется экспериментом, в котором была использована эта технология разбавления воды первого класса без добавления каких-либо веществ. В результате была получена аналогичная немонотонная зависимость электропроводности от числа итераций разбавления [5]. Полученные и частично описанные результаты

свидетельствуют о процессах самоорганизации в сложной неравновесной системе, называемой вода и преобразующей слабые воздействия разной природы в активные химические соединения.

1. В.И. Лобышев. Биологическая активность растворов веществ в малых и сверхмалых концентрациях. Биофизика, 2022, том 67, №4, с.658-670. DOI: 10.31857/S0006302922040044
2. Бункин Н.Ф., Бункин Ф.В. Бабстонные структуры воды и водных растворов электролитов. УФН, 2016, т.186, №9, с. 933-952
3. Bruskov V.I., A. V. Chernikova A.V., Ivanova V.E., Karmanova E.E., and S. V. Gudkov S.V. Formation of the Reactive Species of Oxygen, Nitrogen, and Carbon Dioxide in Aqueous Solutions under Physical Impacts, Physics of Wave Phenomena, 2020, Vol. 28, No. 2, pp. 103–106
4. Xu Yuan, Dongmei Zhang, Chiyu Liang, and Xinxing Zhang. Spontaneous Reduction of Transition Metal Ions by One Electron in Water Microdroplets and the Atmospheric Implications. Journal of the American Chemical Society. Article ASAP, 2023. DOI: 10.1021/jacs.3c00037
5. V. I. Lobyshev, Evolution of High-Frequency Conductivity of Pure Water Samples Subjected to Mechanical Action: Effect of a Hypomagnetic Field. Physics of Wave Phenomena, 2021, Vol. 29, No. 2, pp. 98–101, 2021

Основа метаболизма – транспорт орто-пара спиновых изомеров H₂O по аквапориновым каналам сквозь мембраны

Першин С.М.^{1*}

¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991 Москва, Россия;
pershin@kapella.gpi.ru

Известно, что метаболизм, как процесс, отражает транспорт веществ в организме, главным из которых является вода из-за большой массовой доли: мозг, сердце, легкие ~80%, кровь ~90%. Физически ясно, что наиболее критическим местом транспорта воды в организме являются мембраны с аквапориновыми каналами, которые пропускают только молекулы H₂O со скоростью 3Е9 молекул/с. Напомним здесь, что молекулы H₂O отличаются ориентацией спинов протонов и являются орто- и пара-изомерами. При этом орто-H₂O имеют магнитный момент (спины параллельны) и всегда вращаются. Напротив, пара-H₂O - не магнит (спины антипараллельны) и часть из них не вращается в соответствии с распределением Больцмана по вращательным состояниям. Открытие аквапориновых каналов (Peter Agre) было отмечено 20 лет назад нобелевской премией [1]. Заметим, что аквапориновый канал имеет диаметр ~0.3 нм при размере молекулы H₂O ~0.28 нм и дипольный ключ в середине (Рис.1). Несмотря на эти факторы, каналы мембраны почки человека могут пропустить до 200 литров воды за сутки [1]. Однако Р. Agre et al. [2] отмечает, что остаётся неясным механизм образования цепочки из мономеров H₂O внутри канала с разрывом водородных связей в окрестности дипольного ключа (Рис.1, нижняя панель). Совокупность данных, полученных за две декады в разных научных центрах, дают нам обоснование наличия спиновых изомеров и их конверсию, а также место их локализации в воде и водных растворах

50 лет назад пионерская работа Ахманова С.А. и др. [3] открыла новую эру нелинейно-оптической активной спектроскопии комбинационного рассеяния (CARS). Здесь нелинейная оптика обеспечила с помощью пучков лазеров видимого диапазона уникальную возможность изучения [4,5] движения молекул в воде и водных растворах в области гигантского поглощения на ГГц-ТГц частотах. Так методом CARS были открыты свободные вращения орто-пара спиновых изомеров молекул H₂O в воде [6] и селективное связывание пара-изомеров H₂O при формировании гидратных оболочек в водных растворах белков [6]. Позднее [7] спиновые изомеры H₂O были обнаружены в воде также. Оставалось неясным, где молекулы H₂O могут быть локализованы в воде и гидратных оболочках?

Ранее [8] мы обосновали, что льдоподобные структуры льда Ih в воде [9-11] и гидратных оболочках [12-15] способны локализовать молекулы H₂O, как в фуллерене [16], в гексагональных полостях вдоль оси с, поперечный размер которых 0.57 нм почти в два раза больше диаметра аквапоринового канала [1,2]. Так было установлено [13], что упругость и прочность структуры гидратных оболочек гемоглобина внутри эритроцитов весьма велика, чтобы их разрушить давлением оболочки. Только расплав структуры [13] из-за пара-орто конверсии H₂O [12] сопровождается потерей ~55% воды через аквапориновые каналы и обеспечивает деформацию эритроцитов для перемещения по капиллярам. Подобный расплав (пара-орто конверсия H₂O) гидратных оболочек (до 90% воды) белка лизоцима имеет место в курином яйце в инкубаторе при температуре ~37.5 °С и транспорт мономеров H₂O через аквапориновые каналы мембраны желтка для орошения

ядра и последующего его деления [15], который находится наверху желтка под мембраной. Мы считаем, что ключевым фактором в таком представлении являются тепловые флуктуации, которые создают смешанные квантовые состояния близко расположенных вращательных уровней и обеспечивают пара-орто спиновую

конверсию. Затем вращающиеся орто-пара спиновые изомеры H₂O проходят сквозь дипольный ключ аквапоринового канала мембраны [1,2] со скоростью 3Е9 молекул/с без остановки и поддерживают метаболизм организма на необходимом уровне.

1. Р. Agre, Нобелевская лекция (2003).
2. Р. Agre et al., Structural determinants of water permeation through aquaporin-1, *Nature*, 407, 599 (2000).
3. Ахманов С.А. и др., Активная спектроскопия комбинационного рассеяния света с помощью квазинепрерывного перестраиваемого параметрического генератора, *Письма в ЖЭТФ*, 15(10), 600-604 20 мая (1972).
4. Ахманов С. А., Коротеев Н. И. Методы нелинейной оптики в спектроскопии рассеяния света: активная спектроскопия рассеяния света. – Москва: Наука. Гл. ред. физ.- мат. лит., 1981. 544 с.
5. А.Ф. Бункин и др., Когерентная четырехфотонная спектроскопия низкочастотных либраций молекул в жидкости, *УФН*, 176, №8, 883-889, 2006.
6. A.F. Bunkinet al., Four-Photon Spectroscopy of ortho/para spin-isomer H₂O molecules in sub-millimeter range, *Laser Physics Lett.*, 3(6), 275-277, (2006)
7. Popa R., Cimpoiasu V.M. // FTIR analysis of ortho/para ratio in liquid water isotopomers: applications for enantiodifferentiation in amino acids. *Physics AUC*. 2011. V. 21. PP.11-18.
8. Першин С.М., Бункин А.Ф., Голо В.Л. // Мономеры H₂O в каналах льдоподобных молекулярных комплексов воды. *ЖЭТФ*. 2012. Т. 142. В. 6. №12. С. 1151-1154
9. Jinesh K.B., and Frenken J.W.M. // Experimental Evidence for Ice Formation at Room Temperature. *Phys. Rev. Lett.* 2008. V. 101. P. 036101
10. Першин С.М., Бункин А.Ф., Лукьянченко В.А. // Эволюция спектральной компоненты льда в ОН полосе воды при температуре от 13 до 99 0С. *Квант. Электроника*. 2010. Т.40. №12. СС. 1146-1148.
11. Pradzinski Ch.C.et al., // *Science*. September 2012. V. 337. # 6101. PP. 1529-1532. DOI:10.1126/science.1225468
12. Pershin S. M. // Ortho/Para H₂O Conversion in Water and a Jump in Fluidity of Erythrocytes through a Microcapillary at the Temperature 36.6 +/- 0.30C. *Phys. of Wave Phenomena*. 2009. V. 17. #4. PP. 241-250.
13. Artmann G.M. et.al., Temperature Transitions of Protein Properties in Human Red Blood Cells. *Biophys. J.*, 75, 3179 (1998).
14. J.G. Davis et al., Water structural transformation at molecular hydrophobic interfaces, *Nature*, 491, 582-585 (2012). doi:10.1038/nature11570
15. Першин С.М. Орто-пара-спин-конверсия H₂O в водных растворах как квантовый фактор парадоксов Коновалова // *Биофизика*, 59(6), 1209-1219 (2014).
16. S. Mamone, et al., Nuclear spin conversion of water inside fullerene cages detected by low-temperature nuclear magnetic resonance, *J. Chem. Phys.* 140, 194306 (2014); doi: 10.1063/1.4873343

Терагерцовая динамика гидратных оболочек биомолекул

Пеньков Н.В.^{1*}

¹ИБК РАН - ФИЦ ПНЦБИ РАН;

nvpenkov@rambler.ru

Гидратация является фундаментальным процессом в биологии, необходимым для приведения биомолекул к нативному состоянию. При этом гораздо менее изученной является обратная сторона гидратации – формирование гидратной оболочки. Гидратные оболочки биомолекул изучаются давно и разными методами, но до полного понимания их строения и функций ещё очень далеко. Мощным импульсом в развитии данного направления было появление метода терагерцовой (ТГц) спектроскопии в начале 2000-х. Данный метод оказался гораздо более чувствительным к структурно-динамическим характеристикам воды, чем другие методы. Это обусловлено спецификой ТГц диапазона (0.3-3 ТГц), по характерным частотам, временам и энергиям соответствующего межмолекулярной структуре и динамике воды. Показано, что гидратные оболочки не ограничиваются одним-двумя слоями сильно связанной воды, а включают и более отдалённые области водной фазы (до нескольких нм от поверхности биомолекулы) с изменённой молекулярной динамикой, что в ряде работ было названо динамическими гидратными оболочками. Однако, несмотря на 20-летнюю историю их изучения, до сих пор не предложены универсальные исследовательские подходы и не описаны обобщающие характеристики динамических гидратных оболочек биомолекул. Основной проблемой является то, что спектры водных растворов в ТГц диапазоне не являются характеристическими, что затрудняет определение конкретных спектральных параметров, характеризующих структуру и динамику гидратных оболочек.

В наших работах развивался подход для исследования гидратных оболочек биомолекул на базе метода ТГц спектроскопии временного разрешения (THz-TDS). Данная разновидность ТГц спектроскопии позволяет измерять спектры комплексной диэлектрической проницаемости (ДП), которые намного более информативны, чем абсорбционные спектры. Суть подхода состоит в следующем.

1) Измеряются спектры ДП раствора биомолекул ϵ_s^* , растворителя $\epsilon_w(0^*)$ (без биомолекул) и сухого вещества биомолекул ϵ_i^* .

2) С использованием моделей эффективной среды из ДП раствора ϵ_s^* вычитается диэлектрический вклад биомолекул ϵ_i^* и рассчитывается спектр водной фазы раствора $\epsilon_w^* = f(\epsilon_s^*, \epsilon_i^*)$.

Между $\epsilon_w(0^*)$ и ϵ_w^* имеются отличия, обусловленные присутствием гидратных оболочек в водной фазе раствора биомолекул. На основании этих отличий извлекается информация о гидратных оболочках биомолекул.

Особое внимание уделялось выбору подходящих для каждого типа биомолекул моделей эффективной среды. В том числе, на основе формализма электродинамики сплошных сред нами была теоретически разработана и экспериментально подтверждена модель эффективной среды, применимая для растворов протяжённых биополимеров (ДНК, полисахариды и др.).

Спектры $\epsilon_w(0^*)$ и ϵ_w^* не сравнивались напрямую, а раскладывались на составляющие, описывающие все основные типы межмолекулярной динамики воды в представлении теории диэлектрической спектроскопии:

$$\epsilon^* = (\Delta\epsilon_1 / (1 - i\omega\tau_1)) + (\Delta\epsilon_2 / (1 - i\omega\tau_2)) + A / (\omega_0^2 - \omega^2 - i\omega\gamma) + \epsilon_\infty + i\sigma_0 / (\epsilon_0\omega), \quad (1)$$

где τ_1 и $\Delta\epsilon_1$ – время и амплитуда ориентационной релаксации связанных молекул воды (Дебаевской релаксации); τ_2 и $\Delta\epsilon_2$ – время и амплитуда ориентационной релаксации свободных молекул воды; A , ω_0 , γ – амплитуда, резонансная частота и параметр затухания межмолекулярных продольных колебаний молекул воды, связанных водородными связями; ϵ_∞ – высокочастотная ДП, σ_0 – dc-проводимость, ϵ_0 – диэлектрическая постоянная, ω – циклическая частота, i – мнимая единица.

Каждый параметр (1) обладает определённым физическим смыслом, и его изменение при переходе от растворителя к водной фазе раствора однозначно характеризует структурно-динамические характеристики гидратных оболочек. Так, уменьшение $\Delta\epsilon_1$ означает усиление связывания воды в гидратных оболочках, параметр $\Delta\epsilon_2$ пропорционален количеству свободных молекул воды, τ_2 – время их ориентационной релаксации, изменение A коррелирует с изменением числа водородных связей, а параметры ω_0 и γ определяют среднюю энергию и ширину распределения энергий водородных связей.

Описанный подход был применён для исследования гидратации биомолекул всех основных типов, что продемонстрировало его информативность и универсальность. Показано, что у белка при изменении конформации происходит изменение параметров релаксации молекул воды в гидратных оболочках. У фосфолипидных липосом фазовые переходы сопровождаются изменением водородного связывания в гидратных оболочках, протяжённость которых превышает 5 нм. Комплекс Mg·АТФ формирует особую гидратную оболочку с образованием дополнительных водородных связей, чего не наблюдается ни для АТФ, ни для Са·АТФ. Это может иметь биологический смысл, поскольку именно Mg·АТФ участвует в большинстве биологически значимых реакций. Гидратная оболочка ДНК содержит три области, отличающиеся от невозмущённой воды: более сильно связанные молекулы, область с большим количеством свободных молекул, область с большим количеством водородных связей. Ионы K⁺ с внутриклеточной концентрацией существенно ослабляют все эффекты гидратации ДНК, что тоже может иметь биологический смысл. ДНК проявляет кооперативные эффекты гидратации по сравнению с отдельными нуклеотидами. Установлен ряд особенностей гидратации сахаров. Показана зависимость гидратации от ориентации ОН-групп и типа гликозидных связей. В противоположность ДНК, полисахариды проявляют антикооперативные эффекты гидратации.

С учётом того, что протяжённость динамических гидратных оболочек оказывается сопоставима со средним расстоянием между биомолекулами внутри живой клетки, особенный интерес представляет их роль в процессах взаимодействия биомолекул. Видится, что исследования в данном направлении на стыке физической химии и молекулярной биофизики имеют большие перспективы.

Использование биофизических технологий в сельскохозяйственных исследованиях

Гудков С.В.^{1*}

¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук;
S_makariy@rambler.ru

Изменение климата и борьба за сохранение окружающей среды обитания, требуют разработки и внедрения новых решений и подходов, в том числе и в сельском хозяйстве. В процессе выполнения Крупного научного проекта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№075-15-2020-774) в ФНАЦ ВИМ и ФНЦ ИОФ получены следующие результаты:

Создан прототип проточного датчика для доильных систем для определения аномальных характеристик молока (примеси крови, обводненность и другое) и его компонентного состава (жир, белок, лактоза). Для этого созданы оптические технологии позволяющие контролировать скорость течения сильно светорассеивающих жидкостей. Созданы оптические технологии позволяющие обнаруживать в сильно светорассеивающих жидкостях объекты размером 10-100 мкм (размер клетки животного). Созданы оптические технологии позволяющие оценивать количество и качество рассеивателей в биологических жидкостях. Созданы оптические технологии позволяющие оценивать в молоке концентрации основных биомолекул. Разработана экспресс технология оценки качества молока путем анализа наличия в нем энтеротоксинов стафилококков и антибиотиков (хлорамфеникола).

Созданы экологически безопасные и энергоэффективные трансформирующие солнечный свет покрытия для увеличения продуктивности закрытых грунтов в условиях северных широт. Для этого разработаны методы получения наночастиц с необходимыми оптическими и магнитными свойствами. Созданы технологии получения наноструктурированных поверхностей с нужными физическими и биологическими свойствами. Разработан низкотемпературный метод включения наночастиц в полимерную матрицу. Создана технология упорядочивания наночастиц в полимерной матрице. Разработана технология нанесения фотоконверсионных композитов на стекло и полимерные материалы, в том числе и нетканые. Разработан ряд перспективных конструкционных нано- мезо- и макроматериалов для тепличных хозяйств.

Созданы технологии нейтрализации патологических процессов у растений с помощью холодной плазмы и плазмолитов. Для этого созданы установки для получения плазмолитов на основе низкотемпературной плазмы: 1. Сгенерированной пьезотрансформаторами (малогабаритная переносная установка холодной плазмы); 2. На основе плазмы тлеющего разряда в жидкости (полупромышленная/исследовательская); 3. На основе магнетронной генерации плазмы (промышленная установка). На основе плазмолитов разработаны технологии обеззараживания семян растений от патогенной микрофлоры. Для культур просо разработаны технологии интенсификации развития корневой системы (повышение засухоустойчивости). На основе плазмолитов разработана система обработки привоя и подвоя повышающая вероятность успеха прививки для плодовых растений яблони, груши, вишни и черешни.

На основе беспилотного летательного аппарата создана система по экспресс оценке функционального состояния полей. Для этого разработан лазерно-оптический классификатор семян и биомассы, позволяющий различать зараженные и не кондиционные части растений. Для детекции фитопатогенов разработаны протоколы применения лидарных технологий, спектроскопии, растровой гиперспектральной визуализации, рамановского рассеяния. Разработаны технологии сканирования множества объектов с разных ракурсов, распознавания объектов, их формы и других топологических параметров. Разработаны алгоритмы дистанционного мониторинга и экспресс-диагностики функционального состояния растений. Разработан прототип робота-транспортёра позволяющего сепарировать зараженное и здоровое зерно.

Грант Министерства науки и высшего образования РФ на проведение Крупного научного проекта «Разработка экологически безопасных и энергоэффективных спектральных и лазерных технологий для увеличения продуктивности сельскохозяйственных растений и животных» (075-15-2020-774)

Мониторинг экосистем vs математическое моделирование. Конвергенция

Медвинский А.Б.^{1*}, Адамович Б.В.^{1,2}, Минаев И.С.¹, Минаев Н.С.¹, Нуриева Н.И.¹, Русаков А.В.¹, Тихонов Д.А.^{1,3}

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;

²Белорусский государственный университет;

³Институт математических проблем биологии, Институт прикладной математики им. М.В.

Келдыша;

alexander_medvinsky@yahoo.com

Рассматривается проблема соответствия данных, полученных в ходе мониторинга природных экосистем, и результатов математического моделирования, нацеленного на выявление механизмов, обуславливающих наблюдаемую в ходе мониторинга динамику популяционного обилия. Предлагается подход, в рамках которого проводится непосредственное включение данных мониторинга в математические модели. Такой подход позволяет анализировать динамику биотических факторов, которые не измерялись в ходе мониторинга, и оценивать связь этой динамики с вариациями экологически значимых абиотических факторов.

Биофизические методы в океанологии

Погосян С.И.^{1*}

¹МГУ, биологический факультет;
pogosyan@biophys.msu.ru

Актуальной проблемой океанологии является более точное и оперативное определение в водной толще различных акваторий первичной продукции фитопланктона в связи с глобальными изменениями климата. В настоящее время суммарная продукция Мирового океана определена с точностью $\pm 40\%$, что не может удовлетворять научное сообщество и не позволяет принимать обоснованные решения по поводу хозяйственной деятельности. Биофизические методы способны решать многие актуальные проблемы экологии и, в том числе, названные выше.

В докладе представлен разработанный на кафедре биофизики метод измерения в полости интегрирующей сферы (ICAM), который обеспечивает высокую чувствительность оценки содержания пигментов частиц фитопланктона и растворенного органического вещества без предварительной подготовки образцов природной воды. В качестве примера использования ICAM приведены результаты измерения спектров поглощения проб морской воды из Японского и Черного морей. Сотрудниками института Океанологии РАН имени П.П.Ширшова были проведены измерения содержания пигментов частиц фитопланктона и растворенного органического вещества методом ICAM в Балтийском, Северном, Баренцевом, Карском морях и в море Лаптевых.

Рассмотрены методы оценки состояния фотосинтетического аппарата природного фитопланктона по параметрам флуоресценции хлорофилла, позволяющие определить характеристики первичной продукции исследуемой акватории. В частности, описан принципиально новый микрофлуориметр, позволяющий оценить состояние фотосинтетического аппарата индивидуальных клеток планктонных водорослей по параметрам флуоресценции хлорофилла. Микрофлуориметр позволяет оценить содержание фотосинтетических пигментов в клетках каждого вида водорослей в составе фитопланктонного сообщества, определить эффективность первичных процессов фотосинтеза каждой клетки и зависимость потока электронов через фотосистему II от интенсивности света (световую кривую фотосинтеза), которая является показателем продукции клетки, а также определять уровень нефотохимического тушения фотосинтетического аппарата клетки. Предел чувствительности данного микрофлуориметра 10-12 грамм хлорофилла в объекте, что позволяет надежно измерять параметры флуоресценции хлорофилла одиночных клеток микрофитопланктона.

Ключевые слова: первичная продукция, хлорофилл, фитопланктон, абсорбционные методы, микрофлуориметрия.

Водородный электрод на основе иммобилизованной гидрогеназы с высокой плотностью тока

Цыганков А.А.^{1*}, Стародубов А.С.¹, Мельникова М.С.¹

¹ИФПБ РАН;
ttt-00@mail.ru

Использование ферментов в топливных элементах вместо платины не только позволит удешевить топливные элементы, но и представляет возможность создания биodeградебельных источников энергии. Впервые возможность прямого переноса электронов гидрогеназой на электрод была продемонстрирована в СССР (doi:10.1016/0302-4598(84)87009-9). Долгое время токи у таких электродов величиной 1 мА/см² считались высокими. Лишь в 2014 г было показано, что иммобилизованная на электрод гидрогеназа *Citrobacter* sp S-77 при омовении молекулярным водородом без раствора не только способна к прямому переносу электронов, но и обладает каталитической активностью выше платины (doi:10.1002/anie.201404701). Последние годы гидрогеназа на сухом электроде и при продувке молекулярным водородом активно исследуется в ряде лабораторий. Появились публикации, в которых гидрогеназный электрод изучается непосредственно в топливном элементе, а не в ячейке с трехэлектродной схемой включения. В некоторых из них токи достигали 14 мА/см². При этом иммобилизацию фермента осуществляли в проводящую матрицу без учета ориентации фермента (doi: 10.1002/chem.202000750), активировали поверхность электрода полимерами виологена с иммобилизацией гидрогеназы за счет электростатического взаимодействия (doi: 10.1038/s41467-018-07137-6; 10.1002/cssc.20200099) или использовали активированные нанотрубки, к которым ковалентно прикрепляли гидрогеназу (doi: 10.1021/acscatal.8b00708).

HydSL гидрогеназа *Thiocapsa bogorovii* - термостабильный фермент, что особенно ценно для практического использования. При этом С-конец малой субъединицы, судя по гомологичному моделированию, представляет собой трансмембранную альфа-спираль (doi: 10.1016/j.bbabi.2021.148492). Нами разработана

методика ориентированной иммобилизации HydSL гидрогеназы, основанная на гидрофобном взаимодействии С-конца HydS и гидрофобного углеродного нанопорошка Vulkan R72. Электроды с иммобилизованной таким образом гидрогеназой, установленные в топливный элемент с платиновым кислородным электродом, развивали токи до 12 мА/см² при мощности более 7 мВт/см².

В докладе рассматриваются особенности различных типов иммобилизации гидрогеназ и возможности дальнейшего увеличения плотности тока.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-14-00255.

Мультихромофорные фотоактивные белки для оптогенетических приложений

Максимов Е.Г.^{1*}, Борщевский В.И.², Случанко Н.Н.³, Ярошевич И.А.¹, Цораев Г.В.¹, Лукашев Е.П.¹,
Петровская Л.Е.⁴, Богачев А.В.¹

¹Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова;

²Московский Физико-Технический Институт;

³Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН;

⁴Институт биоорганической химии имени М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН;

emaksimoff@yandex.ru

Многие фотосинтетические организмы используют каротиноиды в качестве дополнительных хромофоров в составе пигмент-белковых комплексов, обеспечивающих эффективное поглощение света в сине-зеленой части спектра, регуляцию процессов трансформации энергии и защиту клеточных мембран от фотоповреждения. Исследование принципов модульной организации водорастворимого оранжевого каротиноидного белка цианобактерий позволило нам разработать методы сборки фотоуправляемых сплит-доменных систем и способы доставки каротиноидов в клеточные мембраны. Белок-опосредованная доставка открывает новые возможности для солюбилизации гидрофобных каротиноидов и контролируемого обогащения клеточных мембран природными антиоксидантами, а также позволяет приступить к исследованию на клеточных моделях специфического семейства протонных и натриевых насосов, способных связывать каротиноиды в качестве дополнительного хромофора. В докладе будут раскрыты структурные и функциональные особенности ряда каротиноидных белков и их модификаций, оптимизированных для оптогенетических приложений.

Искусственный фотосинтез – перспективное решение энергетики

Аллахвердиев С.И.^{1,2*}

¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва;

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино;

suleyman.allakhverdiev@gmail.com

Ископаемое топливо невозобновляемо, низкоэффективно, неэкологично. Расширяется применение альтернативных возобновляемых источников энергии. Природный фотосинтез – тысячелетиями доказанный пример эффективности использования альтернативной энергии, производящий за счет энергии солнца из воды и CO₂ органические соединения и O₂, а в определенных условиях и H₂. Сжигание H₂ дает максимум энергии среди других видов топлива и воду, экологически чистый продукт. Производство H₂ системами искусственного фотосинтеза – перспективная и приоритетная задача. Солнечная энергия может быть преобразована в электричество (в солнечных ячейках) или использована в системах генерации H₂ из воды. Мы исследуем создание и работу преобразователей солнечной энергии на основе компонентов фототрофов, позволяющих получать экологически чистую энергию. Нами создана оригинальная установка для анализа работы солнечных батарей на основе фотосинтетических систем в широком диапазоне температур и интенсивностей света. Получены оригинальные данные о "работе" солнечных батарей, способных генерировать фототок, на основе разных компонент фотосинтетического аппарата, включая тилакоиды и мембраны фотосистемы II, иммобилизованные на поверхности диоксида титана в разных условиях. Особое внимание уделено поиску эффективных катализаторов окисления воды, поскольку такие катализаторы являются ключевыми компонентами солнечных батарей, производящих молекулярный водород из воды на свету. Нами установлено, что наиболее эффективным катализатором окисления воды в условиях искусственного фотосинтеза является марганецсодержащий комплекс. Для получения фотоводорода мы модифицировали FC1, в которой вторичный акцептор электрона, витамин K, замещен на платинизированный нафтохинон (PtNP), что повышает

эффективность переноса электрона на электрод. С помощью этой модификации ФС1 удалось создать искусственную систему, способную эффективно генерировать молекулярный водород за счет энергии света.

Результаты получены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (122050400128-1) и при поддержке Российского научного фонда (гранты №19-14-00118; №22-44-08001).

Применение методов вычислительной гидродинамики в решении актуальных задач сердечно-сосудистой хирургии

Кучумов А.^{1*}
¹ПНИПУ;
targs2@gmail.com

Развитие методов неинвазивной диагностики в современной хирургии, математических и компьютерных моделей позволяет со все возрастающей степенью точности описывать биомеханические процессы, протекающие в организме. Данное обстоятельство повышает возможность их использования при совершенствовании имеющихся и разработке новых персонализированных методов диагностики и прогнозирования лечения. Вычислительная гидродинамика является динамично развивающимся инструментом в решении инженерных и междисциплинарных задач. Медицина является одной из областей, где применение компьютерных методов и технологий необходимо. Одним из важных аспектов является рассмотрение применения методов биомеханики и вычислительной гидродинамики. В данной работе представлены результаты применения методов вычислительной гидродинамики в решении актуальных задач сердечно-сосудистой хирургии (моделирование течения крови для оценки эффективности шунтирования при аорто-легочном анастомозе у детей с врожденным пороком сердца, оценка гемодинамических показателей в аортальном клапане в норме и при патологии, моделирование течения крови при стентировании).

Моделирование течения крови для оценки эффективности шунтирования при аорто-легочном анастомозе у детей с врожденным пороком сердца

На основе изображений магнитно-резонансной томографии была построена система «аорта–пульмонарная артерия–шунт» для анализа гемодинамики у детей с врожденным пороком сердца. Кровь рассматривалась как ньютоновская жидкость (плотность – 1060 кг/м³; вязкость – 0,0035 Па·с). Граничные условия были получены из ультра-звуковых измерений.

В данной работе рассмотрена модель течения крови «аорта–шунт–легочная артерия». Был получен набор геометрических образов у четырех пациентов для последующего импорта в конечно-элементный решатель ANSYS CFX с целью решения задачи гемодинамики. Анализировались три варианта установки модифицированного шунта Blalock–Taussig с помощью распространенных гемодинамических показателей (пристеночные касательные напряжения, осредненные за сердечный цикл пристеночные касательные напряжения, индекс колебаний касательных напряжений, относительное время пребывания). Было выявлено, что варианты формирования шунта должны быть индивидуальны, т.е. учитывать анатомо-физиологические особенности конкретного пациента. Отмечена несимметричность кровотока в легочных артериях в различных местах имплантации шунта. Также было проведено сравнение работоспособности гемодинамических показателей для оценки эффективности модифицированного шунта Blalock–Taussig. Объективизированный и персонализированный подход к особому лечению каждого конкретного пациента позволит значительно снизить детскую смертность и улучшить качество реабилитации.

Оценка гемодинамических показателей в аортальном клапане в норме и при патологии

В работе проведен анализ использования двух подходов к моделированию турбулентных процессов: при помощи метода крупных вихрей и на основе моделей турбулентной вязкости. Решалась осесимметричная задача на идеализированной трехмерной геометрии, построенной на основе данных снимков УЗИ и литературного обзора. Задача решалась в рамках FSI подхода при помощи программного пакета COMSOL Multiphysics. Поток крови моделируется несжимаемой ньютоновской жидкостью с постоянной плотностью и вязкостью.

Для моделирования биомеханического поведения створок аортального клапана в норме применяется модель анизотропной гиперупругости Хольцапфеля-Гассера-Огдена. Патологическое состояние створок аортального клапана описывается линейно упругой моделью.

Математическая постановка включает уравнение Навье-Стокса с условием несжимаемости, уравнения для описания моделей турбулентности. Также записывается уравнение движения для твердого тела. Система замыкается начальными и граничными условиями, а также условиями сопряжения жидкости и твердого тела. На входе в расчетную область задается профиль скорости. Для определения давления на выходе из расчетной области используется двухэлементная модель Виндекесселя, в которую в качестве входных данных принимается профиль скорости.

Полученные результаты описывают изменения основных гемодинамических показателей: скорости, давления, пристеночных касательных напряжений и индекса колебаний касательных напряжений. Также проведено сравнение результатов для значений кинетической и турбулентной кинетической энергии между двумя моделями турбулентности и состоянием в норме и при патологии.

Моделирование течения крови при стентировании

Целью данной работы является оценить влияние механических параметров артерии, бляшки и стента на эффективность стентирования при помощи анализа параметров как напряженно-деформированного состояния, так и гемодинамики. В данном исследовании рассматривается идеализированная модель системы «артерия – бляшка – стент». При этом геометрическая модель состоит из нескольких слоев: адвентиция – внешний слой, медиа – средний слой, бляшка и стент. Механические параметры слоев артерии описывались с помощью трехпараметрической модели Огдена. В результате реализации одностороннего и двустороннего алгоритмов взаимодействия жидкости и твердого тела были найдены распределения гемодинамических параметров.

Благодарности: Результаты получены при выполнении государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации на выполнение фундаментальных научных исследований (проект FSNM-2023-0003)

Молекулярные машины как инструмент сопряженного нарушения симметрии и преобразования формы энергии в рабочем цикле

Твердислов В.А.^{1*}

¹ *Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова ;
tverdislov@mail.ru*

Доклад посвящен обсуждению ряда новых общих положений, развитых в отношении биологических молекулярных машин и рассмотренных в нестандартном аспекте идей симметричности, конкретно – хиральности. В развитие нетривиальных фундаментальных идей Эмми Нётер и Фримана Дайсона о физической обусловленности связей между законами сохранения и разными типами симметрий, а также о процессе эволюции систем как череде нарушения симметрии мы выдвигаем соображение о том, что в таком сопряжении молекулярные машины живой природы являются ключевой находкой Природы в формировании и функционировании Жизни на Земле. Сообщение ориентировано на белки-ферменты, рецепторы, насосы, преобразующие энергию, вещество и информацию. Функционирование специализированных информационных молекулярных машин, базирующихся на нуклеиновых кислотах и их комплексах с белками, а также белково-липидных надмолекулярных мембранных машин, как мы полагаем, основано на тех же физических принципах.

Машиной можно назвать устройство (конструкцию), которое способно в циклическом режиме преобразовывать форму энергии, совершая «полезную работу», благодаря наличию в ней «выделенных» механических, (поступательных, колебательных, вращательных), в том числе, квантовомеханических, степеней свободы, кинетически разделяющих работу и диссипацию. Молекулярная машина есть инструмент преобразования формы энергии, сопряженного с нарушением симметрии в неравновесной нелинейной системе (конструкции с нелинейными/вентильными элементами) для совершения «полезной работы». «Полезная работа» машин составляет сущность их биологических функций. Эволюционно состоявшиеся молекулярные машины являются иерархически организованными динамическими хиральными устройствами (конструкциями).

Ранее нами была сформулирована и обоснована концепция, согласно которой, физической основой молекулярной биологии и молекулярных машин является периодическая система связанных симметрическими соотношениями знакопеременных хиральных структур во внутри- и надмолекулярных иерархиях структур важнейших классов биомакромолекул. Выявлена общая закономерность: начиная с уровня асимметричного углерода в дезоксирибозе и аминокислотах, прослежена тенденция чередования знака хиральности внутримолекулярных структурных уровней D-L-D-L для ДНК и L-D-L-D для белков. Проявлениями хиральности выступают не только гомохиральные аминокислоты и сахара, но также спиральность и суперспиральность вторичных структур и структур более высокого порядка, а также хиральные особенности разных типов бета-структур. Составленное этими иерархиями ядро молекулярной биологии интегрально составляет уже ахиральный инвариант, а сами эти структуры непосредственно реализуют выделенные механические степени свободы молекулярных машин.

Основной идеей разрабатываемого авторами положения о молекулярных машинах является представление о сопряженном нарушении симметрии и смене формы энергии при движении машины по рабочему циклу в ходе совершения «полезной работы». Такое сопряжение составляет физическую основу совершения электро-механо-биохимической «полезной работы», ориентированной на морфогенез и физиологические функции. Феномен хиральности позволяет формировать дискретные хирально знакопеременные иерархии структур в макромолекулярных машинах в процессе фолдинга, а также обеспечивает однонаправленное движение машин

по термодинамическому циклу за счет нелинейных вентильных свойств вторичных и иерархически более высоких спиральных и других регулярных внутри- и надмолекулярных структур. Конструктивные элементы молекулярных машин являются одновременно «рабочим телом», преобразователями форм энергии, а также нелинейными элементами, управляющими последовательностью и сопряжением элементарных актов в цикле. Существенно, что хиральные структуры воды, находящиеся в контакте с внутримолекулярными и поверхностными структурами больших молекул, являются непосредственными участниками генерализованных симметричных перестроек в рабочем цикле машины. Проведен теоретический анализ механических вентильных свойств спиральных и суперспиральных структур белковых макромолекул.

1. Твердислов В.А., Сидорова А.Э., Багрова О.Е., Белова, Е.В., Быстров, В.С., Левашова, Н.Т., Луценко, А.О., Семенова, Е.В., Шпигун, Д.К. Хиральность как симметричная основа самоорганизации биомacroмолекул. Биофизика, издательство Наука (М.), том 67, № 5, с. 837-858, 2022. DOI 10.31857/S0006302922050015

Лазерные пинцеты и их применение в биофизических исследованиях

Приезжев А.В.^{1*}

¹МГУ;

avp2@mail.ru

Лазерные пинцеты (ЛП), также называемые оптическими ловушками (ОЛ), представляют собой новую технологию, появившуюся в середине 1980-х годов. Появление ЛП открыло новые возможности манипулирования микрочастицами различной природы, в частности живыми клетками, без механического контакта и измерения сил взаимодействия между ними и окружающей средой. Большое влияние ЛП на фундаментальные и прикладные исследования было отмечено присуждением Нобелевской премии по физике 2018 года Артуру Ашкину - изобретателю ЛП.

Принцип действия ЛП заключается в изменении импульса сил, действующих на клетку, при преломлении на ней остро сфокусированного или иным образом сформированного пучка света с ярко выраженным пространственным градиентом интенсивности. Вблизи фокуса пучка ОЛ ведет себя как линейная пружина, создающая силу, действующую на клетку, пропорциональную ее смещению от центра ловушки. Если положение перетяжки луча пространственно манипулируется, то же самое происходит и с положением клетки. Смещение клетки от положения равновесия внешними силами можно откалибровать так, чтобы эти силы можно было точно измерить в диапазоне 0,1 – 100 пН. Это диапазон сил упругих деформаций живых клеток при митозе, взаимодействии клеток друг с другом и окружающей средой и т. д.

ЛП используются для изучения широкого круга явлений клеточной биофизики, например, механизмов функционирования молекулярных моторов, отвечающих за подвижность клеток, изменение их формы и внутриклеточный транспорт. Благодаря возможности приложения сил к отдельным молекулам и измерения сил, возникающих в их химических реакциях, аналитический ЛП идеально подходит для исследования механизмов механохимических превращений.

В данной работе представлены последние результаты, полученные с помощью ЛП при изучении биофизики взаимодействия живых клеток при обратимой агрегации эритроцитов - фундаментальном процессе, механизмы которого остаются до конца не изученными. Изменения агрегации эритроцитов связаны с развитием таких заболеваний, как артериальная гипертензия (АГ), сахарный диабет (СД) и др. Измерялись силы взаимодействия эритроцитов при агрегации и дезагрегации в зависимости от состава среды, площади и продолжительности первичного контакта, характерного для крови здоровых доноров и больных, страдающих различными заболеваниями. Мы обнаружили, что измеренные силы чувствительны к различным изменениям крови, характерным для больных, страдающих АГ и СД.

Сделан вывод, что использование ЛП позволяет проводить биофизические исследования на уровне отдельных клеток без механического контакта, что ранее было невозможно.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда № 22-15-00120. Большой вклад в работу внесли Кисунг Ли, Алексей Н. Семенов, Андрей Е. Луговцов и Петр Б. Ермолинский, которым автор выносит искреннюю благодарность.

Биоинформатика, нейробиология нового поколения и искусственный интеллект

Осипов А.А.^{1,2*}

¹*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН;*

²*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;*

aosypov@gmail.com

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

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

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

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

Вводится понятие: "средний нейроморфный искусственный интеллект" - промежуточный между узкоспециализированным реактивным слабым ИИ и универсальным проактивным сильным ИИ. Средний нейроморфный искусственный интеллект характеризуется универсальностью, реактивностью и ограниченной нейроморфностью. Универсальность позволяет выполнять необходимые комплексные когнитивные функции. Реактивность снимает этические проблемы безопасности человечества и непреумножения страданий мыслящих существ, а также задачу создания эмоционально-мотивационного блока, системы регуляции внимания и т.д. Ограниченная нейроморфность вызвана неполнотой наших знаний об устройстве мозга как субстрата когнитивной деятельности, отсутствием нужды в системах жизнеобеспечения, эмоционально-мотивационного блока, системы регуляции внимания и т.п. Также ограничение нейроморфности вызваны необходимостью решать некоторые задачи ввода/вывода, обработки и хранения информации, недоступные для живых систем, но желательные для функционирования искусственного интеллекта как инструмента человеческой деятельности.

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

Абсорбционные свойства и фотосенсибилизирующее действие молекулярного кислорода

Красновский А.А.^{1*}, Бендиксис А.С.¹, Козлов А.С.¹

¹*ФИЦ Биотехнологии РАН;*

phoal@mail.ru

В виду исключительной важности кислорода в биосфере, любые свойства его молекул представляют большой интерес для изучения. В ходе многолетних исследований нашей группы методом лазерной активации кислорода нам впервые удалось измерить спектр поглощения кислорода в азрированных органических растворителях и воде в естественных условиях. Примерно такими же абсорбционными свойствами, по-видимому, обладает кислород в клетках живых организмов. Успеха удалось добиться путем измерения скоростей химического захвата синглетного кислорода и интенсивности его собственной фосфоресценции при 1270 нм под действием лазерного облучения в интервале длин волн 500-1300 нм. Обнаружены два главных максимума спектра действия активации кислорода при 765 и 1273 нм. Относительная интенсивность этих максимумов зависела от природы растворителей. В неполярных гидрофобных средах полоса 765 нм в 6 раз меньше длинноволновой полосы. В воде и спиртах полоса 765 нм – в 1,5-2 раза меньше ИК полосы. Кроме этих главных полос обнаружены существенно более слабые полосы при 690 и 1070 нм. Первая – примерно в 15 раз слабее по максимальной амплитуде, чем полоса 765 нм, вторая во всех средах – примерно в 100 раз слабее, чем полоса 1273 нм. При действии красного света 630 нм, соответствующего максимуму поглощения димерного

кислорода, генерацию синглетного кислорода обнаружить не удалось. Таким образом установлено, что спектр поглощения растворенного кислорода содержит те же четыре основных максимума, что и спектр поглощения газообразного кислорода в атмосфере Земли. Однако, основной максимум поглощения атмосферного кислорода соответствует Фраунгоферовой линии 762 нм, а ее интегральный абсорбционный коэффициент 300 раз больше, чем у полосы в области 1270 нм. У растворенного кислорода самой сильной является полоса в области 1270 нм, которая 6 раз больше по амплитуде, чем полоса 762 нм. Полосы димерного кислорода в видимой области спектра нам наблюдать не удавалось. Обсуждается значение этих фактов для понимания фотодинамической активности (светокислородный эффект) и функции кислорода в клетках. Подробная информация приводится в цитированных ниже публикациях и указанных в них ссылках. Работа частично поддержана грантом РФФИ № 19-04-00331 А и госзаданием ФИЦ Биотехнологии РАН.

Литература

1. Krasnovsky A.A., Kozlov A.S., Benditkis A.S. Comparison of Photodynamic Activities of Molecular Oxygen and Porphyrins. // *Macroheterocycles*. 2019. Vol. 12. P. 171-180.
2. Kozlov A.S., Egorova O.N., Medvedkov O.I., Krasnovsky A.A. Activation of oxygen molecules by 1070 nm laser radiation in aerated solvents. // *Optics Lett.* 2021. Vol. 46. No. 3. P. 556-559.
3. Benditkis A.S., Kozlov A.S., Goncharov S.E., Krasnovsky A. A. Detection of the Fraunhofer band B (690 nm) in the absorption spectra of oxygen in aerated solvents. // *J. Opt. Soc. of America, series B*. 2021. Vol. 38, No 11. P. 3410-3416.
4. Красновский А.А., Козлов А.С., Бендиткис А.С. Лазерная активация кислорода в аэрированных растворах. Измерение спектров поглощения растворенного кислорода в естественных условиях. // *Известия высших учебных заведений. Физика*. 2021. Т. 64. № 11. С. 45-54.
5. Krasnovsky A.A., Kozlov A.S., Benditkis A.S. Laser activation of oxygen in aerated solvents. Measurement of the absorption spectra of oxygen dissolved in aerated solvents under natural conditions. // *Russ. Phys. J.* 2022. Vol. 64, No. 11, P. 2035-2045.

Автоволновая природа гигантских импульсов деполяризации, предшествующих приступам эпилепсии

Зинченко В.П.^{1*}, Ларюшкин Д.П.¹, Теплов И.Ю.¹

¹*Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино;
vpz@mail.ru*

Между приступами эпилепсии, при повреждении мозга, после инсульта в мозге возникают высокоамплитудные (гигантские) синхронные колебания/импульсы электрической активности, регистрируемые ЭЭГ. Клетки мозга, выделенные из эпилептических очагов, также генерируют периодические высокоамплитудные гиперсинхронные разряды, в основе которых лежит триггерный механизм неизвестной природы. Последнее явление рассматривается как клеточный коррелят эпилептиформной активности нейрональной сети и получило название пароксизмальный деполяризационный сдвиг (PDS). С момента открытия PDS в 1960-х годах существование необычного режима электрической активности нейронов, в нейрональной сети было показано не только при эпилепсии, но и при ишемии, и ряде других нейродегенеративных заболеваниях. Как минимум, три колебательные системы включены в формирование кластера PDS. Колебания потенциалов действия (ПД), колебания PDS и колебания кластеров PDS. Все три системы имеют автоволновую природу. Автоволновая природа ПД изучена достаточно подробно. Пейсмекерная клетка генерирует периодические автоволны ПД, постоянно деполяризуя мембрану. Признаками автоволны являются: постоянство амплитуды импульсов (незатухание), наличие медленной фазы между импульсами ПД и механизма временной инактивации (отключения) среды, чтобы обеспечить однонаправленное движение возбуждения, наличие источника энергии. При увеличении деполяризации частота генерации ПД может либо монотонно возрастать, либо формируется режим пачечной активности ПД, который получил название «берсты». Внешне «берсты» похожи на кластеры PDS, но отличаются по амплитуде управляющей деполяризации. В кластере PDS максимальная амплитуда деполяризации может превышать потенциал реактивации Na⁺ канала.

Предполагается, что начальное формирование пачки ПД происходит за счет импульса деполяризации, генерируемого низкопороговыми Ca²⁺ каналами. А преобразование в кластер PDS происходит вследствие потери ГАМК-зависимого торможения и гиперсинхронизации пачек ПД и импульсов Ca²⁺. При этом, периодические кластеры PDS и сопутствующие им Ca²⁺ импульсы имеют все признаки и свойства автоволны. Поведение PDS в кластере также носит колебательный характер. Неизвестный механизм открывает канал PDS, который обеспечивает быструю деполяризацию до уровня, превышающего потенциал реактивации Na⁺ канала. При высокой скорости деполяризации на переднем фронте PDS успевает сгенерироваться часто только один ПД.

Пленарные доклады

Таким образом, PDS управляет частотой генерации ПД в пачке. Колебания PDS также имеют указанные выше признаки автоволны. В отличие от первых двух колебательных систем для PDS неизвестны ни природа каналов, ни механизмы их регуляции.

Установление природы ионных каналов, принимающих участие в формировании кластеров PDS, является важной задачей, решение которой необходимо для выявления новых мишеней для лечения неврологических заболеваний, связанных с гиперовозбудением. Сложность задачи заключается в том, что в формировании автоволн кластера PDS одновременно могут принимать участие различные ионные каналы.

Молекулярная биофизика. Структура и динамика биополимеров и биомакромолекулярных систем

С-В-А тест для силовых полей ДНК

Стрельников И.А.¹, Ковалева Н.А.¹, Клинов А.П.¹, Зубова Е.А.^{1*}

¹Федеральный Исследовательский Центр Химической Физики им. Н.Н. Семенова Российской 1.
Академии Наук;
elena.0.zubova@gmail.com

В некоторых комплексах с белками дуплекс ДНК локально сильно изогнут, например, в нуклеосоме и в комплексах с полимеразой и транскрипционными факторами. В области таких изгибов молекула ДНК находится в неканонических конформациях: С (с узкой малой бороздкой и большим количеством ВП конформаций фосфатов) или А (с узкой большой бороздкой и большим количеством сахаров в северной конформации). Для изучения формирования таких комплексов методами молекулярной динамики необходимо, чтобы силовое поле адекватно воспроизводило оба этих конформационных перехода в свободной ДНК. Мы проанализировали доступные экспериментальные данные по В-С и В-А переходам при условиях, наиболее легко реализуемых в молекулярно-динамическом моделировании: в водно-солевом растворе соли NaCl. Мы выделили шесть олигомеров (дуплексов) ДНК, конформации которых при разных значениях концентрации соли NaCl в водном растворе известны достаточно достоверно. Полимеры poly(GC) и poly(A) при низкой соли находятся в В-форме, классической и немного смещённой к А, соответственно. Олигомеры АТАТ и GGTATACC имеют сильную и зависящую от концентрации соли склонность к А форме. Наконец, полимеры Poly(AC) и poly(G) при высокой концентрации принимают С и А форму соответственно. Мы провели [1] тестирование силовых полей AMBER bsc1 и CHARMM36, а также их гибридов, и нам не удалось воспроизвести эксперимент. В обоих полях практически отсутствует зависимость результата моделирования от концентрации соли. Известная «В-любивость» поля AMBER оказалась следствием «В-любивости» его избыточно сильного стекинга. В поле CHARMM В форма является результатом неустойчивого равновесия между А-любивым стекингом оснований (особенно пар G:C) и С-любивым сахаро-фосфатным остовом, и ДНК в поле CHARMM обладает намного большей, чем в поле AMBER, гибкостью. Наконец, мы проанализировали результаты недавнего моделирования формирования комплексов ДНК с белками LacI, SOX-4, and Sac7d в рамках силового поля AMBER.

Работа была выполнена за счёт субсидии, выделенной ФИЦ ХФ РАН на выполнение государственного задания, тема FFZE-2022-0009 (регистрационный номер 122040500069-7). Расчеты проведены в Межведомственном Суперкомпьютерном Центре Российской Академии Наук.

[1] C-A test of DNA force fields, Ivan A. Strelnikov, Natalya A. Kovaleva, Artem P. Klinov, and Elena A. Zubova, <https://doi.org/10.48550/arXiv.2211.10711>

Д-энантиомерный пептид, разработанный для лечения болезни Альцгеймера, динамически взаимодействует с амилоидогенным участком предшественника β -амилоида

Охрименко И.С.^{1,2}, Волынский П.Е.^{1,2}, Ефремов Р.Г.^{1,2}, Бочаров Э.В.^{1,2*}

¹Московский физико-технический институт;

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;
edvbon@mail.ru

Болезнь Альцгеймера — разрушительное нейродегенеративное заболевание, приводящее к тяжелой деменции. Детальная информация о структуре, динамике и межмолекулярных взаимодействиях биомолекул, непосредственно участвующих в развитии болезни Альцгеймера, необходима для рациональной разработки новых биологически активных соединений и скрининга существующих с целью получения наиболее эффективных кандидатов в лекарственные средства [1]. Генетические данные убедительно свидетельствуют о том, что aberrantное образование, агрегация и/или клиренс нейротоксических пептидов амилоида- β (A β) запускает заболевание. A β аккумулируется в местах контакта нейронов в упорядоченные тяжи и фибриллы, образуя так называемые сенильные бляшки. При этом изоформы A β различной длины обнаруживаются в мозгу

здоровых людей независимо от возраста и, по-видимому, играют роль в сигнальных путях в головном мозге и обладают нейропротекторными свойствами при низких концентрациях. Изоформы Аβ являются продуктом последовательного расщепления мембранного белка-предшественника амилоида (APP).

D-энантиомерный пептид D3 и его производные недавно были отобраны с помощью фагового дисплея для прямого разрушения агрегатов цитотоксического Аβ [2]. В настоящее время одно из D3-подобных соединений должно пройти фазу II клинических испытаний, однако молекулярные детали его профилактического или фармакологического действия с высоким разрешением не совсем ясны. Для решения проблемы мы использовали комплексный подход, основанный на биохимических и биофизических методах, таких как белковая инженерия, микроскопический термофорез, флуоресцентная конфокальная микроскопия, флуоресцентная поляризация, калибровка микрофлюидной диффузии, круговой дихроизм, спектроскопия ядерного магнитного резонанса высокого разрешения (ЯМР) и компьютерное моделирование. В работе мы представляем экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что D3-пептид, будучи внутренне неупорядоченным пептидом (IDP), может динамически и специфически связываться IDP/IDP-подобным образом с внеклеточной частью мембраносвязанного Аβ-предшественника, трансмембранным СТФβ фрагментом белка-предшественника амилоида (APP672-726, Аβ1-55 в нумерации β-амилоида). Гетероядерная ЯМР-спектроскопия показала, что D3-пептид напрямую связывается с амфифильной примембранным JM-участком Аβ17-26, который в зависимости от внешних условий способен претерпевать конформационный переход из α-спиральной в β-конформацию и участвует в свертывании β-амилоида в фибриллы. Полученные структурные данные согласуются с данными ИФА и вестерн-блоттинга, которые показывают, что D3-пептид динамически связывается вблизи сайта узнавания α-секретазы, расположенного между внеклеточным катионсвязывающим доменом и подвижной JM-спиралью APP. Также было протестировано влияние ряда патогенных мутаций, локализованных в различных структурных и функциональных частях APP, на связывание D3-пептида.

Полученные данные свидетельствуют о том, что D-энантиомерный пептид D3 распознает амилоидогенный участок мембранного белка APP еще до его процессинга, ограничивая конформационное разнообразие, не нарушая его α-спиральности, и предотвращая образование межмолекулярных водородных связей. Это создаёт предпосылки для ингибирования ранних стадий превращения Аβ пептидов в β-конформацию и последующей токсической олигомеризации, связанной с ранними стадиями развития болезни Альцгеймера [3]. Достигнутый прогресс в понимании молекулярного механизма действия D3-пептида является важным шагом на пути к разработке эффективной стратегии лечения и профилактики болезни Альцгеймера.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-74-00024).

Ссылки:

1. Urban A.S. et al. Structural Studies Providing Insights into Production and Conformational Behavior of Amyloid-β Peptide Associated with Alzheimer's Disease Development. *Molecules*. 2021;26(10):2897.
2. Klein A.N., Gremer L., Kutzsche J., Willbold D. et al. Optimization of d-Peptides for Aβ Monomer Binding Specificity Enhances Their Potential to Eliminate Toxic Aβ Oligomers. *ACS Chemical Neuroscience*. 2017;8(9):1889-1900.
3. Bocharov E.V. et al. All-d-Enantiomeric Peptide D3 Designed for Alzheimer's Disease Treatment Dynamically Interacts with Membrane-Bound Amyloid-β Precursors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;64(22):16464-16479.

«Хвосты» гистонов и односторонние разрывы ДНК стабилизируют внутринуклеосомные петли ДНК при транскрипции нуклеосом

Герасимова Н.С.^{1,2}, Пестов Н.А.³, Студитский В.М.^{1,4*}

¹Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;

²Институт биологии гена, РАН;

³Медицинская школа Роберта Вуда Джонсона, Университет Рутгерса, Нью-Джерси, США;

⁴Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, США;

Vasily.Studitsky@fccc.edu

Большинство видов РНК в эукариотических клетках синтезируется ДНК-зависимой РНК-полимеразой 2 (РНКП 2). Ядерная ДНК у эукариот организована в хроматин - комплекс нуклеиновых кислот и белков, базовой единицей которого является нуклеосома. Нуклеосома состоит из фрагмента ДНК длиной 147 п.н., плотно упакованного на октамере белков-гистонов [Luger et al., 1997], и представляет собой барьер для транскрипции [Bondarenko et al., 2006]. При умеренном уровне транскрипции РНКП 2 гистоны преимущественно сохраняются на ДНК за счет специфического РНКП 2-зависимого механизма элонгации, сохраняющегося у эукариотических организмов от дрожжей до человека [Kulaeva et al., 2009].

Ранее было показано, что транскрипция нуклеосом по РНКП 2-зависимому механизму сопровождается образованием небольших петель ДНК на поверхности октамера гистонов, включающих сам фермент - внутринуклеосомных петель [Kulaeva et al., 2009; Pestov et al., 2015; Gerasimova et al., 2016]. Формирование таких структур предположительно связано с сохранением гистонов на ДНК при транскрипции [Kulaeva et al., 2009; Gerasimova et al., 2016]. Внутринуклеосомные петли ДНК намного эффективнее формируются в присутствии одонитевых разрывов нематричной цепи ДНК, вызывая арест транскрибирующей РНКП [Pestov et al., 2015; Gerasimova et al., 2022]. В ходе структурных исследований интермедиата транскрипции, содержащего внутринуклеосомную петлю, было обнаружено, что после того, как РНКП минует разрыв ДНК, происходит откат фермента («бэктрекинг»), а ДНК позади него взаимодействует с поверхностью октамера гистонов, образуя внутринуклеосомную петлю, которая блокирует дальнейшее продвижение фермента [Gerasimova et al., 2022].

В настоящей работе была изучена роль N-концевых «хвостов» гистонов и внуклеосомных одонитевых разрывов нематричной цепи ДНК в формировании внутринуклеосомных петель ДНК и аресте РНКП при транскрипции ближайшего к промотору участка нуклеосомной ДНК [Gerasimova et al., 2022]. Было обнаружено, что разрывы в линкерной ДНК вызывают остановку РНКП в положениях от +1 до +15 п.н. от входа в нуклеосому, что свидетельствует в пользу образования в этих положениях внутринуклеосомных петель ДНК. Остановка фермента более эффективно происходит в присутствии «хвостов» гистонов, что позволяет предположить их участие в образовании или стабилизации структуры внутринуклеосомных петель. Методом футпринтинга ДНК подтверждено предположение об образовании внутринуклеосомной петли в положении +1. Поскольку формирование внутринуклеосомных петель ДНК происходит с большей эффективностью в присутствии одонитевых разрывов ДНК, расположенных позади фермента, такие структуры могут играть роль в узнавании повреждений ДНК, скрытых в хроматиновой структуре.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-64-00001).

Литература

1. Bondarenko, V. A., Steele, L. M., Ujvári, A., Gaykalova, D. A., Kulaeva, O. I., Polikanov, Y. S., Luse, D. S., and Studitsky, V. M. (2006) Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II, *Molecular Cell*, 24, 469-479, doi: 10.1016/j.molcel.2006.09.009.
2. Gerasimova, N. S., Pestov, N. A., Kulaeva, O. I., Clark, D. J., and Studitsky, V.M. (2016) Transcription-induced DNA supercoiling: New roles of intranucleosomal DNA loops in DNA repair and transcription, *Transcription*, 26;7(3):91-5. doi: 10.1080/21541264.2016.1182240.
3. Gerasimova NS, Volokh OI, Pestov NA, Armeev GA, Kirpichnikov MP, Shaytan AK, Sokolova OS, Studitsky VM. Structure of an Intranucleosomal DNA Loop That Senses DNA Damage during Transcription. *Cells*. 2022 Aug 28;11(17):2678. doi: 10.3390/cells11172678.
4. Gerasimova NS, Pestov NA, Studitsky VM. Role of Histone Tails and Single Strand DNA Breaks in Nucleosomal Arrest of RNA Polymerase. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 24;24(3):2295. doi: 10.3390/ijms24032295.
5. Kulaeva, O. I., Gaykalova, D. A., Pestov, N. A., Golovastov, V. V., Vassilyev, D. G., Artsimovitch, I., and Studitsky, V. M. (2009) Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II, *Nature Structural and Molecular Biology*, 16, 1272-1278, doi: 10.1038/nsmb.1689.
6. Luger, K.; Mäder, A.W.; Richmond, R.K.; Sargent, D.F.; Richmond, T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997, 389, 251-260, doi:10.1038/38444.
7. Pestov NA, Gerasimova NS, Kulaeva OI, Studitsky VM. Structure of transcribed chromatin is a sensor of DNA damage. *Sci Adv*. 2015 Jul 3;1(6):e1500021. doi: 10.1126/sciadv.1500021.

АСМ-исследование влияния солей хрома (III) на конформацию молекул коллагена

Дубровин Е.В.^{1*}, Сергеева И.А.¹

¹*МГУ, физический факультет;
dubrovin@polly.phys.msu.ru*

Коллагены представляют собой семейство белков, входящих в состав многих клеток, органов и тканей живых организмов и выполняющих важные биологические функции, включая механическую, структурную и защитную. Благодаря высокой степени биосовместимости коллаген является популярным белком, входящим в состав biomaterialов. Общим структурным элементом коллагенов является трехцепочечная правозакрученная спираль из трех полипептидных цепей, состоящих примерно из 1000 аминокислотных остатков (тропоколлаген). В данной работе с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) исследовано влияние различных солей хрома (III), широко используемых для обработки коллагеновых волокон, на конформацию и механическую жесткость молекул тропоколлагена. Выявлено значительное уменьшение персистентной длины (увеличение гибкости)

тропоколлагена при воздействии солей хрома (III), и предложен объясняющий данный эффект механизм. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-23-00395.

Адсорбция полиадениновых последовательностей двухнитевой ДНК на поверхность золотых наночастиц

Соколов П.А.^{1*}, Касьяненко Н.А.¹, Рамазанов Р.Р.¹
¹*Санкт-Петербургский государственный университет;*
p.a.sokolov@spbu.ru

Пространственная организации золотых наночастиц (НЧ) при помощи дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) имеет широкий спектр применения в области нанотехнологий для создания объектов с уникальными физическими свойствами. В частности, ДНК может применяться для управления формой и размерами НЧ во время их синтеза или для создания биосенсоров, так как может нести мишень-специфические последовательности (ДНК-аптамеры). Стабильность дуплекса ДНК играет решающую роль, поскольку определяет окончательную геометрию этих наноструктур и, соответственно, их полезные свойства. В связи с этим пристального внимания заслуживает адсорбция ДНК на золотую поверхность. Этот процесс может приводить к деградации сформированных наноструктур, изменяя их геометрию или делая ДНК-аптамеры недоступными для мишени. В общем случае, адсорбция двухнитевой ДНК на золотую поверхность НЧ не имеет места. Адсорбция же одной из нитей двухнитевой ДНК определяется рядом факторов. Среди них можно выделить, во-первых, стабильность самого дуплекса, которая определяет вероятность локальных расплетений и, таким образом, доступность нити для взаимодействия с поверхностью. Во-вторых, скорость реакции адсорбции, которая зависит от свойств конкретной последовательности однонитевой ДНК и самой поверхности. В своей работе мы исследовали влияние ионов магния на стабильность дуплекса ДНК, пришитого к 5 нм наночастицам, которые использовались для синтеза более крупных гантелевидных наноструктур [1]. Результаты экспериментов показывают, что магний не только стабилизирует ДНК, но и перезаряжает отрицательно заряженную поверхность НЧ. Это может способствовать частичному накручиванию ДНК на НЧ, сопровождающемуся нарушением вторичной структуры ДНК. Этот эффект нами был особенно ясно продемонстрирован при изучении взаимодействия однонитевых полиадениновых последовательностей с НЧ [2]. Мы также показали, что одновалентные ионы натрия, в отличие от магния, экранируют поверхность НЧ и заряд ДНК, не приводя к росту количества связанных олигонуклеотидов. Полиадениновые участки ДНК обладают свойством специфической адсорбции на золото и широко применяются для иммобилизации на НЧ сшитых с ними последовательностей. Отдельного внимания заслуживает предложенная нами схема адсорбции на золотые НЧ однонитевых полиадениновых участков ДНК, возникающая в результате гибридизации несущей их ДНК с заранее закрепленной на поверхности комплементарной нитью ДНК [3]. Нами было показано, что ионная сила также играет ключевую роль. Мы надеемся, что данный подход может быть использован для повышения стабильности организованных при помощи ДНК НЧ, а также применен в ряде биосенсорных схем для повышения их предела детектирования. Исследования поддержаны грантами РНФ №19-73-00113 и №22-25-00302.

[1] Sokolov P A, Ramazanov R R, Rolich V I, Popova M A, Shalygin V E and Kasyanenko N A 2020 Stabilization of DNA by sodium and magnesium ions during the synthesis of DNA-bridged gold nanoparticles Nanotechnology 32

[2] Sokolov P A and Ramazanov R R 2022 Probing the conjugation of gold NPs using single-stranded DNA comprising two polyadenine adhesive tails J. Adhes.

[3] Sokolov P A, Ramasanoff R R, Gabrusenok P V, Baryshev A V and Kasyanenko N A 2022 Hybridization-Driven Adsorption of Polyadenine DNA onto Gold Nanoparticles Langmuir

Амилоидная агрегация SAA человека

Трунилина М.В.^{1*}, Лаптева Ю.С.¹, Марченков В.В.², Глухов А.С.², Рябова Н.А.², Катина Н.С.²
¹*Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пущино, Россия;*
²*Институт белка РАН, Пущино, Россия;*
masha.trunilina@mail.ru

SAA представляет собой α -спиральный белок, одна из функций которого - участие в иммунном ответе. При хронических воспалительных заболеваниях концентрация SAA в крови повышается, что приводит к его агрегации и формированию амилоидов в различных органах и тканях. К настоящему времени эффективные методы лечения SAA амилоидоза отсутствуют, и терапия направлена лишь на купирование симптомов. В связи с этим исследование амилоидной агрегации данного белка является важным направлением молекулярной биофизики и медицины.

В тканях пациентов с SAA-амилоидозом обнаруживаются фибриллы, состоящие из фрагментов белка. Поэтому к настоящему времени нет ответа на вопрос о том, формирует ли полноразмерный SAA амилоиды, либо перед агрегацией он подвергается протеолизу. Недостаток информации связан с тем, что в большинстве работ исследования амилоидообразования SAA проводили на модели белка мыши, либо белка человека, содержащего вследствие экспрессии в бактериальных клетках добавочный метионин на N-конце. Такие белки характеризовались пониженной амилоидогенностью или ее отсутствием. В отличие от этого в данной работе впервые была получена генетическая конструкция для экспрессии SAA человека в убиквитиновой системе, что позволило очистить полноразмерный белок без добавочных аминокислотных остатков.

Данные по перешивке белка глутаровым альдегидом, свидетельствуют о том, что SAA при pH 8,3 присутствует в растворе в виде мономера. Через 6 часов инкубации при температуре 37°C белок формирует агрегаты, которые, согласно результатам электронной микроскопии, представляют собой фибриллы длиной до 150 нм. Анализ спектров кругового дихроизма в дальней УФ области свидетельствуют об изменении вторичной структуры агрегатов по сравнению с мономером и уменьшении в них процентного содержания α -спиралей. Полученные фибриллы связывают флуоресцентный краситель тиюфлавин Т, специфический для амилоидной кросс- β -структуры. Таким образом, совокупность полученных результатов, позволяет сделать вывод, что в выбранных условиях SAA формирует амилоиды.

Для определения фрагментов белка, участвующих в формировании межмолекулярных взаимодействий в амилоидах был проведен ограниченный протеолиз мономерного белка и фибрилл с помощью неспецифической протеиназы К. Показано, что в условиях, при которых наблюдается полное расщепление мономерного белка, длина фрагментов, устойчивых к протеолизу в амилоидах соответствуют полноразмерному SAA. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что вся полипептидная цепь SAA участвует в формировании межмолекулярных взаимодействия в амилоидах. Результаты данной работы позволяют получить новую информацию об особенностях формирования амилоидов SAA и указывают на необходимость использования полноразмерного белка для дальнейших исследований его агрегации, а также поиска подходов к ее ингибированию.

Анализ транскрипции нуклеосом с использованием FRET-подходов позволяет выявить вариабельность пространственной структуры элонгационных комплексов с одинаковой длиной РНК

Герасимова Н.С.^{1,2}, Феофанов А.В.^{1,2,4}, Студитский В.М.^{1,3*}
¹*Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;*
²*Институт биологии гена, РАН;*
³*Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, США;*
⁴*Институт биоорганической химии имени М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, РАН;*
Vasily.Studitsky@fccc.edu

РНК-полимераза 2 (РНКП 2) представляет собой ДНК-зависимую РНК-полимеразу, которая отвечает за транскрипцию матричной РНК (мРНК), большинства малых ядерных РНК (мяРНК) и микроРНК в эукариотических клетках. Транскрипция хроматина РНКП 2 сопровождается сохранением гистоновых белков на ДНК благодаря специфическому механизму транскрипции РНКП 2, сохраняющемуся у эукариотических организмов от дрожжей до человека [1]. Этот процесс сопровождается образованием различных структурных интермедиатов – элонгационных комплексов (ЭК), включающих РНКП 2 и нуклеосому. Пространственные

особенности ЭК исследуются с использованием различных экспериментальных подходов, включая электронную микроскопию, крио-ЭМ, ДНК-футпринтинг, методы на основе детекции ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) и т. д. Подходы на основе FRET с использованием флуоресцентных меток, введенных в нуклеосомную ДНК, позволяют определять структурные особенности ЭК в условиях *in vitro*, близких к физиологическим.

Нами была изучена структура ЭК, образующегося при непосредственной близости РНКП 2 к нуклеосоме (5 п.н. до ближайшей к промотору границы нуклеосомы, ЭК-5). В исследовании был использован подход, основанный транскрибируемых *in vitro* флуоресцентно меченых моонуклеосомах, сформированных на высокоаффинной ДНК-последовательности 603 [2, 3]. Позиционированные нуклеосомы представляют собой ориентированный барьер для транскрипции по механизму РНКП 2 [4]. Здесь были использованы 603 нуклеосомы в так называемой «пропускающей» транскрипционной ориентации, поскольку они лучше повторяют свойства нуклеосом, транскрибируемых *in vivo* [1, 5]. Флуоресцентные метки, составляющие FRET-пару (донор и акцептор), вносили в соседние витки нуклеосомной ДНК. ЭК с РНКП 2 дрожжей собирали с использованием синтетических фрагментов ДНК и РНК-затравки и лигировали к флуоресцентно меченым нуклеосомам.

При транскрипции в присутствии ограниченного набора нуклеозидтрифосфатов были получены ЭК с активным центром фермента в положении -5. ЭК разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в нативных условиях и анализировали методом детекции FRET. Измерения проводились с использованием сканера флуоресценции Amersham Typhoon RGB Imager (Cityva, Швеция). Сравнительный анализ эффективности FRET для свободных нуклеосом и ЭК с РНКП выявил изменения в структуре нуклеосом при приближении к ним РНКП 2. Два типа структур были идентифицированы для ЭК-5 с РНКП 2. Было обнаружено, что ЭК с одинаковой длиной РНК могут находиться в разных конформационных состояниях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-64-00001). Работа проведена с использованием инфраструктурных возможностей Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Литература:

1. Kulaeva, O. I., Gaykalova, D. A., Pestov, N. A., Golovastov, V. V., Vassilyev, D. G., Artsimovitch, I., and Studitsky, V. M. (2009) Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II, *Nature Structural and Molecular Biology*, 16, 1272-1278, doi: 10.1038/nsmb.1689.
2. Thåström, A., Lowary, P. T., Widlund, H. R., Cao, H., Kubista, M., and Widom, J. (1999) Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences, *Journal of Molecular Biology*, 288, 213-229, doi: 10.1006/jmbi.1999.2686.
3. Gerasimova, N.S., Korovina, A.N., Afonin, D.A., Shaytan, K.V., Feofanov, A.V., and Studitsky, V.M. Analysis of Structure of Elongation Complexes in Polyacrylamide Gel with Förster Resonance Energy Transfer Technique, *Biophysics*, 67(2), 165-170, doi: 10.1134/S0006350922020063.
4. Bondarenko, V. A., Steele, L. M., Ujvári, A., Gaykalova, D. A., Kulaeva, O. I., Polikanov, Y. S., Luse, D. S., and Studitsky, V. M. (2006) Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II, *Molecular Cell*, 24, 469-479, doi: 10.1016/j.molcel.2006.09.009.
5. Chang, H.-W., Kulaeva, O. I., Shaytan, A. K., Kibanov, M., Kuznedelov, K., Severinov, K. V., Kirpichnikov, M. P., Clark, D. J., and Studitsky, V. M. (2014) Analysis of the mechanism of nucleosome survival during transcription, *Nucleic Acids Research*, 42, 1619-1627, doi: 10.1093/nar/gkt1120.

Белки как полимеры с локальной структурной детерминированностью

Анашкина А.А.^{1*}, Некрасов А.Н.²

¹*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;*

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

anastasia.a.anashkina@mail.ru

Изучение энтропийных характеристик первичных структур белков показало, что для 5 последовательно расположенных остатков наблюдается минимальный уровень информационной энтропии и, следовательно, блоки именно такого размера необходимо рассматривать как элементарные единицы последовательностей.

Анализ конформационной стабильности пентапептидов методом молекулярной динамики (МД) показал, что все пентапептиды можно разделить на три типа. Пентапептиды, находящиеся в преимущественном топологии более 80% времени моделирования, мы назвали «структуро-формирующими». В первичных структурах белков количество таких пептидов не превышает 7%. Структуры, имеющие две преимущественные конформации, в которых пентапептид суммарно находился более 40% времени МД моделирования, мы назвали

«триггерными». Остальные пептиды не имеют преимущественной конформации и их топология реализующаяся в белке зависит от окружения. Мы назвали такие пептиды «структуро-стабилизирующими», т.к., адаптируясь к окружению, они создают плотную упаковку белковой глобулы. Таким образом, в рамках предложенной структурной парадигмы, первичные структуры белков представляют собой полимер с изменяющимся вдоль цепи уровнем локальной детерминированности конформационных состояний. Анализ расположения структуро-формирующих пентапептидов в пространственных структурах белков показал, что структуро-формирующие пептиды выполняют по отношению к элементам вторичной структуры иницирующую, поддерживающую или терминирующую функцию.

Использование новой структурной парадигмы позволило разработать метод выявления иерархической организации белковых последовательностей - АНИС метод. Применение АНИС метода к совокупности белков с известной пространственной структурой позволило получить фрагменты PDB файлов, соответствующие элементам информационной структуры всех уровней иерархии. Изучение закономерностей их формирования должно в дальнейшем позволить перейти от модификации нативных белков к их проектированию.

Белковая инженерия на основе гиперстабильных Sm-подобных белков. Первые результаты и перспективы

Михайлина А.О.¹, Леконцева Н.В.¹, Хайретдинова А.Р.¹, Марченков В.В.¹, Никонов О.С.¹, Балобанов
В.А.^{1*}

¹ИБ РАН;

balobanov@phys.protres.ru

Создание новых белковых материалов в настоящее время является одним из актуальных направлений биоинженерии. Комбинация природных доменов в гибридном белке может придать ему свойства не присущие каждому из доменов в отдельности. Это даёт широкий простор для творчества в создании белков с новыми свойствами. Мы применили такой подход для олигомерных белков. Основой для гибридных олигомерных белков в наших работах стали Sm-подобные белки. Эти белки удобны тем, что имеют чрезвычайно высокую стабильность. Кроме того, среди них есть олигомеры с разным количеством субъединиц, что даёт возможность выбора под необходимые задачи. Присоединение целевых доменов к олигомерной основе сближает их и определяет взаимную ориентацию усиливая их взаимодействие. С целью определить возможные преимущества и ограничения такой системы нами были спроектированы, получены и исследованы несколько гибридных белков.

Первый гибридный белок, который мы представляем в нашей работе, это комбинация белка Hfq из *E.coli* и амилоидогенного А-бета пептида 1-40. При получении и исследовании этого белка мы использовали значительную разницу в стабильности структур основы и присоединённых пептидов. Такой подход позволил нам очищать белок в денатурирующих условиях, а затем, ступенчато ренатурируя его, изучить сворачивание каждой из частей этой конструкции. Было показано, что основа сворачивается в ожидаемый олигомер, на котором затем А-бета пептид формирует Тиофлавин Т связывающую структуру. При этом за счёт значительного локального повышения концентрации амилоидогенных пептидов их взаимодействие происходит преимущественно внутри олигомера без образования фибриллярных структур.

Второй гибридный белок, представляемый в этой работе, это комбинация гептамерного Sm-подобного белка из *Sulfolobus acidocaldarius* (SacSm) и апикального домена белка шаперона GroEL (ADGroEL). В нашей конструкции гиперстабильный SacSm удерживает семь ADGroEL вместе принуждая их к олигомеризации. Для этого белка также была показана ступенчатая сборка и самоорганизация. В первую очередь собирается основа SacSm, а затем на ней сворачиваются ADGroEL. Исследования показали, что гибридный белок обладает термостабильностью выше, чем отдельный ADGroEL и даже выше чем полноразмерный GroEL. Полученный гибридный белок способен связывать ненативные белки, связываемые полноразмерным шапероном GroEL. Также он снижает агрегацию ряда белков при их нагревании, что подтверждает его шаперонную активность.

Полученный нами результат показывает продуктивность создаваемого нами инструмента для стабилизации олигомерных белков. Этот инструмент может быть использован для ряда молекулярно-биологических задач требующих стабилизации кольцевых олигомерных белков.

Работа поддержана грантом РФФИ 22-24-00934.

Взаимодействие наночастиц оксида железа, покрытых цитратом натрия, с лизоцимом белка куриного яйца

Саримов Р.М.^{1*}, Нагаев Е.И.¹, Матвеева Т.А.¹, Бинги В.Н.¹, Бурмистров Д.Е.¹, Серов Д.А.¹, Асташев
М.Е.¹, Симакин А.В.¹, Гудков С.В.¹

¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, ИОФРАН;
rusa@kapella.gpi.ru

Суперпарамагнитные частицы оксида железа покрытые различными оболочками интересны как материал для контрастирования в магниторезонансной томографии. В данной работе были получены наночастицы оксида железа Fe₃O₄ (FeO и Fe₂O₃), покрытые цитратом натрия (TSC-IONP). Наночастицы были получены путем химического осаждения оксида гидратом аммония из водного раствора смеси солей хлоридов трехвалентного и двухвалентного железа по методике, описанной в публикации [1]. Наночастицы образуют самоорганизующиеся стабильные кластеры размером ~10 и 50–80 нм, состоящие из НЧ размером 3 нм. Стабильность контролировали с помощью метода многоугольного динамического светорассеяния и дзета-потенциала, который составлял -32±2 мВ.

Кластеры из TSC-IONP могут разрушаться при добавлении в раствор лизоцима (лизоцим куриного яичного белка, HEWL) и достаточно быстро в течении нескольких минут из наночастиц и белка образуются агрегаты, достигающие микронных размеров. Эти агрегаты стабильны в течении десятков минут. Белок, находящийся в агрегатах не теряет своей ферментативной активности и может быть выделен обратно при помощи механической тряски.

Такую агрегацию наблюдали несколькими методами: многоугольным динамическим светорассеянием, оптическим поглощением, флуоресцентной спектроскопией, ТЭМ и оптической микроскопией. Также были использованы FTIR и Рамановская спектроскопия, но они не выявили различий между нативным белком и агрегатами с НЧ.

Важно отметить, что концентрации НЧ, при которых происходила агрегация белков, также были токсичными для клеток. Отмечалось резкое снижение выживаемости фибробластов мыши (концентрация Fe ~ 75–100 мкМ), при этом увеличивалось отношение апоптотических ко всем погибшим клеткам. Также при низких концентрациях НЧ наблюдалось увеличение размеров клеток, а также уменьшение митохондриального мембранного потенциала. Исследуемые наночастицы оксида железа из-за цитотоксичности можно использовать как материал для контрастирования только при малых концентрациях <50 мкМ. Однако, показанные при взаимодействии с молекулами HEWL эффекты позволяет использовать TSC-IONP в других медико-биологических задачах. Например, для доставки белковых лекарственных средств, или с помощью магнитных полей концентрировать наночастицы в опухолевых тканях.

1. Akopdzhanov, A.G.; Shimanovskii, N.L.; Borisova, A.I.; Parshin, V.A.; Frolov, G.A. Magnetic Ferrite Nanoparticles as a Possible Platform for Magnetic-Resonance Contrast Agents. Pharm. Chem. J. 2020, 53, 1164-1167, doi:10.1007/s11094-020-02141-x.

Взаимодействие серотрансферрина и ингибитора С1-эстеразы с β-амилоидным пептидом

Немашкалова Е.Л.^{1*}, Вологжанникова А.А.¹, Казаков А.С.¹, Дерюшева Е.И.¹, Шевелёва М.П.¹,
Левашов П.А.², Шукуров Р.Р.³, Литус Е.А.¹

¹Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН -обособленное
подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный
исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской
академии наук»;

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет;

³Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ»;

elnemashkalova@gmail.com

Одним из основных факторов, провоцирующих развитие болезни Альцгеймера (БА), является накопление в мозге бета-амилоидного пептида (Аβ). Показано, что ряд белков плазмы крови и спинномозговой жидкости являются мощными ингибиторами образования фибрилл Аβ, что может быть использовано в терапии БА. Серотрансферрин (Тф) и ингибитор С1-эстеразы (С1И) относятся к группе белков плазмы крови, которые ассоциированы с патогенезом БА. Тф – основной переносчик ионов железа в плазме крови. По некоторым данным, его содержание в мозге и сыворотке крови пациентов с БА снижено. С1И играет важную роль в

функционировании протеолитических систем крови и регулировании гомеостаза при критических состояниях. Показано, что в головном мозге пациентов с БА наблюдается недостаточность активации экспрессии С1И, что, в свою очередь, приводит к повышению активности компонентов системы комплемента и способствует прогрессированию БА. В то же время прямое взаимодействие этих белков с Аβ мало изучено. В нашей работе исследовано взаимодействие Тф и С1И с мономерной формой Аβ, а также влияние этих белков на кинетику процесса фибриллообразования Аβ. Взаимодействие белков с мономерной формой Аβ40/42 количественно изучали с использованием метода спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса. Было обнаружено прямое взаимодействие С1И с мономерной формой Аβ, не описанное ранее в литературе. Также впервые изучены кинетические и равновесные параметры взаимодействия Тф с мономерной формой Аβ40/Аβ42. Значения наименьшей равновесной константы диссоциации, полученные после аппроксимации данных моделью гетерогенного лиганда, составили $1,5 \cdot 10^{-9}$ и $7,8 \cdot 10^{-9}$ М для комплекса с Аβ40 и Аβ42, соответственно. С помощью флуоресцентного теста с тиофлавином Т была изучена кинетика образования фибрилл Аβ в присутствии выбранных белков. Показано, что Тф и С1И в концентрации 8 мкМ эффективно ингибируют рост фибрилл Аβ40. Таким образом, можно предположить, что влияние Тф и С1И на развитие БА, в том числе, опосредовано прямым взаимодействием с Аβ.

Исследование выполнено при поддержке РНФ (грант № 20-74-10072, Литус Е.А.).

**Взаимосвязь равновесных параметров адсорбции лизоцима на поверхности живых
клеток бактерий различных семейств и кинетики ферментативного лизиса
(разрушения) бактериальных клеток на примере *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*,
*Lactobacillus plantarum***

Левашов П.А.^{1*}, Растрига Н.В.¹, Смирнов С.А.¹

¹*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет;
levashov@yahoo.com*

Для сложных полимерных субстратов давно известна важность характера адсорбции фермента, которая может быть или продуктивной, предшествующей каталитической стадии процесса, или непродуктивной, блокирующей действие фермента. В последние два десятилетия обнаружились новые аспекты, связанные с особой формой устойчивости бактерий к действию антибактериальных факторов иммунной системы. Выявляются всё новые молекулярные структуры поверхности бактериальных клеток, способные целенаправленно связывать антибактериальный фермент лизоцим, тем самым блокируя механизмы дезинтеграции бактерий при их поглощении иммунной клеткой фагоцитом, что соответственно блокирует как процесс обезвреживания бактерии, так и последующую презентацию бактериальных антигенов, необходимую образования специфических антител.

В данной работе проводилось исследование параметров адсорбции фермента лизоцима непосредственно на живых целых бактериальных клетках в условиях протекания ферментативного лизиса (разрушения) бактерий. В качестве модельного фермента использовался лизоцим куриного яйца, который в настоящее время применяется в составе медицинских препаратов и который имеет сходную структуру с лизоцимом человека. В качестве бактерий исследовали грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* семейства Enterobacteriaceae, грамположительные спорообразующие бактерии *Bacillus subtilis* семейства Bacillaceae и грамположительные *Lactobacillus plantarum* семейства Lactobacillaceae.

Было показано, что адсорбция лизоцима имеет обратимый характер, а равновесие устанавливается менее чем за 3-5 мин при температуре 37 °С. После установления равновесия изотермы адсорбции во всех случаях удовлетворительно аппроксимируются уравнением Ленгмюра. Анализ экспериментальных данных не выявил одновременного наличия разных центров связывания лизоцима на бактериальных клетках, для которых существенно отличаются равновесные параметры адсорбции. При разной доле лизированных клеток после инкубации смеси бактерий с лизоцимом в течение 5 минут и 20 минут сорбционные характеристики не меняются в пределах погрешности, таким образом, характер адсорбции лизоцима на целых клетках и на обломках клеток одинаковый. Адсорбционная ёмкость это максимальное количество связываемого клетками лизоцима в данных условиях, А_{max}. А_{max} уменьшается при повышении и понижении значения рН от оптимума активности. А_{max} составляет от $2,7 \cdot 10^7$ до $1,5 \cdot 10^8$ молекул лизоцима на одну клетку в зависимости от вида бактерий. В случае клеток бактерий *E. coli* и *B. subtilis* обнаружено двукратное снижение скорости ферментативного лизиса клеток (VL) при уменьшении ионной силы раствора в диапазоне 80 мМ – 5 мМ. Изучение кинетических параметров показало, что снижение скорости лизиса клеток происходит за счёт увеличения константы Михаэлиса (K_m) при неизменности максимальной скорости лизиса клеток (V_{max}). Было выяснено, что при снижении ионной силы

уменьшается константа десорбции лизоцима (K_d) при неизменности A_{max} . K_d уменьшается до 10 раз для *E. coli* до $1.2 \cdot 10^{-7}$ М. K_d уменьшается до 3 раз для *B. subtilis* до $2.4 \cdot 10^{-7}$ М. Можно предположить увеличение вклада непродуктивной сорбции лизоцима на бактериях *E. coli* и *B. subtilis* при понижении ионной силы. В случае клеток *L. plantarum* при изменении ионной силы раствора в диапазоне 80 мМ – 5 мМ не происходит драматических изменений параметров адсорбции лизоцима и VL. В случае *E. coli* наблюдается увеличение VL в 1.5-2.0 раза в присутствии свободных аминокислот глицина, гистидина и заряженных аминокислот (Gly, His, Asp, Glu, Arg, Lys) в концентрации 1-5 мМ. В присутствии этих аминокислот A_{max} не меняется, а K_d уменьшается. Таким образом, активирующие ферментативный лизис добавки, вероятно, увеличивают вклад продуктивной сорбции.

Бактериальные инфекции семейств Enterobacteriaceae и Bacillaceae (например, брюшной тиф, сальмонеллёз, бактериальная дизентерия, сибирская язва) особенно опасны тем, что эти бактерии потенциально могут связывать лизоцим фагоцитирующих иммунных клеток и использовать фагоциты в качестве контейнеров для распространения бактерий по организму. Поэтому новая информация об эффекторах, препятствующих непродуктивной адсорбции лизоцима, особенно важна для разработки новых антибактериальных лекарственных препаратов.

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова в рамках государственного задания «Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды» Номер ЦИТИС: 121041500039-8.

Взаимосвязь энтропии, симметрии и информации супрамолекулярной структуры молекул ДНК

Горовой Ю.М.^{1*}

¹*Ярославский государственный технический университет;*
gorovovj@mail.ru

Цель настоящей работы: установить связь между энтропией, симметрией и информацией супрамолекулярной структуры молекул ДНК. Структура и функции молекул ДНК определяются их взаимодействием со своим водным окружением. Корректной является модель супрамолекулярной структуры ДНК, как сложной систем состоящей из двух взаимодействующих подсистем. Такая модель построена на основе статистической физики сложных систем [1]. Доказана теорема Лиувилля для сложных систем. Результат: параметр I_s постоянен во времени при постоянной энергии взаимодействия подсистем. Параметр I_s равен разности между энтропией сложной системы и суммарной энтропии невзаимодействующих подсистем, составляющих эту сложную систему. Смысл параметра I_s : уменьшение энтропии сложной системы при переходе из стабильного состояния в метастабильное. Такой переход неосуществим в результате теплообмена. Он возможен только в результате совершения работы над сложной системой.

Экспериментальное подтверждение этой теории есть в работе Э.Л. Андроникашвили и Г.М. Мревлишвили [2]. Получены экспериментальные данные о теплоемкости молекул ДНК со своим водным окружением и теплоемкости разрушенных молекул ДНК с эквивалентным количеством воды в широком диапазоне температур. Энтропия молекул ДНК меньше энтропии разрушенных молекул ДНК на 3,5%. Есть не только количественное, но и качественное различие: вода вокруг целых молекул ДНК не превращалась в лед.

Физический смысл параметра I_s проясняет работа Л.А. Блюменфельда [3], который доказал неприменимость комбинаторного подхода к описанию количества информации, содержащегося в биологических системах, поскольку биологические системы содержат «конструкции», то есть структуры, разделяющие и деформирующие фазовое пространство Гиббса. «С позиций статистической физики наличие конструкций означает наличие границ между областями фазового пространства, пересечение которых запрещено для фигуративных точек статистической системы» [3]. В трактовке статистической физики параметр I_s характеризует глубину деформации фазового пространства Гиббса, которая произошла в результате взаимодействия подсистем сложной системы. Деформация означает изменение пространственной структуры сложной системы и появление коллективных колебательных или вращательных степеней свободы [1].

Доказана теорема Нётер для сложных систем. Результат теоремы Нётер: параметр I_s является инвариантом при любых преобразованиях, сохраняющих энергию взаимодействия подсистем неизменной. Деформация структуры сложной (супрамолекулярной) системы сопровождается изменением симметрии этой системы. Параметр I_s меняется при изменении хиральности супрамолекулярной структуры молекул ДНК. В статье [2] приведены данные теплоемкости молекул ДНК с измененной симметрией: «расплетенных» молекул. Энтропия таких молекул на 2,9% превышает энтропию молекул ДНК, сохранивших свою симметрию.

В реакции молекулярного распознавания, в которой супрамолекулярная структура молекулы ДНК является рецептором, происходит рецепция информации. Параметр I_c имеет информационную трактовку. I_c – количество взаимной информации: информации, которую имеют друг о друге взаимодействующие супрамолекулярные системы: лиганд и рецептор.

Параметр I_c хорошо известен в квантовой физике, как количество взаимной информации. I_c равен разности энтропий фон Неймана между энтропией сложной квантовой системы, состоящей из взаимодействующих (запутанных) квантовых подсистем и суммарной энтропией не взаимодействующих (незапутанных) подсистем. I_c характеризует степень запутанности состояний сложной квантовой системы. Параметр I_c важен для квантовых вычислений. Эффективные квантовые вычисления могут производить только запутанные квантовые системы.

Процессы изменения энтропии, структуры, симметрии и рецепции информации супрамолекулярной структуры молекул ДНК взаимосвязаны. Переход в метастабильное состояние (уменьшение энтропии) означает деформацию структуры и изменение симметрии супрамолекулярной структуры молекул ДНК. Увеличение комплиментарности рецептора к лиганду, обусловленное деформацией структуры рецептора, приводит к увеличению количества взаимной информации. Все эти процессы характеризует единый параметр I_c .

Таким образом, установлена взаимосвязь между энтропией, симметрией и способностью к рецепции информации супрамолекулярной структуры молекул ДНК.

1. Gorovoy, Y. The Relationship between Symmetry and Specific Properties of Supramolecular Systems. *Symmetry* 2022, 14, 2070. <https://doi.org/10.3390/sym14102070>

2. Андроникашвили Э.Л., Мревлишвили Г.М. Низкотемпературная теплоемкость ДНК//УФН. 1986. Том. 150 Вып. 4. Стр. 625-628

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

Влияние амфотерицина В на цитоархитектонику эритроцитов крови доноров

Литвинов Н.В.^{1*}, Соколова Л.О.¹, Калаева Е.А.¹, Свекло Л.С.², Артюхов В.Г.¹

¹ФГБОУ ВО "Воронежский государственный университет";

²БУЗ ВО "Воронежская областная станция переливания крови";

litvinov.nikolai97@inbox.ru

Применяемый для лечения инвазивных грибковых заболеваний полиеновый антибиотик «Амфотерицин В» [2] может использоваться в качестве флуоресцентного зонда, благодаря своей способности связываться с холестерином, в том числе в составе мембран, и формировать с ним флуорогенные комплексы [1]. Механизмы взаимодействий данного антибиотика с биологическими мембранами сложны и подлежат дальнейшим исследованиям.

В связи с вышеизложенным целью данной работы явилось исследование влияния амфотерицина В на цитоархитектонику эритроцитов крови человека. Эритроцитарные клетки из крови доноров получали по стандартной методике [3]. Полученная суспензия эритроцитов была доведена до концентрации 106 кл./мл. Затем к 4 мл эритроцитарной суспензии добавляли 1 мл амфотерицина В в концентрациях $2,5 \cdot 10^{-5}$ и $5,4 \cdot 10^{-5}$ М.

Поверхностную архитектуру эритроцитов крови доноров изучали на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM 6380-LV (Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета (URL: <http://ckp.vsu.ru>). Для детального анализа характера изменений поверхностной архитектуры эритроцитов рассчитывали следующие показатели (в %): количество дискоцитов (Д); количество обратимо деформированных эритроцитов (ОД); количество необратимо деформированных эритроцитов (НД); индекс трансформации (ИТ), представляющий собой соотношение количества патологических и нормальных форм эритроцитов; индекс обратимой трансформации (ИОТ) – соотношение обратимо деформированных и нормальных форм эритроцитов; индекс необратимой трансформации (ИНОТ) – соотношение необратимо деформированных и нормальных форм эритроцитов [4].

Контрольный образец суспензии содержал 93,9 % дискоцитов, 4,2 % ОД клеток и 2,0 % НД эритроцитов. Показатели индексов трансформации имели следующие значения: ИТ = $0,066 \pm 0,004$ %; ИОТ = $0,045 \pm 0,003$ %; ИНОТ = $0,021 \pm 0,002$ %. Данные параметры цитоархитектоники соответствуют морфологическому профилю эритроцитарных клеток здорового человека и согласуются с результатами исследований, проведенных ранее на кафедре биофизики и биотехнологии ВГУ [4, 5]. После инкубации эритроцитарных клеток с амфотерицином В в концентрациях $2,5 \cdot 10^{-5}$ и $5,4 \cdot 10^{-5}$ М в течение 15 минут наблюдалось снижение уровня дискоцитов до 3,6 и 6,2 % соответственно, при этом было отмечено повышение ОД до 11,4 и 8,6 %; НД до 20,4 и 26,8 %; ИТ до 11,0 и

7,4 %; ИОТ до 3,7 и 1,4 % и ИНОТ до 7,3 и 6,0 % по сравнению с интактными образцами. Также в исследуемых образцах после инкубации с антибиотиком наблюдалось значительное увеличение количества сфероцитов, эхиноцитов, эритроцитов в виде «тутовой ягоды» и клеток с одним и с множественными выростами.

Таким образом, воздействие амфотерицина В на суспензии эритроцитов способствовало повышению числа обратимо и необратимо деформированных клеток в образцах. Среди выявленных форм эритроцитов наблюдалось увеличение количества клеток с одним и с множественными выростами, а также сфероцитов, эхиноцитов и эритроцитов в виде «тутовой ягоды», что свидетельствует о нарушении эластичности эритроцитарной мембраны вследствие экстракции холестерина из нее.

Библиографические ссылки

1. Amphotericin B as a Cholesterol Identifier in Human Erythrocyte's Membrane / Kalaeva E.A., Sokolova L.O., Artyukhov V.G., Nakvasina M.A., Putintseva O.V. // *Opera Medica et Physiologia*. — 2022. — Vol. 9. — № 1. — P. 42-48.

2. The in-vitro study of novel phospholipid micelles loaded with amphotericin B on plasmodium falciparum protozoan / Rajablou K., Attar H., Sadjady S. K., Heydarinasab A. // *Chemistry and Physics of Lipids*. — 2022. — Vol. 245. — P.1-7.

3. Артюхов В.Г. Практикум по биофизике / В.Г. Артюхов [и др.] — Воронеж: Изд-во ВГУ, 2016. — 294 с.

4. Влияние коротковолнового УФ-света (254 нм) на цитоархитектонику и спектральные характеристики эритроцитов крови доноров / Соколова Л.О., Путинцева О.В., Артюхов В.Г. // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2021: материалы XVI международной научной конференции, 13-17 сентября 2021 г. — Севастополь. — С.169-170.

5. Применение метода сканирующей электронной микроскопии в клинично-лабораторной диагностике деформации мембран эритроцитов крови человека / Соколова Л.О., Корвякова П.В., Автаев Д.В., Путинцева О.В., Артюхов В.Г. // Тезисы докладов 74-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых, посвященной памяти проф. А.П. Веселова, 20–23 апреля 2021 г. — Н. Новгород, Университет Лобачевского. — С. 205-206.

Влияние мультипликативного шума на выходной сигнал ДНК-биосенсора

Аракелян В.Б.¹, Алоян Л.¹, Парсаданян М.А.¹, Вардеванян П.О.^{1*}

¹*Ереванский государственный университет;*

p.vardevanyan@ysu.am

Наиболее важным из всех видов биосенсоров, является ДНК-биосенсор. Актуальность этих биосенсоров связана с тем, что они применяются для решения широкого круга фундаментальных и прикладных задач в областях биомедицины, фармакологии, молекулярной биологии, а также генетической диагностики. Главными преимуществами ДНК-биосенсоров являются высокая чувствительность и селективность, а также высокая скорость анализа, несопоставимо более высокая, чем скорость традиционных аналитических методов.

Несмотря на значительные успехи, при использовании ДНК-биосенсоров в научных и прикладных исследованиях, ряд задачи, связанные с усовершенствованием ДНК-биосенсоров остаются нерешенными. Это в основном проблемы связанные с уменьшением шума выходного сигнала ДНК-биосенсора. Это обстоятельство диктует необходимость более детального исследования процесса формирования выходного сигнала, с целью выявить возможные типы и источники шумов, а также характерные особенности этих шумов. В подавляющем большинстве случаев ДНК-биосенсор “работает” в среде, свойства которой нестрогие постоянны, а случайно флуктуируют и эти случайные флуктуации среды неизбежно приводят к флуктуациям выходного сигнала ДНК-биосенсора. Этот тип шума называют внешним шумом [1].

Показано, что выходной сигнал ДНК-биосенсора сложным образом зависит от действия внешнего шума. В зависимости от того какой параметр адсорбционной системы флуктуирует под воздействием внешнего шума, выходной сигнал может быть подвергнут действию как ланжевеновского, так и мультипликативного шума. Если под действием внешнего шума флуктуирует число адсорбционных центров, что может происходить в результате изменения сродства адсорбционного центра под воздействием случайно изменяющихся факторов внешней среды, то этот шум ланжевеновский. Если же под действием внешнего шума флуктуирует количество лигандов в растворе, то этот шум оказывается мультипликативным [2]. Действие ланжевеновского и мультипликативного шумов на выходной сигнал ДНК-биосенсора количественно и качественно отличаются друг от друга. Для случая малого заполнения получено стохастическое дифференциальное уравнение (СДУ) мультипликативного типа, описывающее изменение во времени числа адсорбированных лигандов на ДНК-дуплексах. Далее для СДУ пишется соответствующее уравнение Фоккера-Планка, а затем используя это уравнение получаем уравнение для моментов. Поскольку флуктуирующий параметр аппроксимируем гауссовским белым шумом, то в этом случае СДУ интерпретируется в смысле Стратоновича. Вычислив первый и второй момент

определяем дисперсию адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов. Далее принимая, что выходной сигнал ДНК-биосенсора через единицу площади биосенсора, обусловленный адсорбцией лигандов на ДНК-дуплексе, пропорционален числу адсорбированных на ДНК-дуплексе лигандов, определяем зависимость нестационарной дисперсии от времени.

Анализ стационарной дисперсии выходного сигнала ДНК-биосенсора при малых значениях интенсивности внешнего шума показывает, что флуктуации выходного сигнала ДНК-биосенсора линейно зависят от интенсивности внешнего шума. Показано также, что с ростом концентрации лигандов в растворе флуктуации выходного сигнала ДНК-биосенсора уменьшаются.

Полученные результаты позволяют из анализа шумовых особенностей выходного сигнала ДНК-биосенсора определить возможные типы и источник шума.

1. Arakelyan V.B., Haroutian S.G., Arakelyan H.V., Haroutian T.S. Adsorption of Ligands on Macromolecules in the Fluctuating Medium. 2002, vol.20, N 1, pp.135-139.

2. Аракелян В.Б., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Шагинян М.А., Вардеванян П.О. Изменение выходного сигнала ДНК-биосенсора, индуцированного адсорбцией лигандов на дуплексы ДНК в флуктуирующей среде. Биофизика, 2020, том 65, № 4, с. 670–675

Влияние пектина на процесс электроолимеризации метиленового синего и толуидинового синего

Рябов Е.И.^{1*}, Черенков И.А.¹, Новаковская М.В.¹

¹Удмуртский государственный университет;
r-expert@list.ru

При разработке модельных и аналитических биосистем широко используются электроактивные красители фенозинового ряда – метиленовый синий и толуидиновый синий. Красители применяются как в мономерной форме, так и в виде электроактивных полимерных плёнок. С целью оценки электрохимической активности и биосовместимости полимерных плёнок обоих красителей – метиленового синего (МС) и толуидинового синего (ТС), полученных в присутствии природных пектинов, и оценки возможности дальнейших исследований в отношении живых клеток на полученных электроактивных подложках, в частности поведения клеток перитонеального смыва (КПС) в ответ на активацию внесением липополисахарида (ЛПС), были получены и охарактеризованы указанные электроактивные материалы.

В ходе работы была принята единая схема полимеризации, применяемая к обоим красителям. Для получения электроактивных полимеров к растворам МС и ТС (0,5 мМ) добавляли эквивалентные количества растворов пектина с концентрацией 3% (масс.) и проводили электрополимеризацию (ЭП), используя трис-НСI (рН 8,31) в качестве фонового электролита. Рабочий диапазон ЭП +1200...-450 мВ (для реакционной системы с МС) и +1200...-700 мВ (для реакционной системы с ТС). Остаточную активность полимеров оценивали в диапазоне потенциалов +600...-600 мВ (для реакционной системы с МС) и +700...-700 мВ (для реакционной системы с ТС). Характеризующие циклические вольтамперограммы (ЦВА) процессов ЭП МС и ТС, а также ЦВА остаточной активности позволяют предположить формирование электроактивных полимеров на поверхности рабочих электродов.

На ЦВА в процессе ЭП МС можно выделить три характерных области. При высоких положительных потенциалах происходит необратимое окисление мономеров. В этой области в присутствии пектина значения токов окисления оказались несколько выше (2,10 мкА), наблюдаемых при ЭП без полисахарида (1,86 мкА). По мере прохождения циклов токи в этой области снижаются.

Вторая характерная часть ЦВА ЭП МС – область потенциалов -200...-450 мВ характеризует превращения мономерных форм. Эффект пектина заключается в ограничении электрохимических превращений красителей – токи окисления и восстановления существенно ниже (достигают -1,35 мкА и 0,44 мкА), если в среде присутствует пектин.

Заметные изменения отмечены в области ЦВА, соответствующей наращиванию полимерных форм МС. Это пики электроокисления и электровосстановления смещённые в сторону положительных потенциалов относительно электрохимических превращений мономера и нарастающие по мере прохождения циклов. В пектинсодержащем электролите значения потенциалов соответствующие электроокислению полимера ($E \sim -100$ мВ) смещены относительно показателей, полученных при полимеризации без полисахарида ($E \sim -150$ мВ). Значения токов при этом оказались близкими (-0,40 мкА и -0,60 мкА, соответственно). Потенциалы, соответствующие процессу электровосстановления полимера, практически равны ($E \sim 150$ мВ), при этом значения токов восстановления в конце полимеризации были выше в присутствии пектина.

На ЦВА в процессе ЭП ТС можно выделить три характерных области. При высоких положительных потенциалах происходит необратимое окисление мономерной формы ТС. В этой области в присутствии пектина

значения токов окисления оказались значительно ниже (0,8 мкА), наблюдаемых при ЭП ТС без полисахарида (3,0 мкА). По мере прохождения циклов в реакционной системе с ТС токи в этой области остаются неизменными.

Вторая характерная часть ЦВА ЭП ТС – область потенциалов 550...-250 мВ характеризует превращения мономерных форм. Эффект пектина заключается в ограничении электрохимических превращений красителя, сопровождающиеся не только снижением величин регистрируемых токов (от суммарная величина изменения более 3,5 мкА до 0,2 мкА), но и сдвигом потенциалов (из областей 300... -250 мВ до -250...-400 мВ), если в среде присутствует пектин.

Заметные изменения отмечены на ЦВА, отражающей процессы полимеризации ТС. В присутствии пектина происходит резкое снижение величины регистрируемой силы тока в системе (при этом наблюдаются значительные отличия в силе тока на первом и 20 цикле полимеризации -0,2 мкА и -0,4 мкА соответственно для полимеризации без полисахарида эти величины составляют -1,4 мкА и -1,8 мкА).

При детальном анализе ЦВА полимеризации ТС в присутствии пектина и без него обнаруживаются дополнительные характеристические признаки в области наращивания полимера (диапазон потенциалов 0...950 мВ в присутствии пектина наблюдается незначительное увеличение величины регистрируемой силы тока по мере прохождения циклов полимеризации, прирост равен 0,2 мкА). Для процесса полимеризации ТС в отсутствии полисахарида этот диапазон потенциалов существенно ниже и находится в интервале 500... 1000 мВ.

Таким образом, можно отметить неравнозначное электрохимическое поведение реакционных описанных систем при равных концентрациях электроактивных красителей. При исследовании отклика полимерных форм ТС и МС, полученных в присутствии пектина, в ответ на внесение клеток перитонеального смыва установлены изменения в характеризующих графиках ЦВА. Что подтверждает возможность дальнейшего изучения свойств полученных полимерных форм электроактивных красителей.

Влияние структурной организации нуклеиновых кислот на взаимодействие с гипохлоритом

Осинникова Д.Н.^{1*}, Морошкина Е.Б.¹, Павлова К.И.¹, Поляничко А.М.¹

¹СПбГУ;

d.osinnikova@spbu.ru

Взаимодействие реакционно-активных хлорсодержащих соединений с различными биоорганическими молекулами, такими как амины, аминокислоты, белки, липиды, углеводы и нуклеиновые кислоты находится в фокусе постоянного внимания не только химиков, но молекулярных биологов и медиков. Особое практическое значение имеет исследование химических механизмов образования различных производных хлора в физиологических условиях. Одними из таких соединений являются гипохлориты – соли хлорноватистой кислоты. Будучи сильным окислителем, хлорноватистая кислота выполняет роль естественного антисептика. При развитии воспалительных реакций выработка гипохлорита в организме может приводить к повреждению тканей и провоцировать развитие злокачественных новообразований.

Действие гипохлорита на различные биологические молекулы в живой клетке активно изучается на протяжении ряда лет. Вместе с тем, вопрос о влиянии структурной организации нуклеиновых кислот на их взаимодействие с гипохлоритом остается существенно менее изученным. На сегодняшний день имеются лишь немногочисленные работы, в которых проводился косвенный анализ влияния гипохлорита на пространственную структуру ДНК.

В данной работе методами УФ и ИК спектроскопии проведен анализ влияния структуры нуклеиновых кислот на протекание реакции с гипохлоритом на примере трех наиболее распространенных и биологически значимых типов нуклеиновых кислот: двунитевая ДНК в В-форме, одонитевая РНК, а также нуклеотид фосфаты. Было показано, что структурная организация нуклеиновых кислот существенно влияет на их взаимодействие с гипохлоритом. Наличие стабилизированных водородными связями комплементарных пар оснований, по всей видимости, является лимитирующим фактором начала реакции гипохлорита с эндоциклическими атомами азота. Вместе с тем, полимерная структура нуклеиновых кислот существенно ускоряет и повышает эффективность последующих стадий реакции, связанных с хлорированием экзоциклических атомов азота и разрушением кольцевой структуры азотистых оснований.

**Влияние сывороточного альбумина на связывание фактора роста эндотелия сосудов
(VEGF-A165) с моноклональным антителом бевацизумаб**

Шевелёва М.П.^{1*}, Немашкалова Е.Л.¹, Дерюшева Е.И.¹

¹ИБП РАН - ФИЦ ПНЦБИ РАН;

marina.shevel'yova@gmail.com

Современная терапия и диагностика при различных патогенных состояниях, включая рак, основана на применении специфических полноразмерных антител и их фрагментов: на сегодняшний день около трети от общего количества белков, применяемых в терапии различных заболеваний, составляют антитела. Лабораторные методы *in vitro*, используемые при разработке антител наибольшей аффинности и специфичности, такие как поверхностный плазмонный резонанс, иммуноферментный анализ, биослойная интерферометрия и другие, предполагают использование стандартных физиологических буферов. Однако реальные *in vivo* условия, в которых антитела должны проявлять свою аффинность и стабильность, отличаются присутствием молекул различной природы, характерных для физиологических жидкостей человека. В плазме крови и межклеточной жидкости, являющихся обычными средами для функционирования антител, необходимо учитывать такие мажорные компоненты, как сывороточный альбумин (ЧСА), содержание которого в плазме крови достигает 60% от общей массы белков, а также низкомолекулярные компоненты и ионы. Понимание механизма действия таких добавок позволит повышать эффективность антител.

Семейство факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) является важнейшим регулятором целого ряда физиологических и патологических процессов. К физиологическим эффектам данного семейства можно отнести участие в васкулогенезе, заживлении ран, формировании костей, процессах роста и развития. Рецепторы к данному фактору присутствуют как на эндотелиальных, так и на других типах клеток, чем обусловлены множественные эффекты VEGF. Среди патологических процессов, в которых участвует VEGF, можно выделить онкологические заболевания (такие как рак молочной железы, лейкозы, глиобластома, колоректальный рак), макулодистрофия, преэклампсия, диабетическая ретинопатия. В связи с этим VEGF стал одной из мишеней воздействия при лечении указанных заболеваний. Широкое применение получили препараты на основе антител к VEGF. Коммерческий препарат авастин (действующее вещество бевацизумаб) представляет собой рекомбинантное гиперхимерное гуманизированное моноклональное антитело, содержащее полностью человеческие каркасные участки с определяющими комплементарность участками гиперхимерного антитела мыши, которые связываются с VEGF.

В данной работе было проведено исследование влияния ЧСА на процесс связывания VEGF-A165 — наиболее распространенного и важного из факторов роста — и моноклонального антитела бевацизумаба методом интерферометрии поверхностного био-слоя (ИПС) с использованием OCTET QKE SYSTEM. VEGF-A165 (0,5 мкМ) иммобилизовали химически через аминокислотные группы на поверхности биосенсора. Концентрация бевацизумаба в экспериментах составила 15 и 20 нМ. В качестве целевой добавки использовался сывороточный альбумин в концентрациях 60 мкМ и 600 мкМ. Расчет констант взаимодействия лиганда (VEGF-A165) с аналитом (бевацизумабом) проводили с использованием схемы бивалентного аналита с использованием стандартной программы Octet Data Analysis. Равновесная константа диссоциации VEGF-A165 и бевацизумаба (0,15±0,43) нМ, совпадает с литературными данными, при этом добавление сывороточного альбумина в концентрации 600 мкМ увеличило её в 350 раз: (53±45) нМ. В присутствии ЧСА на порядок уменьшилась константа скорости ассоциации, а константа скорости диссоциации увеличилась в 20 раз.

Для проведения *in silico* анализа взаимодействий антиген-бевацизумаба, а также установления возможного механизма влияния сывороточного альбумина на комплекс антиген-антитело, были смоделированы модели полноразмерного антитела и VEGF-A165. Моделирование проводилось на основе доступной кристаллической структуры фрагмента бевацизумаба (мутантная форма), доступной в PDB банке (PDB код 6BFT) и предсказанными серверами AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) и I-Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) тяжелой и легкой цепей бевацизумаба. В качестве основы для моделирования VEGF были взяты трехмерные структуры доменов RBD (рецептор-связывающий домен) и HBD (гепарин-связывающий домен): 2VPF и 1VGH, соответственно. Гомодимерная форма белка VEGF-A165 была предсказана сервером AlphaFold в режиме мультимера. Выравнивание, уточнение и визуализация трехмерных структур осуществлялись с помощью PyMOL v.2.5, онлайн сервиса Pairwise Structure Alignment RCSB PDB и сервера Stride. Расчет содержания элементов вторичной структуры в модели VEGF-A165, а также линейные размеры молекулы соответствовали экспериментальным данным, полученным методами кругового дихроизма и динамического рассеяния света. Для моделирования комплексов VEGF-A165–бевацизумаб, ЧСА-бевацизумаб, VEGF-A165–ЧСА, а также их тройного комплекса использовался сервер ClusPro. Выявлено частичное перекрытие областей связывания VEGF-A165–ЧСА и VEGF-A165–бевацизумаб, что может объяснять изменение равновесной константы диссоциации.

Таким образом, впервые были получены данные о степени влияния

ЧСА на взаимодействие бевацизумаба с VEGF-A165, что может учитываться при терапии с использованием данного антитела, а также разработке других терапевтических антител с максимальной специфичностью к мишеням в различных условиях и функциональной стабильностью.

Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ № 22-24-00083 (Е.И. Дерюшева)

Влияние электростатического окружения на спектральные свойства каротиноидов

Ярошевич И.А.^{1*}, Мамчур А.А.¹
¹МГУ, биологический факультет;
iyapromo@gmail.com

Каротиноиды являются одним из самых распространенных классов биологических пигментов. Спектральные свойства этих молекул определяются их сопряженной электронной π -системой, свойства которой зависят от локального окружения. Каротенопротеины – стехиометрические комплексы белка и каротиноидов, позволяют модифицировать структурированное окружение связанных пигментов, что приведет к изменению их спектральных свойств. В этой работе мы создали трехмерную карту влияния электрического заряда на смещение спектра поглощения кантоксантина. Основным методом исследования является вычислительная квантовая химия, в частности теория функционала матрицы плотности с временным разрешением (TDDFT). Этот подход уже был использован в рациональном дизайне пигментов на основании люмифлавина [1], но теперь применен для значительно более крупных объектов – С40-каротиноидов. Проекции полученных карт могут быть использованы для прогнозирования спектральных изменений новых мутантных форм каротенопротеинов, которые необходимы в рамках их рационального дизайна.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00012 (<https://rscf.ru/project/22-74-00012/>).

1. Kabir M. P., Orozco-Gonzalez Y., Gozem S. Electronic spectra of flavin in different redox and protonation states: a computational perspective on the effect of the electrostatic environment //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2019. – Т. 21. – №. 30. – С. 16526-16537.

Возможный полиморфизм неканонических структур, образующихся при контактах ДНК, содержащих G-повторы и C-повторы: стратегия моделирования, классификация и наиболее вероятные формы

Цветков В.Б.^{1,2*}
¹Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова;
²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю.М. Лопухина;
v.b.tsvetkov@gmail.com

В этом исследовании мною были использованы методы молекулярного моделирования, чтобы изучить все возможные структуры контактов между (G3T)_nG3/(C3A)_nC3-содержащими дуплексами с учетом всех возможных квадруплексных (G4) и i-мотивных (IM) форм, а также вариативности их локализации друг относительно друга, как с наличием обменов, обхватов цепей, так и без них. Были рассмотрены последовательности с разным количеством повторов G/C. Для оценки изменения в структурах в процессе моделирования при тестировании их устойчивости, мною была предложена и использована система специфичных для G4/IM геометрических параметров, описывающих локализацию нуклеотидов в неканонических формах друг относительно друга. С помощью оценки основных вкладов в свободную энергию смоделированных структур в рамках подхода Обобщённого Борна были определены наиболее вероятные из них. Проведённое мною исследование позволило предположить и смоделировать значительно большее число вариантов возможных контактов посредством неканонических форм по сравнению с тем, что было предложено ранее на основании схематического подхода. Геометрия этих форм оказалась существенно сложнее и разнообразнее ранее описанных случаев неканонических структур. Моделирование позволило установить множество новых форм укладки цепей, содержащих G и/или C повторы, в неканонические структуры, которые никогда ранее не рассматривались. Опубликованные ранее гипотезы о структуре G/C-богатых ДНК-ДНК-контактов, образующихся при взаимодействии энхансер-промотор, петлеобразовании хроматина, транслокации и некоторых других этапах реорганизации хроматина, содержали лишь упрощенные модели контактов

посредством переплетения цепей или укладку внешних тетрад в G4s. В большинстве случаев учитывались только G4s, хотя в ядрах живых клеток существуют как G4s, так и IMs. Кроме того, схемы опирались на доступную классификацию структур G4s, описанную для коротких одноцепочечных олигонуклеотидов. Применяемый ранее схематический подход не позволял авторам отразить всё разнообразие дуплексных контактов. В частности, в данном исследовании впервые была рассмотрена возможность обмена цепями посредством образования G4/IM, а предложенные мною крестообразные структуры комплексов значительно сложнее тех, что предложил Холлидей и содержат G4s/IMs на границе центральной «дыры». Также, мною впервые была предсказана и изучена возможность формирования стопок, сформированных из право- и левозакрученных квадруплексов и слоёв, сформированных из квадруплексных сеток. Рассмотренные мною структуры позволяют предположить возможно каким образом и какие неканонические структуры формируются при обмене цепями дуплексов, содержащих G-повторы и C-повторы в процессе гомологической рекомбинации. Для реализации данного исследования была использована разработанная мною стратегия, нацеленная на создание моделей G4/IM любой сложности, которую можно использовать для *in silico* исследований неканонических структур ДНК и РНК. Данная стратегия включает следующие ключевые шаги. Сначала получают 3D-модели всех возможных G4 и IM для данной последовательности и объединяют их в различных ориентациях относительно друг друга с учетом возможности переплетения/блокировки нитей. Затем добавляются дуплексные фланги. Полученные модели проверяются на наличие внутренних стерических затруднений, а все геометрически невозможные отбрасываются. Затем оставшиеся структуры подвергаются МД-моделированию для проверки их устойчивости на основе вкладов в свободную энергию для определения наиболее вероятного варианта. Описанные мною структуры могут служить отправной точкой для моделирования аналогичных и, возможно, более сложных систем ДНК и РНК. Предлагаемая стратегия мною структурного *in silico* анализа ДНК, богатой G/C, может стать полезной альтернативой структурным исследованиям на основе РСА, криомикроскопии или ЯМР, которые редко возможны для конформационно полиморфных нуклеиновых кислот. Результаты данного исследования опубликованы в bioRxiv: <https://doi.org/10.1101/2022.10.10.511558>

ДНК, синтезированная *ab initio* ДНК полимеразой Bst в присутствии никующих эндонуклеаз и особенности ее структуры - потенциальная платформа для получения новых биоматериалов

Зырина Н.В.^{1,2*}, Антипова В.Н.², Ревегук З.В.³

¹ИБП РАН, Пущино, Россия;

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

³Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники,
Санкт-Петербург, Россия;
zyrina.nv@gmail.com

Актуальные технологии создания биоматериалов на основе ДНК требуют развития методологических основ, которые позволят упростить и удешевить получение большого количества ДНК. Синтез ДНК *ab initio* – неканонический синтез термофильными ДНК-полимеразами прокариот д.ц. ДНК только из дНТФ. Нами обнаружен чрезвычайно эффективный синтез ДНК *ab initio* полимеразой Bst в присутствии никующих эндонуклеаз (никаз) Nt.BspD6I, Nt.AlwI, Nb.BbvCI и Nb.BsmI. Последовательности ДНК состояли из коротких повторов палиндромов (Nt.AlwI, Nb.BbvCI, и Nb.BsmI) или непалиндромов (Nt.BspD6I), содержащих несколько сайтов узнавания никаз и небольшую случайную АТ-богатую последовательность. 1 ед. акт. ДНК полимеразы Bst синтезировала за 1,5 часа более 10 мкг ДНК. В присутствии большого количества никазы синтезировались «низкомолекулярные» продукты размером 1-2 тыс. п.о. Уменьшение количества никазы приводило к увеличению размера продуктов до сотен тыс. п.о. ДНК размером 1-2 тыс. п.о. легко расщеплялась рестриктазами, сайт узнавания которых совпадал с сайтом узнавания никаз, участвовавших в синтезе. При увеличении длины молекул до 20 тыс. п.о. и более их было почти невозможно гидролизовать этими же рестриктазами. Все продукты полностью расщеплялись нуклеазой Mung bean, специфичной к о.ц. участкам, возникающим в месте петель и разветвленных структур. Атомно-силовая микроскопия показала, что высокомолекулярная ДНК в основном представлена длинными линейными д.ц. молекулами, содержащие о.ц. и трехцепочечные сегменты. Большое количество разветвленных участков этой ДНК формирует сетчатую структуру. Низкомолекулярная ДНК не формировала сети и состояла из одиночных линейных д.ц. молекул с небольшим количеством участков ветвления. Так, синтез *ab initio* позволяет задавать последовательность и длину ДНК и приводит к образованию продуктов, имеющих сложные пространственные структуры. Являясь

недорогой и эффективной, эта реакция представляется перспективной для разработки биоматериалов на основе ДНК.

Дезоксигенация глобинов в присутствии митохондрий. Электростатическое взаимодействие глобинов с фосфолипидными мембранами

Постникова Г.Б.^{1*}, Шеховцова Е.А.¹, Сивожелезов В.С.¹

¹*Институт биофизики клетки РАН;*

shekhovtsova.ekaterina@mail.ru

Отщепление кислорода от оксимиоглобина (MbO₂) кашалота, как мы ранее показали, происходит только при взаимодействии его с митохондриями (МХ) и полностью определяется интенсивностью их дыхания. Аналогично протекает дезоксигенация и других оксиглобинов из разных организмов, поэтому можно предполагать сходный механизм их взаимодействия с фосфолипидными МХ мембранами. В работе проанализирована роль электростатических взаимодействий в стабилизации нативной конформации гемовой полости в структурах девяти Mb-подобных глобинов: мономерных миоглобинов (кашалота, лошади, моллюска *Aplysia limacina*) и гемоглобинов (комара *Chironomus thummi thummi*, плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, моллюска *Lucina pectinata* и леггемоглобина сои), а также димерных гемоглобинов (моллюска *Lucina pectinata* и личинок овода *Gasterophilus intestinalis*). Имея гомологичные 3D-структуры и проксимальный His в качестве пятого лиганда гема, эти глобины различаются дистальной частью гемовой полости и сродством к кислороду (в ~ 100 раз). Показано, что нативная структура гемовой полости поддерживается сетью водородных и ионных связей с участием проксимального His, дистального остатка белка, обоих А- и D-пропионатов гема и соседних Arg и Lys белка. С проксимальной стороны гема эта сеть контролирует положение атома Fe вне- или в плоскости протопорфирина, влияющее на сродство к лиганду, а в дистальной части – позицию дистального His, Gln или Arg, в которой тот способен образовать Н-связь с лигандом кислородом, препятствуя его быстрой диссоциации. При связывании с митохондриями найденные сети ионных и Н-связей должны нарушаться под влиянием отрицательного поля митохондриальной мембраны и контактов головок фосфолипидов, конкурирующих с А- и D-пропионатами за связывание с экспонированными в сторону мембраны Arg и Lys белка. Это приводит к уменьшению сродства глобина к кислороду, облегчая его отщепление при значениях pO₂ ~15 mmHg в условиях гипоксии.

Димеризация трансмембранных доменов рецепторов подсемейства рецепторов инсулина

Бершадский Я.В.^{1,2*}, Надеждин К.Д.¹, Бочарова О.В.¹, Арсеньев А.С.¹, Бочаров Э.В.^{1,2}

¹*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук;*

²*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет);*
yaroslav.bershatskiy@phystech.edu

Рецепторные тирозинкиназы (РТК), сгруппированные в 20 подсемейств, играют ключевую роль в разнообразной клеточной активности, участвуя в различных процессах, сигнальных путях и отвечая за ключевые события в работе организма. Подсемейство рецепторов инсулина, одно из подсемейств РТК, содержит три рецептора: рецептор инсулина (IR), рецептор инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1R) и рецептор подобный инсулиновому (IRR). Нарушение функции рецепторов связано с развитием таких заболеваний как диабет, рак и болезнь Альцгеймера. Несмотря на высокую взаимную гомологию последовательности и структуры, локализация, экспрессия и функции рецепторов подсемейства сильно различаются.

В структуре РТК выделяют 3 домена: лиганд-связывающий внеклеточный домен, трансмембранный домен (ТМ) и каталитический внутриклеточный домен. Структура семейства рецепторов инсулина выделяется среди других РТК. Мономеры рецепторов подсемейства состоят из двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидной связью. В мембране клетки рецепторы существуют исключительно в форме ковалентно связанных димеров.

В этой работе мы изучили димеризацию ТМ доменов InsR, IGF1R и IRR, с помощью ЯМР-спектроскопии. Нами были получены структуры всех ТМ доменов в мицеллах детергента в димерной форме, а также данные о динамике ТМ доменов в мембрано-подобной среде. Несмотря на высокую гомологию последовательностей

рецепторов, полученные структуры ТМ доменов отличаются не только структурно, но и динамически, что может указывать на характерные различия в передаче сигнала.

ЯМР-исследования и биотехнологические работы были поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 23-44-10021).

Динамические структурные особенности формирования аквакомплекса белка из рыбы *Myoxocephalus octodecemspinosus*, способного связываться со льдом, полученные на основе метода HDX-MS

Баранова С.В.^{1*}, Жданова П.¹, Олейник Г.А.¹, Черносонов А.А.¹, Коваль В.В.^{1,2}

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия;*

²*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск,
Россия;*

swb@niboch.nsc.ru

Белки, способные связывать лед (IBP), представляют собой особый класс белков, которые помогают организмам выживать в холодных экосистемах. Этот класс белков контролирует рост льда, связываясь с его поверхностью, и помогает живым организмам избежать повреждений от замерзания. Белки, связывающие лед, представляют собой уникальные молекулы, способные связываться со льдом и быть активными на границе раздела двух фаз: твердой и жидкой.

В данной работе мы исследовали структурные особенности одного из представителей класса IBPs: лед-структурирующий белок 4-го типа из *Myoxocephalus octodecemspinosus* (длиннорогий подкаменщик). Целью данной работы является определение структуры белка из рыбы длиннорогий подкаменщик методом HDX-MS и провести молекулярно-динамическое моделирование структуры комплекса белка со льдом.

В ходе работы составлена пептидная карта белка и проведены эксперименты с использованием метода HDX-MS для определения его трехмерной структуры. Методами компьютерного моделирования получена структура IBP в комплексе со льдом, определены аминокислотные остатки образующие водородные связи с поверхностью льда. Для подготовленной структуры комплекса было проведено моделирование по методу молекулярной динамики длительностью 100 нс в силовых полях Amber20.

Комбинацией методов компьютерного моделирования и HDX-MS получено комплексное представление о белке, связывающегося со льдом. Комбинация этих методов используется при изучении многих белков и макромолекулярных комплексов и имеет ряд преимуществ перед другими биофизическими подходами. Одним из таких преимуществ является возможность изучения белка в растворе.

Уникальные свойства лед-связывающих белков нашли применение в пищевой промышленности, сельском хозяйстве, криоконсервации для сохранения биологических образцов при низких температурах. Тем не менее, идентификация структурных особенностей лед-связывающих белков может помочь в оптимальном выборе стратегии синтеза, для улучшения свойств и выхода конечного продукта. Успешное воплощение естественной криозащитной способности связывающих лед белков имеет большие перспективы, но все еще находится в зачаточном состоянии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 23-24-00256.

Дисмутация гидропероксидов иммуноглобулинами класса G in vitro

Смирнова Л.П.^{1*}, Казанцева Д.В.¹, Камаева Д.А.¹, Воронина В.С.², Кротенко Н.М.², Иванова С.А.¹

¹*ТНИМЦ;*

²*Сибирский государственный медицинский университет;*

lpimirnova2016@gmail.com

Каталитически активными антителами, или абзимами, называются иммуноглобулины различных классов, обладающие способностью не только связывать антиген, но и катализировать химические реакции. Показано, что природные IgG, IgA и IgM млекопитающих обладают множеством различных каталитических активностей. Каталитически активные антитела обнаружены как при ряде аутоиммунных и воспалительных заболеваний, так и у здоровых людей. Например, первым примером абзимов у здоровых лиц стали IgA молока человека,

катализирующие фосфорилирование белков. Впоследствии были обнаружены липидкиназная и полисахаридкиназная активности этих АТ. У больных с различными аутоиммунными и инфекционными заболеваниями выявлено множество каталитических антител гидролизующих РНК, ДНК, нуклеотиды, липиды, олигопептиды, белки и олигосахариды. Абзимы с оксидоредуктазными активностями начали изучать совсем недавно и пока изучена способность IgG дисмутировать супероксид и гидропероксид водорода. Предполагается, что каталитические антитела с оксидоредуктазными свойствами могут компенсировать дефицит антиоксидантных систем при болезнях и играть важную роль в защите человека от ОС. Генералов с соавторами в 1998 г. показали, что препараты IgG сыворотки крови здоровых доноров и пациентов с различными формами гепатита обладали пероксидазной активностью. В работах А.С. Толмачевой уже в 2015 г. было показано, что IgG, полученные из сыворотки здоровых крыс Wistar, обладают в присутствии H₂O₂ пероксидазной, а в отсутствие H₂O₂- оксидоредуктазной активностью. Более пероксидазная активность IgG не исследовалась. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение наличия и свойств НАДФН-зависимой пероксидазной активности IgG человека в сравнении с аналогичной каталазной активностью.

В качестве материала исследования использовали сыворотку крови здоровых лиц. Для взятия крови использовались пробирки типа Vacuette с активатором образования сгустка. Для отделения сыворотки пробирку центрифугировали при 2000 g 20 минут в центрифуге с охлаждением.

Методы исследования: Очистка IgG осуществлялась методом аффинной хроматографии на колонках с ProteinG-Sepharose на хроматографе AKTA purifier (GE). Диализ антител проводился против 20 mM Na-фосфатного буфера, pH=7,0. Концентрацию IgG определяли на многорежимном ридере Varioskan LUX (Thermo Scientific, США) при 280 нм. Гомогенность выделенных препаратов IgG проверялась методом электрофореза по Леммли в градиентном 4-18% ПААГ. Визуализация гелей проводилась с помощью системы iBright Imaging Systems FL1500 (Thermo Scientific, США приборы размещен на базе ЦКП "Медицинская геномика", ТНИМЦ). Гель-фильтрация в условиях pH-шока проводилась на колонке с Superdex-200 HR 10/30 с использованием 50 mM буфера Gly-HCl, pH 2,6 с предварительной инкубацией IgG с 1 M кислым буфером. НАДФН-зависимую пероксидазную активность Ig G определяли на спектрофотометре SPECORD M-40 (Carl Zeiss) при 340 нм по окислению НАДФН в сопряженной глутатионредуктазной реакции восстановления гидропероксида третичного бутила и выражали в единицах активности U, ($U = \text{мкМ НАДФН/мин/мг IgG}$). Каталазную активность IgG также определяли на спектрофотометре SPECORD M-40 (Carl Zeiss) по снижению концентрации гидроперекиси водорода при добавлении образца. Каталазная активность IgG определялась в единицах активности U, ($U = \text{мкМ H}_2\text{O}_2/\text{мин/мг IgG}$). Ингибиторный анализ проводили с использованием азид натрия (NaN₃) и этилендиаминтетраацетата (ЭДТА), которые являются неспецифическими металлозависимыми ингибиторами. IgG инкубировали с NaN₃ в конечных концентрациях от 1 mM, до 0,005 mM и определяли НАДФН-зависимую пероксидазную активность IgG. Аналогично работали с ЭДТА в концентрациях от 1,25 mM до 50 mM. Для расчета концентрации полумаксимального ингибирования IC₅₀ строился график с помощью онлайн-программы Very Simple IC₅₀ Tool Kit с пакетом GNUPLLOT. Статистическая обработка данных проводилась в программе Statistica 12.0.

В результате проведенного исследования можно сделать заключение о том, что иммуноглобулины G здоровых лиц способны катализировать каталазную и пероксидазную реакции, и что данная активность является собственным свойством изучаемых антител. Для проверки принадлежности изучаемой активности к абзимам, использовали три жестких критерия: выделение IgG на специфическом аффинном сорбенте, электрофоретическая гомогенность антител и сохранение исследуемой активности АТ после гельфильтрации в кислой среде. Выявлено, что азид натрия и 3-амино-1,2,4-триазол ингибировали каталазную активность сывороточных IgG, при этом 3-амино-1,2,4-триазол является более эффективным ингибитором каталазной активности IgG (IC₅₀: 16,06 мкМ против 140 мкМ для азид натрия), поскольку требует меньших концентраций для достижения максимального эффекта. Также азид натрия и ЭДТА ингибировали НАДФН-зависимую пероксидазную активность IgG, подтверждая металлозависимость данной активности у иммуноглобулинов, но оказывали эффект в более высоких, миллимолярных концентрациях. Была также показана обратная корреляционная связь между данными активностями. Корреляционный анализ каталазной и НАДФН-зависимой пероксидазной активностей IgG выявил сильную отрицательную корреляционную связь ($r = -0,85$; $p = 0,001$).

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что наибольший вклад в утилизацию гидроперекисей вносят именно антитела с НАДФН-зависимой пероксидазной активностью, а не с каталазной.

Работа выполнена по теме НИР: Биопсихосоциальные механизмы патогенеза и клинического полиморфизма, адаптационный потенциал и предикторы эффективности терапии у больных с психическими и поведенческими расстройствами в регионе Сибири, регистрационный номер 122020200054-8.

**Зависимость силы мутантных промоторов гена *gtnB* рибосомальной РНК *E.coli* от
параметров электростатического ψ -элемента**

Корчагина В.М.¹, Осипов А.А.^{1*}

¹ИТЭБ РАН;

v.korchagina98@yandex.ru

Целью данной работы было изучение зависимости силы мутантных промоторов гена *gtnB* рибосомальной РНК *E.coli* от параметров электростатического ψ -элемента.

Задачи:

Рассчитать зависимость силы промотора от максимальной величины потенциала в окне длиной в 21 пару оснований в -59 – -38 позиции относительно точки старта транскрипции в соответствии с координатами набора мутантных ψ -элементов.

Рассчитать зависимость силы промотора от суммарной величины потенциала в том же окне.

Методы:

Величина электростатического потенциала ψ -элемента для последовательностей была рассчитана при помощи инструментов базы данных DEPPDB [1, 2]. Сила мутантных промоторов взята из статей Estrem, Ross et. al [3, 4].

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

Результаты:

В ходе исследования было показано, что с увеличением абсолютной величины потенциала ψ -элемента растёт и сила промотора.

При тестировании зависимости суммарного потенциала вокруг его абсолютного минимума в размере 135 А° также прослеживается рост силы промотора при увеличении абсолютной величины потенциала.

Также наблюдается увеличение силы промотора с увеличением абсолютной суммы потенциала в данных координатах

корреляция между минимумами потенциалов полного ψ -элемента и силой промоторов составила 0.5435669 с достоверностью $p\text{-value} = 0.001078$

корреляция между суммой потенциалов в окрестностях минимума полного ψ -элемента и силой промоторов составила 0.3935843 с достоверностью $p\text{-value} = 0.02344$

корреляция между минимумами потенциала проксимальной части ψ -элемента и силой промоторов составила 0.8396514 с достоверностью $p\text{-value} = 0.00463$

корреляция между суммой потенциалов в окрестностях минимума проксимальной части ψ -элемента и силой промоторов составила 0.8301612 с достоверностью $p\text{-value} = 0.005606$

корреляция между минимумами дистальной части ψ -элемента и силой промоторов составила 0.560953 с достоверностью $p\text{-value} = 0.006608$

корреляция между суммой потенциалов в окрестностях минимума дистальной части ψ -элемента и силой промоторов составила 0.5853439 с достоверностью $p\text{-value} = 0.00421$

корреляционное соотношение между минимальными значениями потенциалов и их суммой в окрестностях минимума составило 0.8173967 с достоверностью $p\text{-value} = 3.026\text{e-}16$

Литература:

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

Osyrov, A. A., Krutinin, G. G., Krutinina, E. A., & Kamzolova, S. G. (2012). DEPPDB—dna electrostatic potential properties database: electrostatic properties of genome dna elements. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 10(02), 1241004.

Estrem, S. T., Ross, W., Gaal, T., Chen, Z. S., Niu, W., Ebright, R. H., & Gourse, R. L. (1999). Bacterial promoter architecture: sub-site structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase α subunit. *Genes & development*, 13(16), 2134-2147.

Estrem, S. T., Gaal, T., Ross, W., & Gourse, R. L. (1998). Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 9761-9766.

Изучение влияния ионов серебра на стабильность дуплексов с различной длиной участка цитозин-цитозин

Барышев А.В.^{1*}, Соколов П.А.¹, Касьяненко Н.А.¹
¹Санкт-Петербургский государственный университет;
andry-barash@mail.ru

С момента открытия структуры ДНК ученые не перестают модифицировать её всевозможными способами как для изменения её свойств, так и для получения новых. В качестве такой модификации производится, например, замена уотсон-криковских пар оснований на неканонические пары, опосредованные ионами металлов. В данной работе исследовались пары цитозин-цитозин, опосредованные ионами серебра. Для таких пар ранее уже были показаны высокие химическая и термическая стабильности. Как правило, в статьях изучаются или отдельные пары мисматчей, которые могут быть использованы, например, для детектирования свободных ионов серебра в растворах, или достаточно длинные последовательности цитозинов, формирование структур которых происходит только в присутствии ионов серебра. Кроме того, исследуемые пары оснований могут быть использованы в ДНК-нанотехнологиях или ДНК-оригами, благодаря высокой специфичности связывания серебра с парой цитозин-цитозин. Таким образом, данная тема исследований является актуальной, а результаты, полученные в рамках работы на ней могут быть применены в различных областях наук.

В ходе данного исследования олигонуклеотиды с различной длиной последовательности цитозинов (от 8 до 16), которые обрамлены комплементарными участками длиной. Первоначальными целями исследования были проверка влияния различного числа ионов серебра на образование дуплексов и их стабильность, таким образом данная работа заполнит область между отдельными парами и значительными последовательностями цитозинов. Для этих задач применялись методы плавления и гель-электрофореза. Методом плавления было обнаружено две температуры плавления, одна порядка 30 С. а другая более 40 С, при различном количестве ионов серебра на дуплекс (количество серебра варьировалось от 0 до p , где p – это количество пар цитозин-цитозин в дуплексе). При этом повышение количества серебра приводило к сдвигу на 1-2 С более низкой температуры плавления в область высоких температур, а также появлению более высокой температуры. Измерения проводились в содиум-боратном буфере с рН 7.0 с различной ионной силой. Затем ионы серебра, связанные с цитозинами, восстанавливались боргидридом натрия для проверки формирования нанокластеров серебра. В данной части работы важную роль играла олигонуклеотидная матрица, которая может привести к восстановлению нанокластеров серебра с различными свойствами.

Изучение структуры вирусоподобных частиц SARS-CoV-2 и ротавируса А человека методами крио-электронной, просвечивающей и аналитической микроскопии

Черепушкин С.А.², Моисеенко А.В.¹, Трифонова Т.С.¹, Савочкина Т.Е.², Филатов И.Е.², Карлова М.Г.¹,
Гребенникова Т.В.², Соколова О.С.^{1*}

¹МГУ, биологический факультет;
²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного
академика Н. Ф. Гамалеи;
sokolova184@gmail.com

Вирусоподобные частицы (virus-like particles, VLP) – перспективная платформа для разработки и производства вакцин. На сегодняшний день существуют как зарегистрированные вакцины, так широкий спектр вакцин-кандидатов на основе VLP против различных инфекционных агентов. VLP вакцины обладают большей иммуногенностью по сравнению с субъединичными вакцинами и при этом не содержат нуклеиновых кислот вируса, что делает их более безопасными, чем живые и инактивированные вакцины. VLP имитируют структуру вириона и необходимы методы для изучения структуры частиц и подтверждения их подлинности, а также рутинного контроля качества VLP вакцин. Золотым стандартом для решения этих задач являются различные виды электронной микроскопии, в первую очередь просвечивающая электронная микроскопия. Целью настоящей работы была разработка методов электронной микроскопии для изучения структуры вирусоподобных частиц SARS-CoV-2 и ротавируса А человека.

Вирусоподобные частицы SARS-CoV-2 и ротавируса А человека были получены с использованием бакуловирусной системы экспрессии в клетках насекомых. Культура клеток бабочки *Trichoplusia ni* заражалась несколькими рекомбинантными бакуловирусами, каждый из которых экспрессировал целевой ген структурного

белка вируса. Эти вирусные белки обладают способностью к самосборке с образованием VLP. В состав VLP ротавируса А человека вошли 4 из 6 структурных белков вируса: белки внутреннего слоя VP2 и VP6 и белки внешнего слоя VP4 и VP7. Были получены частицы, состоящие из 2 и из 3 белков: VP2/6, VP2/6-VP7 (генотипы G1, G2, G4, G9) и VP2/6-VP4 (генотипы P4, P8). Также были получены вирусоподобные частицы SARS-CoV-2, состоящие из белков Е, М, N и белка S различных штаммов SARS-CoV-2. VLP были очищены методом ультрацентрифугирования в растворе сахарозы и исследованы методами крио-электронной, просвечивающей и аналитической микроскопии.

Образцы исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) в негативном контрасте, а также с помощью анализа единичных частиц в криоэлектронной микроскопии. ПЭМ-изображения были получены на просвечивающем электронном микроскопе JEOL JEM-2100 при ускоряющем напряжении 200 кВ. Для получения изображений в негативном контрасте использовалась CCD камера Gatan Orius SC200D. Для получения серийных изображений криоэлектронной микроскопии на этом же микроскопе был использован криотрансферный держатель Gatan Elsa, детектор прямого обнаружения электронов Direct Electron DE-20 и ПО SerialEM для сбора данных.

Препараты наносили на стандартные медные сеточки для микроскопии с углеродной подложкой, предварительно гидрофилизированную в тлеющем разряде. Образец на сетке инкубировали 60 секунд при комнатной температуре, затем на сетку наносили каплю 2% раствора ацетата уранила, выдерживали 30 секунд, излишки раствора удаляли с сетки фильтровальной бумагой. По результатам просвечивающей электронной микроскопии образцы VLP ротавируса А гомогенны, обусловленный небольшим количеством агрегатов белка. Средний размер VLP (70-80 нм) соответствует размеру полноразмерного вириона, частицы имеют характерную «колесовидную» форму. Образцы VLP SARS-CoV-2 также гомогенны, размер (около 100 нм) соответствует размеру вирусной частицы.

Для подтверждения белкового состава VLP использовали окрашивание антителами, конъюгированными с коллоидным золотом. Сетки с препаратами помещали на каплю блокирующего раствора 0,3% БСА-ФСБТ. После блокировки сетку помещали на каплю раствора первичных антител (10 мкг/мл в растворе 0,3% БСА-ФСБТ), инкубировали 14 ч при +4°C. После инкубации сетку промывали 3 раза по 5 мин на каплях раствора 0,3% БСА-ФСБТ, затем помещали на каплю раствора вторичных антител, конъюгированных с наночастицами золота (Sigma) в разведении 1:250, инкубировали 14 ч при +4°C. VLP ротавируса А окрашивали антителами к белку VP6, а VLP SARS-CoV-2 антителами к рецептор-связывающему домену белка S. Было показано присутствие соответствующих белков в вирусоподобных частицах.

С помощью анализа единичных частиц по данным криоэлектронной микроскопии был произведен статистический анализ проекций вирионов с помощью двумерной классификации, отобран набор из 2500 проекций вирионов. Из этого набора проекций собрана реконструкция VLP ротавируса А с разрешением 7 Å по FSC. Обработка произведена в ПО Cryosparc. Реконструкция показала, что расположение белков VP2 и VP6 в VLP аналогично вирусной частице. С помощью аналитической микроскопии было продемонстрировано отсутствие нуклеиновой кислоты в VLP ротавируса А.

Таким образом, структура и морфология вирусоподобных частиц по данным электронной микроскопии соответствуют таковым исходных вирионов.

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Изучение электростатической природы белок-лигандного взаимодействия в оранжевом каротиноидном белке

Мамчур А.А.^{1*}, Ярошевич И.А.¹

¹МГУ, биологический факультет;
al.mam4ur@yandex.ru

Оранжевый каротиноидный белок (ОКБ) играет важную роль в фотосинтетическом аппарате цианобактерий. Цианобактерии - древнейшие организмы, осуществляющие оксигенный фотосинтез - сталкиваются с необходимостью нефотохимического тушения на интенсивном свете для предотвращения окислительного стресса. В отличие от зелёных растений, функцию тушителя у цианобактерий выполняет оранжевый каротиноидный белок. ОКБ представляет собой фоторецептор с молекулярной массой 35 кДа, который активируется синим светом. Он состоит из двух доменов - полностью α -спирального N-концевого домена и смешанного α -спирального/ β -листового C-концевого домена, между которыми нековалентно закреплена молекула кантаксантина, необходимая для фотоактивности. При фотоактивации ОКБ переходит в физиологически активное красное состояние посредством образования многочисленных промежуточных

соединений, а квантовый выход такого перехода чрезвычайно низок (около 0,2%). Уникальность ОКБ состоит в том, что это единственный из известных фотоактивных белков, в котором в качестве фоточувствительных хромофоров используются каротиноиды.

В рамках данного исследования был проведён расчёт молекулярной динамики темнового варианта ОКБ длительностью 1 мкс с использованием программного пакета GROMACS версии 2020.1 [1] и силового поля OPLS-AA [2]. Были выбраны шаг интеграции 1 фс и периодические граничные условия. Симуляция проводилась при температуре 300K и давлении 1 атм, которые поддерживались с помощью алгоритмов V-rescale [3] и Parrinello-Rahman [4] соответственно. Для кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий был задан радиус отсечки 12 Å. Электростатические эффекты контролировались алгоритмом PME [5]. Белок был растворён в воде (модель TIP4P), 7 ионов натрия были добавлены для нейтрализации системы. Перед проведением молекулярной динамики система была подвержена процедуре минимизации энергии и последующего нагревания с 5 до 300K. Анализ данных проводился с помощью языка программирования Python версии 3.9.12. Для упрощения анализа атомы пи-сопряжённой цепи кантаксантина были пронумерованы от 0 до 25, начиная с кислорода кето-группы, расположенной ближе к N-концу белка.

Мы рассчитали электростатический потенциал на каждом атоме кантаксантина - сумму потенциалов, созданных атомами белка как точечными зарядами. Было показано падение среднего по траектории электростатического потенциала вдоль пи-сопряжённой цепи кантаксантина с амплитудой 25 мВ. При этом явление оказалось ступенчатым: с 0 до 10 атома происходит линейное падение потенциала на 10 мВ, а с 11 по 22 атом - линейное падение потенциала на 15 мВ с большим углом наклона прямой. Потенциал 22-25 атомов значительно не изменяется и колеблется вокруг отметки -40мВ.

Интересно, что наибольший вклад в формирование электростатического потенциала, созданного белком, вносят аминокислоты ARG155, GLU244, PHE315. Полученные результаты станут основой для дальнейших исследований, предполагающих введение точечных замен и применения квантово-химического подхода для оценки влияния изменений в структуре белка на спектральные свойства каротиноидов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00012.

1. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX. 2015;1-2: 19–25.

2. Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. J Am Chem Soc. 1996;118: 11225–11236.

3. Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. J Chem Phys. 2007;126: 014101.

4. Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. J Appl Phys. 1981;52: 7182–7190.

5. Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG. A smooth particle mesh Ewald method. J Chem Phys. 1995;103: 8577–8593.

Ингибиторы динамической нестабильности микротрубочек на основе кумариновых лигандов колхицинового сайта тубулина

Анисимов М.Н.^{1,2}, Романов А.Н.³, Борзунова Ю.Н.^{1,2}, Джанибекова М.О.⁴, Кечко О.И.⁵, Митькевич В.А.⁵, Воробьев И.А.^{1,4}, Гудимчук Н.Б.^{1,2*}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия;

³Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия;

⁴Назарбаев Университет, Астана, Казахстан;

⁵Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

nikita_gb@mail.ru

Особую роль среди элементов цитоскелета эукариотических клеток играют полимеры белка тубулина, микротрубочки. Микротрубочки участвуют во множестве процессов, в том числе во внутриклеточном транспорте, обеспечении подвижности клетки, а также её делении. Благодаря способности спонтанно переключаться между фазами полимеризации и деполимеризации, называемой динамической нестабильностью, микротрубочки распределяют хромосомы по дочерним клеткам. Подавление динамической нестабильности с помощью ингибиторов тубулина позволяет останавливать неконтролируемое деление злокачественных клеток. Эта стратегия — одна из основ успешной работы противоопухолевых лекарств, постоянный поиск которых является актуальной прикладной задачей.

Одним из самых известных ингибиторов тубулина является колхицин. Несмотря на эффективное подавление пролиферации злокачественных клеток за счет блокирования митоза, это вещество не нашло широкого применения в терапии опухолей по причине высокой общей токсичности. Нами предпринята попытка найти новые колхицин-подобные ингибиторы тубулина на основе следующих критериев: взаимодействие с колхициновым сайтом тубулина, подавление динамической нестабильности микротрубочек и блокирование клеточного деления. Поиск потенциальных новых лигандов осуществлен в базе данных Национального Института Рака США с помощью алгоритма кластеризации COMPARE на основе сравнения профилей противоопухолевой активности веществ по отношению к различным линиям злокачественных клеток человека с профилем противоопухолевой активности колхицина. Выбрано вещество кумарин-30, обладающее ярко выраженными флуоресцентными свойствами. Благодаря этим свойствам нами установлено связывание кумарина-30 с колхициновым сайтом тубулина с помощью метода микротермофореза. Световая микроскопия позволила установить концентрационно-зависимое подавление скорости полимеризации микротрубочек при субстехиометрических концентрациях кумарина-30 и, как следствие, задержку митоза клеток карциномы легких человека. Механизм взаимодействия кумарина-30 с колхициновым сайтом тубулина был исследован экспериментально с помощью применения структурных аналогов — кумарина-6 и -7 и молекулярного докинга. Обнаружено, что, несмотря на небольшие отличия в структуре, эффекты этих веществ на динамику микротрубочек существенно отличаются, что дает информацию о механизме связывания кумарина-30 с колхициновым сайтом тубулина. Создана модель наиболее вероятной структуры комплекса кумарина-30 и тубулина с помощью которой определены возможные пути дальнейших модификаций кумарина-30 для улучшения его противоопухолевых свойств.

Таким образом, нами найден новый колхицин-подобный ингибитор тубулина, а также экспериментально и теоретически изучен его механизм действия. Поиск ингибиторов тубулина выполнен при поддержке гранта РНФ #21-74-20035. Анисимов М.Н. является стипендиатом Фонда развития теоретической физики и математики «БАЗИС».

Исследование взаимодействия излучения Nd:YAG лазера с белковыми растворами

Нагаев Е.И.^{1*}, Саримов Р.М.¹, Матвеева Т.А.¹, Симакин А.В.¹, Баймлер И.В.¹
¹*Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук» ИОФ РАН;*
nagaev_e@kapella.gpi.ru

Воздействие лазерного излучения на свойства белковых растворов является актуальной задачей, так как в последние десятилетия лазеры нашли широкое применение в медицине, в частности, в хирургии. Использование лазеров в качестве лазерного скальпеля позволяет уменьшить последствия, связанные с использованием обычных стальных скальпелей. При использовании лазеров в тканях может происходить абляция, коагуляция, соединение тканей, разрушение тканей посредством образования ударных волн. Исследование влияния оптического пробоя на свойства белков поможет в разработке новых лечебных методик, способных улучшить характеристики уже существующего медицинского оборудования.

В данной работе исследуется влияние оптического пробоя на свойства белковых растворов. В качестве модельных белков были использованы бычий сывороточный альбумин (BSA) и лизоцим, полученный из куриных яиц (HEWL). Явление оптического пробоя в растворах белка практически не изучено, в то время как есть много примеров исследований с металлами и их наночастицами [1]. Образующиеся за счет коротких лазерных импульсов пробои способствуют образованию субмикронных и наночастиц, а также их дальнейшему фрагментированию из исходных частиц микронного размера [2].

Водные растворы белков облучали на установке, подробно описанной в [3]. Использовали наносекундный Nd:YAG лазер с генерацией второй гармоники ($\lambda=532$ нм). Растворы облучали в течение 30 мин. После экспериментов по облучению растворы исследовали оптическими методами (абсорбционная спектроскопия, рефрактометрия, флуоресцентная спектроскопия, рефрактометрия и рамановская спектроскопия).

Результаты показали, что во время экспериментов с белками образовывались акустические волны и плазма. После облучения уменьшалось поглощение белковых растворов в спектральном диапазоне, соответствующему аминокислотным остаткам. В экспериментах по динамическому рассеянию света (ДРС) показано, что пик, соответствующий белковым молекулам, уменьшается, а пики, соответствующие крупным агрегатам (>100 нм), растут. Рамановская спектроскопия показала, что имеет место уменьшение интенсивности на длине волны 1570 см^{-1} , что может говорить о возможной деградации α -спирали. Не было зарегистрировано существенных изменений в показателях преломления и форме флуоресцентных карт. Однако, после облучения раствора лизоцима наблюдалось существенное уменьшение пика связанного с флуоресценцией аминокислот и наблюдался дополнительный пик флуоресценции на длине волны возбуждения 350 нм и 434 нм. Ранее исследователи связывали этот пик с образованием амилоидных фибрилл [4]. Однако дальнейшие исследования с

использованием тиофлавина-Т и спектроскопии кругового дихроизма не показали присутствие амилоидных фибрилл. Таким образом, можно сделать предположение, что в обоих исследуемых образцах имела место частичная денатурация белков и агрегация белков.

[1] Dolgaev S. I. et al. Nanoparticles produced by laser ablation of solids in liquid environment //Applied surface science. – 2002. – Т. 186. – №. 1-4. – С. 546-551.

[2] Hajiesmaeilbaigi F. et al. Preparation of silver nanoparticles by laser ablation and fragmentation in pure water //Laser Physics Letters. – 2005. – Т. 3. – №. 5. – С. 252.

[3] Nagaev E. I. et al. Effect of Laser-Induced Optical Breakdown on the Structure of Bsa Molecules in Aqueous Solutions: An Optical Study //Molecules. – 2022. – Т. 27. – №. 19. – С. 6752.

[4] Jesus C. S. H. et al. Using amyloid autofluorescence as a biomarker for lysozyme aggregation inhibition //Analyst. – 2021. – Т. 146. – №. 7. – С. 2383-2391.

Исследование взаимодействия некоторых ДНК-специфических лигандов с сывороточным альбумином крови

Вардеванян П.О.^{1*}, Парсаданян М.А.¹, Антонян А.П.¹, Шагинян М.А.¹, Петросян Н.Г.¹

¹*Ереванский государственный университет;
p.vardevanyan@ysu.am*

Изучение взаимодействия различных лигандов с транспортными белками является одним из актуальных вопросов, поскольку может лечь в основу понимания воздействия биологически активных соединений на организм. Один из транспортных белков, альбумин, является основным в крови, в функции которого входят депонирование и перенос широкого спектра низко- и высокомолекулярных эндогенных и экзогенных соединений. Учитывая важную роль альбумина нами проведены исследования по взаимодействию ДНК-специфических лигандов, в частности, интеркалятора МС и желобкового соединения Н33258 с этим белком.

Полученные результаты указывают на то, что интеркалятор МС и желобково связывающееся с ДНК соединение Hoechst 33258 связываются альбумином. Однако МС, который взаимодействует с ДНК несколькими способами, среди которых интеркаляционный, относящийся к специфическому типу, при связывании которого с альбумином не проявляется какой-либо специфичности к протеину. Более того, предпочтительными для связывания МС в случае альбумина становятся относительно гидрофильные участки (Сайт I), поскольку основную роль при связывании этого лиганда играет неспецифическое электростатическое взаимодействие [1]. В случае же Hoechst 33258 выявляется некоторая предпочтительность к гидрофобным участкам этого белка. На это указывают результаты флуоресцентных исследований, поскольку интенсивность флуоресценции Н33258, при связывании с белком, уменьшается при низких и возрастает при относительно больших концентрациях белка. Это указывает на то, что в формировании комплексов важную роль играют гидрофобные взаимодействия, приводящие к возрастанию интенсивности флуоресценции Н33258-альбумин комплексов, при больших концентрациях белка.

Очевидно, что изменения флуоресценции комплексов обусловлены изменениями микроокружения, связанных с альбумином молекул лиганда, и указывают на существование двух типов центров в молекуле белка – гидрофильного и гидрофобного. При этом, гидрофобное взаимодействие Н33258 с альбумином является следствием гидрофильного связывания, в результате которого Н33258 вызывает разворачивание пространственной структуры протеина. Вследствие этого, по всей вероятности, конформация белка изменяется таким образом, что гидрофобные аминокислотные остатки становятся доступными для бисбензимидазольных (гидрофобных) групп лиганда. Следовательно, при образовании гидрофобных контактов между ними, молекулы лиганда будут экранироваться от тушителей (молекул воды, растворенного кислорода) [2].

Результаты исследований выявляют, что оба лиганда инициируют разнонаправленные конформационные перестройки в молекуле белка, что отражается на структурной стабильности макромолекулы: в случае Н33258 наблюдается разрыхление третичной структуры, в случае МС наоборот – большее свертывание (увеличение степени упакованности) пространственной структуры белка [3].

На основании полученных результатов делается заключение, что Н33258 с альбумином образует водородные связи, а также взаимодействует за счет ван-дер-Ваальсовых, а МС – электростатических сил. При этом выявлено, что связывание и Н33258, и МС с альбумином обусловливается энтальпийно-энтропийным компенсаторным механизмом, о чем свидетельствует отрицательное значение изменения свободной энергии Гиббса.

1. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Petrosyan N.H. Study of interaction of methylene blue with DNA and albumin. J. of Biomol. Struct. and Dyn., 2022, v.40, N17, p.7779-7785.

2. Антонян А.П., Парсаданян М.А., Петросян Н.Р., Вардеванян П.О. Флуоресцентные характеристики комплексов Hoechst 33258 с сывороточным альбумином и ДНК. Журнал прикладной спектроскопии. 2022, т. 89, N4, с. 517-522.

3. Vardevanyan P.O., Petrosyan N.R. Study of structural transitions of complexes of different ligands with DNA and BSA. Proc. of The YSU, Chem and Biol, 2022, v. 56, N1, p. 49-55.

Исследование влияния фосфатидной кислоты на температуру конформационного перехода комплексов [цитохром с+ фосфолипиды]

Журавлева Э.Р.^{1*}, Степанов Г.О.¹, Осипов А.Н.¹

¹*Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова;
evel99@mail.ru*

Изучение молекулярных и клеточных механизмов апоптотических процессов является одной из наиболее актуальных проблем современной медицинской науки. Так, одним из путей инициации апоптоза является митохондриальный механизм, который характеризуется увеличением пероксидазной активности цитохрома С. Однако, данному событию предшествует взаимодействие цитохрома С с анионными фосфолипидами митохондриальных мембран. Данное взаимодействие приводит к конформационной перестройке активного центра цитохрома С.

Целью данной работы было исследование зависимости изменения структуры комплексов цитохрома С с фосфатидной кислотой при нагревании, а также определение значений температур, при которых данный конформационный переход происходит в присутствии фосфатидной кислоты.

Исследование было проведено при помощи спектрофлуориметрии при значениях длины волны возбуждения и испускания 280 и 335 нм соответственно. Исследование было выполнено в диапазоне температур 25-90°C с шагом 5°C. Образцы содержали комплексы цитохрома С с фосфатидной кислотой или фосфатидилхолином.

Ранее при помощи хемилюминесценции было показано, что изменение пероксидазной активности цитохрома С происходит наиболее выражено при добавлении фосфатидной кислоты. В присутствии фосфатидной кислоты изменялась форма кинетической кривой, показывая резкое увеличение интенсивности. А при исследовании зависимости флуоресценции от температуры для аналогичных комплексов цитохрома С с фосфолипидами показано, что температура конформационного перехода для комплексов [цитохром С+ фосфатидилхолин] и [цитохром С+ фосфатидная кислота] составляла 66°C и 75°C соответственно.

Полученные результаты подтверждают ранее исследованные функциональные изменения цитохрома С и способность фосфатидной кислоты оказывать на них влияние. Можно предположить, что эти отличия связаны с тем фактом, что конформационные переходы для комплексов [цитохром С + фосфатидилхолин] и [цитохром С + фосфатидная кислота] происходят при разных температурах.

Исследование воздействия кураксина CBL0137 на структуру нуклеосом методом spFRET-TIRF-микроскопии

Гераськина О.В.¹, Малюченко Н.В.^{1*}, Герасимова Н.С.¹, Любителей А.В.¹, Феофанов А.В.¹,
Студитский В.М.²

¹*МГУ, биологический факультет;*

²*Программа эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия;
mal_nat@mail.ru*

Кураксин CBL0137 принадлежит к группе ДНК-тропных противоопухолевых препаратов. Связываясь, кураксин затрудняет взаимодействие ряда ферментов, таких как топоизомеразы и ДНК-метилтрансферазы, и гистонов с ДНК, а также способствуют захвату в хроматине мультисубъединичного белкового комплекса FACT [1]. В клетке кураксин воздействует на множественные сигнальные пути, активируя p53 и подавляя активность факторов NF-κB, HSF1 [2]. Молекулярные механизмы действия CBL0137 на хроматин и, в частности, на его структурную единицу - нуклеосому являются предметом активного изучения. Для исследований *in vitro* нуклеосомы могут быть собраны на основе коровых гистонов и матричной ДНК, содержащей высокоаффинную

нуклеосом-позиционирующую последовательность. Мононуклеосомы позволяют изучать отдельные аспекты сложных процессов, происходящих в хроматине с участием гистоновых шаперонов, хроматиновых ремоделеров и факторов транскрипции [3-5]. Ранее нами было обнаружено, что кураксин CBL0137 вызывает концентрационно-зависимые изменения структуры нуклеосом [6]. В настоящей работе структурные изменения и конформационные переходы, происходящие в нуклеосомах под действием кураксина, были исследованы с помощью флуоресцентной микроскопии одиночных частиц на основе эффектов полного внутреннего отражения и Фёрстеровского резонансного переноса энергии (spFRET-TIRF-микроскопии).

Для проведения экспериментов методом TIRF-микроскопии использовали иммобилизованные нуклеосомы. Были сконструированы флуоресцентно-меченые мононуклеосомы с линкерным участком ДНК, биотинилированным по 5'-концу. Матричную ДНК с введённой FRET-парой меток Cy3/Cy5 и сайтом рестрикции TspRI в концевой области синтезировали с помощью ПЦР. Метки располагали таким образом, чтобы после сборки нуклеосом они располагались на соседних супервитках ДНК на расстоянии друг от друга меньше радиуса Фёрстера. Сборку нуклеосом выполняли, как описано ранее [7]. Нуклеосомы лигировали с биотинилированным фрагментом ДНК, содержащим сайт рестрикции TspRI. Биотинилированные нуклеосомы иммобилизовали на стекле, модифицированном биотинилированным полиэтиленгликоль-силаном и стрептавидином [8]. Концентрацию нуклеосом подбирали так, чтобы после иммобилизации они располагались на расстоянии больше нескольких микрон друг от друга. Измерения выполняли с использованием экспериментальной установки на основе инвертированного флуоресцентного микроскопа с лазерным модулем и адаптором для TIRF-микроскопии, как описано ранее [8]. По серии изображений, полученных с временным разрешением 300-500 мс, анализировали динамику величины FRET для отдельных нуклеосом и распределение усредненных по времени значений этой величины в популяции частиц. В условиях эксперимента ~ 30 % иммобилизованных нуклеосом сохраняли нативную структуру с уровнем FRET 0.5 – 0.7. При концентрации кураксина 5 мкМ в нуклеосомах обнаружены значительные стохастические изменения эффективности FRET, указывающие на ослабление взаимодействий между нуклеосомной ДНК и коровыми гистонами и образование неустойчивых конформационных состояний, находящихся в динамическом равновесии. При концентрации кураксина 10 мкМ в нуклеосомах происходило уменьшение эффективности FRET до нуля, что указывает на расхождение соседних супервитков нуклеосомной ДНК на расстояние больше 10 нм. При этом обратных конформационных переходов, приводящих к сближению супервитков, на отрезке времени в несколько десятков секунд не обнаружено. После удаления свободного кураксина из раствора восстановления исходной структуры в большинстве нуклеосом не происходит в течение не менее десяти минут, что свидетельствует либо о медленной кинетике диссоциации кураксина из комплекса с ДНК, либо о необратимой диссоциации самих нуклеосом на коровые гистоны и ДНК-матрицу.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-20018). В исследованиях использовали оборудование ЦКП ИБХ 2020.

1. Chang HW, Valieva ME, Safina A, Chereji RV, Wang J, Kulaeva OI, Kirpichnikov MP, Feofanov AV, Gurova KV, Studitsky VM. Mechanism of FACT removal from transcribed genes by anticancer drugs curaxins. *Sci Adv.* 2018 Nov 7;4(11):eaav2131. doi: 10.1126/sciadv.aav2131

2. Maluchenko NV, Chang HW, Kozinova MT, Valieva ME, Gerasimova NS, Kitashov AV, Kirpichnikov MP, Studitsky VM. Inhibiting the pro-tumor and transcription factor FACT: Mechanisms. *Mol Biol (Mosk).* 2016 50(4):599-610. Russian. doi: 10.7868/S002689841604008X

3. Kotova EY, Hsieh FK, Chang HW, Maluchenko NV, Langelier MF, Pascal JM, Luse DS, Feofanov AV, Studitsky VM. Human PARP1 Facilitates Transcription through a Nucleosome and Histone Displacement by Pol II In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2022 ;23(13):7107. doi: 10.3390/ijms23137107

4. Malinina DK, Sivkina AL, Korovina AN, McCullough LL, Formosa T, Kirpichnikov MP, Studitsky VM, Feofanov AV. Hmo1 Protein Affects the Nucleosome Structure and Supports the Nucleosome Reorganization Activity of Yeast FACT. *Cells.* 2022;11(19):2931. doi: 10.3390/cells11192931

5. Chang HW, Feofanov AV, Lyubitelev AV, Armeev GA, Kotova EY, Hsieh FK, Kirpichnikov MP, Shaytan AK, Studitsky VM. N-Terminal Tails of Histones H2A and H2B Differentially Affect Transcription by RNA Polymerase II In Vitro. *Cells.* 2022;11(16):2475. doi: 10.3390/cells11162475

6. Gaykalova DA, Kulaeva OI, Bondarenko VA, Studitsky VM. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes. *Methods Mol Biol.* 2009;523:109-23. doi: 10.1007/978-1-59745-190-1_8.

7. Volokh OI, Sivkina AL, Moiseenko AV, Popinako AV, Karlova MG, Valieva ME, Kotova EY, Kirpichnikov MP, Formosa T, Studitsky VM, Sokolova OS. Mechanism of curaxin-dependent nucleosome unfolding by FACT. *Front Mol Biosci.* 2022;9:1048117. doi: 10.3389/fmolb.2022.1048117

8. Kudryashova KS, Chertkov OV, Ivanov YO, Studitskiy VM, Feofanov AV (2016). Experimental setup for the study of immobilized single nucleosomes using total internal reflection fluorescence. *Moscow Univ Biol Sci Bull* 71 (2), 97–101 10.3103/S0096392516020048

Исследование конформационной подвижности белка тубулина в присутствии таксола методами молекулярного моделирования

Федоров В.А.^{1,2*}, Холина Е.Г.¹, Гудимчук Н.Б.^{1,2}, Коваленко И.Б.¹

¹МГУ, биологический факультет;

²Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН;
xbgth@yandex.ru

Микротрубочки являются важнейшими компонентами цитоскелета и играют главную роль в клеточном делении. Микротрубочки состоят из $\alpha\beta$ -тубулина, который собирается продольно в протофиламенты. Около 13 протофиламентов связываются латерально образуя тем самым стенку микротрубочек. Существенным для функции микротрубочек является свойство динамической нестабильности, то есть способность к спонтанному переключению между ростом и укорочением микротрубочек, связанное со связыванием и гидролизом ГТФ. Динамика микротрубочек регулируется *in vivo* рядом белков, ассоциированных с микротрубочками. В медицине широко и весьма успешно применяются антимитотические химиотерапевтические средства, такие как таксол, которые связываются с микротрубочками и стабилизируют их, подавляя динамическую нестабильность и предотвращая деление клеток. Таксол и другие стабилизирующие соединения также мешают интерфазным микротрубочкам, тем самым влияя на многие важные клеточные процессы. С момента своего открытия таксол стал предметом многих исследований, направленных на выявление механизма его действия. Молекулярные механизмы действия таких препаратов могут быть изучены *in silico* методом молекулярной динамики.

Для выявления различий в механических свойствах протофиламентов тубулина, связанного с ГТФ, ГДФ и ГДФ+таксол, мы провели серию вычислительных экспериментов с использованием метода полноатомной молекулярной динамики в явно заданном растворителе. Важным усовершенствованием по сравнению с предыдущими расчетами динамики протофиламентов ГТФ- и ГДФ тубулина было использование новых данных работ (Manka S.W., Moores C.A. Nat Struct Mol Biol. 2018; Zhang R et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018), впервые определивших структуры тубулинов, связанных с ГДФ и негидролизуемым аналогом ГТФ в составе 13-протофиламентных микротрубочек. С использованием разработанной нами ранее методики анализа углов изгиба протофиламентов тубулина (Fedorov et al., Plos Comp. Biol. 2019), основанной на вычислении модифицированных углов Эйлера, была оценена конформационная подвижность ГТФ-, ГДФ тубулинов и ГДФ тубулинов с таксолом. Было показано, что добавление таксола приводит к изменениям как на внутри-, так и на междимерном интерфейсах. Было оценено изменение как величины изгибной жесткости, так и направления изгиба в присутствии таксола.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова при поддержке грантом РНФ, проект № 22-74-00119.

Исследование крупномасштабной организации хроматина в ядрах HeLa с помощью методов малоуглового рассеяния (МУР)

Яшина Е.Г.^{1,2*}, Варфоломеева Е.Ю.¹, Пантина Р.А.¹, Байрамуков В.Ю.¹, Ковалев Р.А.¹, Федорова Н.Д.¹,
Горшкова Ю.Е.³, Григорьев С.В.¹

¹Петербургский институт ядерной физики НИЦ КИ;

²Санкт-Петербургский Государственный Университет;

³Объединенный институт ядерных исследований;

yashina_91@inbox.ru

Интерес к вопросу о том, как двуспиральная нить ДНК, гигантская, по меркам биохимии, уложена в ядре клетки размером в несколько микрон не ослабевает в течение нескольких десятилетий, несмотря на колоссальный прогресс в биологии, генетике и особенно в технологиях исследования биологической клетки. Данная работа является частью цикла работ, посвященных поиску универсальных принципов крупномасштабной организации хроматина, а также изучению его физических свойств и их изменений при различных воздействиях [1-6].

С помощью метода малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) и ультра МУРН была изучена организация хроматина в ядрах HeLa [2, 5] на установках KWS-2, KWS-3 (MLZ, Munich, Germany). Интенсивность рассеяния нейтронов в диапазоне переданных импульсов $[4 \cdot 10^{-2} - 10^{-1}]$ нм⁻¹ описывается степенной функцией с показателем степени $\nu=2.5$, что в рамках малоуглового рассеяния на фрактальных

объектах соответствует модели объемного фрактала с фрактальной размерностью $DF=2.5$. Интенсивность рассеяния нейтронов в диапазоне $[10-3 - 4 \cdot 10^{-2}]$ нм⁻¹ описывается степенной функцией с показателем степени $\nu=3$, что соответствует модели логарифмического фрактала. Точка перехода между двумя фрактальными уровнями $Q_c=4 \cdot 10^{-2}$ нм⁻¹ выявляет характерный максимальный размер объемного фрактала в 150 нм. Т.о. на масштабах от 20 до 150 нм хроматин представляет собой однородную самоподобную классическую фрактальную структуру (объемный фрактал), описываемую степенной мерой в показателе которой фрактальная размерность $DF=2.5$, в то время как на масштабах от 150 до 6000 нм (размер всего ядра) структура хроматина представляет собой иерархическую структуру, которая описывается логарифмической мерой (логарифмический фрактал), которая формируется согласно принципу сохранения объема при изменении масштаба [6].

Исследование изменения структуры хроматина в ядрах HeLa с подавленной транскрипцией с помощью малоуглового рассеяния рентгеновских лучей показали корреляцию объемнофрактальной структуры с транскрипционной активностью хроматина. Показано, что в образце ядер HeLa, культивированных в условиях дефицита питательных веществ и в образце ядер HeLa, культивированных с ингибитором транскрипции актиномицином Д, структура объемного фрактала ($DF=2.5$) не была обнаружена в противоположность ядрам активно делящейся клетке HeLa.

Таким образом, с помощью МУРН и МУРР можно идентифицировать наличие структуры объемного фрактала в ядре, как появление областей активного хроматина, отвечающего за транскрипционную активность ядра. При этом неактивный хроматин является плотной, однородной средой, заполняющей все пространство ядра и служащей контрастом для МУР, на фоне которого и наблюдается бифрактальная структура активного хроматина.

Авторы выражают благодарность А. Радулеску и В. Пипичу за помощь в проведении экспериментов по малоугловому рассеянию нейтронов на установках KWS-2 и KWS-3.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-12-00188).

1. Iashina E. G. et al. Physical Review E., Physical Review E, 96, 1, 012411 (2017).

2. Iashina E. G. et al. Journal of Applied Crystallography, 53, 4, 844-853 (2019).

3. Iashina E. G., Grigoriev S. V., JETP, 129, 3, 455-458 (2019).

4. Grigoriev S. V. et al., Physical Review E, 102, 3, 032415 (2020).

5. Grigoriev, S. V. et al. Physical Review E, 104, 4, 044404 (2021).

6. Iashina E. G. et al., Physical Review E, 104, 064409 (2021).

Исследование механизма взаимодействия бромелина, папаина и фицина с графт-сополимерами на основе хитозана и карбоксиметилцеллюлозы

Сорокин А.В.^{4,2,1*}, Холявка М.Г.^{4,1}, Лавлинская М.С.^{4,2,1}, Гончарова С.С.⁴, Королева В.А.^{4,3}, Редько Ю.А.⁴, Малихина Н.В.⁴, Панкова С.М.^{4,3}, Беляева Т.Н.⁴, Дубовицкая А.Н.⁴, Пайметьева Д.С.⁴, Наразина Д.А.⁴, Артюхов В.Г.⁴

¹Севастопольский государственный университет ;

²Воронежский государственный университет инженерных технологий ;

³Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко;

⁴Воронежский государственный университет;

andrew.v.sorokin@gmail.com

Изучение влияния микроокружения на конформационные изменения и активность ферментов является одной из фундаментальных задач современной биофизики, решение которой открывает возможности дизайна новых селективных ингибиторов или активаторов энзимов и расширяет сферы практического применения биокатализаторов. Целью настоящей работы является исследование механизма взаимодействия цистеиновых протеаз – бромелина (КФ 3.4.22.32), папаина (КФ 3.4.22.2) и фицина (КФ 3.4.22.3) – с графт-сополимерами натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) или хитозана (ХТЗ) с боковыми привитыми цепями из поли-N-винилимидазола (ПВИ) и поли-N,N-диметиламиноэтилметакрилата (ПДМАЭМА).

Конъюгаты цистеиновых протеаз с графт-сополимерами получали комплексобразованием в боратном буфере с pH 9. Механизм взаимодействия исследовали методами гибкого молекулярного докинга и ИК-спектроскопии. Содержание белка в полученных конъюгатах определяли модифицированным методом Лоури, протеолитическую активность оценивали по скорости реакции гидролиза субстрата азоказеина [1-6].

В результате исследования установлено, что со стороны графт-сополимеров во взаимодействиях с молекулами цистеиновых протеаз вовлекаются как углеводный остов полисахарида, так и боковые привитые цепи и их функциональные группы. In silico исследование показало, что конъюгирование протекает

самопроизвольно и характеризуется отрицательными значениями аффинности. Лиганды располагаются в каталитическом кармане глобул протеаз. Аминокислотные остатки ферментов, образующие активный центр, формируют водородные связи с графт-сополимерами на основе натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и хитозана с поли-N-винилимидазолом для бромелина и папаина, для фицина же наблюдается подобное взаимодействие только с графт-сополимером КМЦ-ПДМАЭМА. Кроме того, лиганды вступают в слабые физические взаимодействия, в основном – в гидрофобные, с каталитически значимыми аминокислотами. Стоит отметить, что со стороны графт-сополимеров в образовании новых связей участие принимает полисахаридный остов макромолекул графт-сополимеров, за исключением фицина, где азольные кольца привитых цепей также формируют Н-связи. Примечательно, что полярные азольные циклы, как и углеродные скелеты боковых цепей, во всех рассматриваемых случаях вступают в гидрофобные взаимодействия.

Данные ИК-спектроскопии подтверждают результаты расчетов молекулярного докинга, указывая на те же функциональные группы и фрагменты макромолекул графт-сополимеров как вовлеченные во взаимодействие с ферментами. Кроме того, отмечается смещение положения полосы Амид I в ИК-спектрах конъюгированных энзимов по сравнению с нативными. С учетом этого факта можно сделать вывод о том, что глобулы ферментов претерпевают конформационные изменения, принимая более вытянутые формы. В случаях конъюгатов с носителями на основе хитозана отчетливо выявляется уменьшение областей, содержащих α -спирали, и увеличение регионов β -складчатостей.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что подобные структурные изменения могут оказать значительное влияние на каталитическую способность бромелина, папаина и фицина. Поэтому следующим этапом работы являлась оценка протеолитической активности конъюгированных энзимов. В случае конъюгирования энзимов с графт-сополимерами на основе натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, а для папаина и фицина – и с графт-сополимером хитозана с привитыми цепями из поли-N-винилимидазола, происходит увеличение как общей, так и удельной активности конъюгированных ферментов. Хотелось бы отметить, что указанный эффект (явление гиперактивации) обусловлен не высоким содержанием энзима в препаратах, а конформационными изменениями глобул и модуляцией структуры активного центра цистеиновых протеаз.

Таким образом, изучен механизм взаимодействий бромелина, папаина и фицина с графт-сополимерами натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы или хитозана с боковыми привитыми цепями из поли-N-винилимидазола и поли-N,N-диметиламиноэтилметакрилата. Установлено, что при взаимодействии с носителями на основе карбоксиметилцеллюлозы и сополимером хитозана с N-винилимидазолом происходит увеличение протеолитической активности ферментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 21-74-20053

Цитируемая литература

1. Kuznetsov V.A., Sorokin A.V., Lavlinskaya M.S. et al. Graft copolymers of carboxymethyl cellulose with N-vinylimidazole: synthesis and application for drug delivery. *Polym. Bull.* 76, 4929–4949 (2019).
2. Sorokin A.V., Kuznetsov V.A., Lavlinskaya M.S. Synthesis of graft copolymers of carboxymethyl cellulose and N,N-dimethylaminoethyl methacrylate and their study as Paclitaxel carriers. *Polym. Bull.* 78, 2975–2992 (2021).
3. Sorokin A.V., Olshannikova S.S., Lavlinskaya M.S. et al. Chitosan Graft Copolymers with N-Vinylimidazole as Promising Matrices for Immobilization of Bromelain, Ficin, and Papain. *Polymers*, 14, 2279 (2022).
4. Olshannikova S.S., Malykhina N.V., Lavlinskaya M.S. et al. Novel Immobilized Biocatalysts Based on Cysteine Proteases Bound to 2-(4-Acetamido-2-sulfanilamide) Chitosan and Research on Their Structural Features. *Polymers*, 14, 3223 (2022).
5. Sorokin, A.V., Olshannikova, S.S., Malykhina, N.V. et al. Acyl-Modified Water-Soluble Chitosan Derivatives as Carriers for Adsorption Immobilization of Papain. *Russ J Bioorg Chem* 48, 310–320 (2022).
6. Ol'shannikova S.S., Red'ko Y.A., Lavlinskaya M.S. et al. Preparation of Papain Complexes with Chitosan Microparticles and Evaluation of Their Stability Using the Enzyme Activity Level. *Pharm Chem J* 55, 1240–1244 (2022).

**Исследование механизма взаимодействия фицина с N-(2-гидрокси)пропил-3-
триметиламмоний хитозаном**

Лавлинская М.С.^{1,2,3*}, Холявка М.Г.^{1,2}, Сорокин А.В.^{1,2,3}, Гончарова С.С.¹, Королева В.А.^{1,4}, Редько Ю.А.¹, Малыхина Н.В.¹, Панкова С.М.^{1,4}, Беляева Т.Н.¹, Дубовицкая А.Н.¹, Пайметьева Д.С.¹, Наразина Д.А.¹, Артюхов В.Г.¹

¹Воронежский государственный университет;

²Севастопольский государственный университет;

³Воронежский государственный университет инженерных технологий;

⁴Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко;
maria.lavlinskaya@gmail.com

Исследование механизма взаимодействия биомакромолекул с различными элементами микроокружения может значительно расширить представления о функционировании биополимеров, а также предсказать пути модуляции их биологической активности. Перспективными компонентами для создания ферментных препаратов для биомедицины и биотехнологии являются природные полисахариды – материалы, сочетающие в себе доступность, низкую стоимость, нетоксичность, неиммуногенность и биосовместимость. В связи с этим целью настоящей работы является исследование механизма взаимодействия цистеиновой протеазы фицина (КФ 3.4.22.3) и N-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозана (ГПХ) – производного хитозана, проявляющего поликатионные свойства в широком диапазоне значений pH среды.

Конъюгаты фицина с ГПХ с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа получали комплексообразованием в боратном буфере с pH 9. Механизм взаимодействия исследовали методами гибкого молекулярного докинга и ИК-спектроскопии. Содержание белка в полученных конъюгатах определяли модифицированным методом Лоури, протеолитическую активность оценивали по скорости реакции гидролиза субстрата – азоказеина [1-4].

Из расчетов молекулярного докинга установлено, что взаимодействие фицина с ГПХ протекает самопроизвольно, при этом последний располагается в щели между доменами глобулы фицина, содержащей активный центр фермента. Между белком и лигандом образуется четыре водородных связи, включая одну, сформированную каталитически значимым остатком – Gln19. Остаток Cys25, непосредственно входящий в состав активного центра фермента, вступает в гидрофобные взаимодействия с гидроксипропильными фрагментами. Со стороны лиганда водородные связи образуются преимущественно за счет пиранозных циклов, исключение – Lys145, взаимодействующий с ОН-группой бокового фрагмента.

Результаты ИК-спектроскопии коррелируют с данными, полученными путем *in silico* исследования, и подтверждают те же функциональные группы и фрагменты макромолекул носителя, участвующие во взаимодействии с фицином. По положению полосы Амид I фицина в ИК-спектре конъюгата можно сделать предположение об изменениях во вторичной структуре энзима: конформация от глобулярной переходит к более вытянутой и обогащенной β -структурами.

В результате исследования каталитической способности полученных нами образцов, установлено, что общая протеолитическая активность (в ед/мл раствора) для нативного фицина и фермента, конъюгированного на носителе с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа, составляет 96 ± 4 и 106 ± 4 , 108 ± 5 , 99 ± 3 соответственно. Эти величины довольно близки и в целом несколько выше для конъюгированного фицина. Значения же удельной активности (в ед/мг белка) конъюгированных препаратов существенно превышают эту величину для свободного фицина и составляют соответственно 948 ± 3 , 1037 ± 10 , 1591 ± 12 и 787 ± 4 для нативного энзима и фермента, конъюгированного на носителе с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа. Таким образом, можно говорить о явлении гиперактивации фицина, обусловленной конформационными изменениями глобулы фермента.

Из представленных данных вытекает, что наивысшие значения активности наблюдается для препаратов, полученных с использованием ГПХ с молекулярной массой 350 кДа, наименьшие – для носителя с молекулярной массой 600 кДа. Для интерпретации этого феномена было проведено морфологическое исследование поверхности носителя. В результате этого было обнаружено, что в отличие от носителей с молекулярной массой 200 и 600 кДа N-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозан с молекулярной массой 350 кДа имеет ячеистую структуру с размерами пор порядка 80 нм. По-видимому, при конъюгировании фицин, размер глобул которого составляет порядка 5 нм, располагается в порах носителя, и это способствует увеличению активности фермента.

Таким образом, показано, что совокупное влияние модуляции активного центра фицина и морфологии поверхности N-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозана с молекулярной массой 350 кДа приводит к увеличению протеолитической активности фицина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 21-74-20053

Литература

1. Sorokin A.V., Olshannikova S.S., Malykhina N.V. et al. Acyl-Modified Water-Soluble Chitosan Derivatives as Carriers for Adsorption Immobilization of Papain. *Russ J Bioorg Chem* 48, 310–320 (2022).
2. Olshannikova S.S., Malykhina N.V., Lavlinskaya M.S. et al. Novel Immobilized Biocatalysts Based on Cysteine Proteases Bound to 2-(4-Acetamido-2-sulfanilamide) Chitosan and Research on Their Structural Features. *Polymers*, 14, 3223 (2022)
3. Sorokin A.V., Olshannikova S.S.; Lavlinskaya M.S. et al. Chitosan Graft Copolymers with N-Vinylimidazole as Promising Matrices for Immobilization of Bromelain, Ficin, and Papain. *Polymers*, 14, 2279 (2022).
4. Ol'shannikova S.S., Red'ko Y.A., Lavlinskaya M.S. et al. Preparation of Papain Complexes with Chitosan Microparticles and Evaluation of Their Stability Using the Enzyme Activity Level. *Pharm Chem J* 55, 1240–1244 (2022).

**Исследование связывания метиленового фиолетового с сывороточным альбумином
человека**

Шагинян М.А.¹, Микаелян М.С.¹, Антонян А.П.¹, Погосян Г.А.^{1*}

¹*Ереванский государственный университет;*

g.poghosyan@ysu.am

Взаимодействие сывороточного альбумина человека (САЧ) с низкомолекулярными веществами (лигандами) вызывает большой интерес, поскольку САЧ является главным транспортным белком в организме человека, переносящим различные экзогенные и эндогенные вещества, в том числе и лекарственные препараты. Метильный фиолетовый (МФ), известный также как кристалльный фиолетовый, имеет массу 408 Да, и является трифенилметановым красителем, имеющим положительный заряд, который используется как биологический краситель, фунгицид в сельском хозяйстве и лекарство наружного применения во время кожных заболеваний. Кроме того, МФ обладает хорошей стерилизацией, низкой токсичностью и свойством горьмезиса. Это означает, что МФ может инициировать в клетках разные процессы, если попадет в кровоток и будет передаваться клеткам. Это и обуславливает его наружное применение. С другой стороны, интересно выяснить как МФ будет взаимодействовать с САЧ, если, например, окажется в крови. С этой точки зрения, очень важно выявить как изменятся свойства и конформация САЧ при модельных исследованиях связывания МФ с САЧ.

В данной работе проведено флуоресцентное исследование взаимодействия САЧ с МФ. Флуоресцентное исследование проведено на спектрофлуориметре CaryEclipse (Австралия). Возбуждение растворов САЧ проведено при длине волны 280 нм. В таблице 1 представлены значения флуоресцентных интенсивностей САЧ в отсутствие МФ, а также при титровании растворов САЧ раствором МФ от концентрационного соотношения лиганд/альбумин – 1/2 до 1/10.

Данные, представленные в таблице 1, указывают на то, что связывание МФ с САЧ приводит к увеличению интенсивности флуоресценции САЧ при длине волны $\lambda=353$ нм, однако, сдвиг длины волны не происходит. Последний факт свидетельствует о том, что единственный флуоресцирующий триптофан не сдвигается, более того находится в полярном окружении [1,2].

Таблица 1. Значения флуоресцентных интенсивностей САЧ при взаимодействии с МФ

Интенсивность флуоресценции (у.е.) при длине волны $\lambda=353$ нм

САЧ 516

САЧ-МФ (МФ/САЧ=1/10) 531

САЧ-МФ (МФ/САЧ=1/2) 554

Однако, интенсивность флуоресценции увеличивается, что может быть связано с изменением заряда вблизи триптофана, что происходит из-за связывания МФ с САЧ. Вероятно, что вблизи триптофана катионная форма МФ нейтрализует заряд белка, что положительно влияет на увеличение интенсивности флуоресценции САЧ.

Таким образом, данные, полученные методом флуоресценции указывают на то, что конформация САЧ не меняется при связывании с МФ, однако флуоресценция белка увеличивается из-за изменения близкого окружения триптофана, что имеет место впоследствии связывания МФ с САЧ.

1. Vardevanyan P.O., Shahinyan M.A., Petrosyan N.H., Mamasakhlisov Y.Sh. Spectroscopic study of protein complexes with low-molecular compounds. *J. of Cont. Phys. (Arm. Acad. of Sci.)*, v. 56, N1, 2021, p. 60-64.

2. Shahinyan M.A., Petrosyan N.H., Antonyan A.P. Fluorescence quenching of human serum albumin induced by methyl violet. *Proc. of The YSU, Chem and Biol*, v. 54, N3, 2020, p. 261-264.

**Исследование структурно-функциональной организации фибриллярных белков
дермальных покровов гидробионтов**

Тарасова Д.В.^{1*}, Лиходзиевская М.В.¹, Бородина М.М.¹, Антипова Л.В.², Артюхов В.Г.¹, Антипов С.С.¹

¹Воронежский государственный университет;

²Воронежский государственный университет инженерных технологий;
di48880@gmail.com

Коллаген – основной белок соединительной ткани, состоящий из трех субъединиц в форме альфа-спирали. Трёхмерная структура коллагенов изучается как с использованием биоинформатических подходов, так и с использованием дифракционных методов. Известно более 20 типов коллагенов, при этом у млекопитающих большая часть белков этого семейства приходится на коллаген типа I. Однако вопрос о структурно-функциональной организации коллагенов гидробионтов остаётся открытым. Так, в международной базе данных PDB опубликовано лишь ограниченное число структур молекул коллагена животных и полностью отсутствуют данные о структуре коллагеновых молекул гидробионтов. Поэтому исследование структурно-функциональной организации коллагена гидробионтов вызывает еще более острый научный и прикладной интерес.

Отправной точкой данной работы стала оценка аминокислотного состава дермальных покровов африканского сома (*Clarias gariepinus*). Наибольшее содержание отмечено для неполярных алифатических аминокислот, а именно для глицина (33.27%), пролина (18.49%) и аланина (10.37%), а наименьшее – для триптофана (0.2%) и тирозина (0.34%), при этом присутствие цистеина не было зафиксировано. В целом, содержание ароматических аминокислот дермальных покровов африканского сома было незначительным, что характерно для тканей, состоящих, преимущественно, из коллагеновых белков.

На следующем этапе был получен раствор белков дермальных покровов африканского сома, имеющий pH 5.4, содержащий массовую долю белка – 1.10%, массовую долю жира – 0% и массовую долю углеводов – 0.7%. В ходе получения такого раствора произошло перераспределение содержания отдельных аминокислот, в частности, зарегистрировано снижение содержания аргинина с 4.08% до 0.05% и пролина с 18.4% до 0.09%, а присутствие триптофана не было обнаружено. Интересным является тот факт, что в дермальных покровах содержание пролина было одним из самых значимых. Основное отличие в составе аминокислот коллагенов гидробионтов и КРС приходится на аргинин и пролин, содержание которых отличается на несколько порядков.

Если в полученной эмульсии большая часть белков относится к коллагенам, то различия в содержании некоторых аминокислот в образцах, полученных от гидробионтов и от млекопитающих, вполне очевидны ввиду отличий среды обитания. Поэтому была проведена оценка профиля белков, присутствующих в образцах. Эти данные свидетельствуют о том, что в растворе белков дермальных покровов южного сома присутствуют белки, соответствующие молекулярным массам от 120 до 212 кДа и выше. Это указывает на то, что даже в условиях денатурирующего электрофореза значительная часть препарата представляет собой высокомолекулярный белок. Присутствие полос на электрофореграмме, соответствующих по своей подвижности молекулярной массе менее 200 кДа, вызывает сомнения в их принадлежности к коллагенам.

Далее была проведена оценка зарядов белков присутствующих в образцах с использованием электрофоретического фракционирования в нативных условиях от катода к аноду и от анода к катоду. Полученные данные свидетельствуют о том, что все белки эмульсии имеют отрицательный заряд, так как зарегистрированные белковые полосы мигрировали только к положительному полюсу. Для хроматографии была использована слабая анионообменная смола Sephadex DEAE-25. Было зарегистрировано два максимума, соответствующих 36-ти и 67-миллилитрам элюции. Полученные данные свидетельствуют о том, что белки, присутствующие в эмульсии, обладают различным сродством к смоле, при этом интенсивность первого максимума примерно в 4.5 раза выше. Это позволяет провести аналогию с коллагенами млекопитающих, у которых значительная часть коллагенов приходится на коллаген типа I. Результаты электрофоретического фракционирования образцов, полученных в результате хроматографии, свидетельствует о том, что наибольшее содержание белка приходится на 4, 5 и 6 фракцию, молекулярная масса которых составляет свыше 120 кДа, что также свидетельствует в пользу предположения, что данные белки могут относиться к группе коллагенов типа I. Для идентификации белков семейства коллагенов в этих фракциях была проведена обработка коллагеназой из *Clostridium histolytica* в течение 1, 6 и 24 часов при 37°C. Полученные результаты согласуются с предположением о том, что эти белки относятся к семейству коллагенов. Наиболее интересным является тот факт, что через 1 час инкубации в присутствии коллагеназы, ферментативному гидролизу подвергаются белки, обладающие молекулярной массой в области от 150 до 200 кДа, коллагеновая природа которых ставилась под сомнение. При этом общая тенденция к расщеплению всех белков, присутствующих во всех фракциях, сохраняется. Таким образом, можно сделать заключение о том, что все присутствующие белки, с высокой долей вероятности, относятся к коллагенам.

Совокупная оценка структурно-функциональных свойств белков дает основание считать полученную эмульсию источником функциональных биополимеров, в частности коллагеновых белков. В ходе исследований

определены: фракционный состав, зарядовое состояние, молекулярная масса, способность к гидролизу под действием коллагеназы *C. histolytica*. Оценка аминокислотного состава позволяет выявить аналогию и особенности коллагеновых белков животного и рыбного происхождения. Установлено, что в исследуемых эмульсиях присутствуют отрицательно заряженные белки с молекулярной массой свыше 100 кДа, фракции которых содержат преимущественно коллаген. Получены данные, свидетельствующие в пользу предположения о том, что значительная часть коллагенов гидробионтов относится к коллагену типа I, что дает возможность рассматривать их в перспективе как базу для различных субстанций и служить отправной точкой для понимания физико-химической сущности функционирования и оценки возможности применения в технологиях продуктов питания, медицины и косметологии.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования России в рамках соглашения N 075-15-2021-1351

Исследование структурных характеристик белка Е коронавируса SARS-CoV-2 методом атомно-силовой микроскопии

Гифер П.К.^{1,2*}, Батищев О.В.²

¹(НИУ МФТИ) Московский физико-технический институт;

²Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН (ИФХЭ РАН);
gifer.pk@phystech.edu

Пандемия COVID-19 является одной из крупнейших в новейшей истории. Изучение физико-химических основ взаимодействия коронавируса SARS-CoV-2 и клетки-хозяина имеет важное значение в поиске стратегии борьбы с вирусом. Коронавирусы представляют собой оболочечные вирусы с двойным липидным слоем, обычно состоящим из трех белков: шиповидного белка (S), мембранного белка (M) и оболочечного белка (E). Эти белки исследуются для выявления их роли в связывании рецепторов и образовании вирионов. При этом некоторые из коронавирусных белков хорошо изучены, а другие остаются мало описаны.

Из литературных источников известно, что коронавирусы, в том числе SARS-CoV-2, экспрессируют белок оболочки (E), который участвует во многих аспектах жизненного цикла вируса. Белок оболочки E коронавирусов - это небольшой интегральный мембранный белок из 76 аминокислот, состоящий из одного предполагаемого трансмембранного гидрофобного домена длиной 20–30 аминокислот, короткого N-конца (менее 10 аминокислот) и более длинного C-концевого хвоста.

Белок E способствует упаковке и репликации вируса, а удаление этого белка ослабляет или даже устраняет вирулентность. Другая роль, предполагаемая для белка E, заключается в стимуляции апоптоза. Было также обнаружено, что этот белок олигомеризуется с образованием пентамерной структуры, проявляющей активность ионного канала. Для полного понимания роли белка E в проникновении вируса в клетку, репликации и образовании дочерних вирионов необходимо знание структуры и физико-химических свойств этого белка. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет в реальном времени визуализировать динамику адсорбции, диффузии и взаимодействие различных биомолекул в естественных жидких средах на молекулярном уровне. В данном исследовании была изучена структура белка оболочки E SARS-CoV-2 с помощью АСМ широкого разрешения в физиологических условиях с целью выяснения механизма самоорганизации белка и условий формирования им пор в липидной оболочке вируса. Результаты исследований показали, что возникновение пор происходит даже от мономеров белка, а пентамеры формируются при концентрации белка от 100 нМ и выше.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-13-00435).

Исследование структуры и реакционной способности дипептида карнозина методом теории функционала плотности

Демухамедова С.Д.^{1*}

¹Институт Проблем Физики, Бакинский Государственный Университет;
svetlanabest@mail.ru

Карнозин (β-аланил-L-гистидин) - очень интересная природная дипептидная молекула, состоящая из аминокислотных остатков β-аланина и L-гистидина. Особенно высокие концентрации карнозина обнаружены в скелетных и сердечных мышцах, в мозге, почках, коже и слизистой желудка. Интерес к карнозину и его

производным, таким как ансерин и гомокарнозин, связан прежде всего с тем, что эти молекулы играют важную функциональную роль, оказывая комплексное воздействие на клетки и различные системы организма человека и животных. Прежде всего следует отметить антиоксидантные свойства карнозина [1]. В последние годы было засвидетельствовано положительное действие препаратов на основе карнозина при лечении рака, нарушений иммунной системы, диабета, заболеваний почек, печени, желудка, катаракты, а также при лечении болезней Паркинсона, Альцгеймера, различных неврологических нарушений после острого ишемического инсульта и некоторых заболеваний сердца. Карнозин успешно используется для замедления процесса старения и лечения старческого слабоумия. Столь широкий спектр применения карнозина открывает перспективы для создания на его основе новых лекарственных препаратов. Большое значение имеет нетоксичность карнозина, он не накапливается в органах и может безопасно использоваться для лечения многих заболеваний. Однако механизм действия карнозина на молекулярном уровне еще не до конца понятен, что доказывает целесообразность дальнейших исследований структурно-функциональной связи молекулы карнозина. Известно, что разнообразие биологических функций молекул определяется их пространственной и электронной структурами. На сегодняшний день квантово-химические расчеты считаются лучшим теоретическим методом определения структуры и свойств многоатомных молекул.

В течение последних лет многие наши исследования, основанные на полуэмпирических методах квантовой химии, были посвящены изучению карнозина, его производных ансерина и гомокарнозина и их комплексов с переходными металлами. В работе [2] квантово-химическим методом теории функционала плотности DFT изучена пространственная и электронная структура нейтральной молекулы карнозина в таутомерной форме N3H в водной и газовой средах. В настоящей работе, с целью изучения структурных, электронных, спектральных характеристик и определения реакционной способности дипептида карнозина с таутомерной формой имидазольного кольца N1H, было проведено аналогичное исследование тем же методом квантовой химии в газовой и водной средах.

Все расчеты были выполнены методом теории функционала плотности DFT с гибридным трехпараметрическим функционалом B3LYP. Для расчетов использовался надежный и экономичный базисный набор с поляризационными и диффузионными функциями 6-31+G (d, p). Все расчеты проводились с использованием пакета прикладных программ Gaussian 09 [3]. Для визуализации и анализа результатов исследований использовалась программа GaussView 6.0.16 [4]. После получения оптимизированной структуры были рассчитаны ее ИК- и ЯМР-спектры на том же уровне теории. Отсутствие мнимых частот подтверждает, что оптимизированная структура, полученная в данном расчете, является глобальным минимумом на поверхности потенциальной энергии. В представленной работе проанализированы результаты оптимизации дипептида карнозина в таутомерной форме N1H, включая длины связей, валентные и двугранные углы, значения электронной энергии, энергии HOMO и LUMO орбиталей, энергетический зазор между ними, величины парциальных зарядов на атомах, значения дипольных моментов. Получены значения потенциала ионизации и сродства к электрону. На основе значений энергии граничных орбиталей рассчитаны глобальные дескрипторы реакционной способности карнозина в таутомерной форме N1H, коррелирующие с его специфическими физико-химическими свойствами, такими как электроотрицательность, химический потенциал, химическая жесткость и мягкость, электрофильность, максимальный перенос заряда и поляризуемость. Полученные индексы реакционной способности были сопоставлены для двух форм имидазольного кольца карнозина. Граничные орбитали HOMO и LUMO были визуализированы для определения областей, где происходят электронные переходы. Поверхности молекулярно-электростатического потенциала (MEP) наглядно определяют потенциальные места связывания. Анализ орбиталей естественной связи (NBO) проводился для изучения внутримолекулярных взаимодействий, определяющих структурную стабильность, а также для получения информации о делокализации электронной плотности и переносе заряда. Теоретические ИК и ЯМР спектры дипептида карнозина в N1H таутомерной форме получены для газовой и водной сред. Проанализированы структурные перестройки и изменения различных параметров в зависимости от диэлектрической проницаемости среды.

Проведен сравнительный анализ результатов для двух таутомерных форм дипептида карнозина N1H и N3H. Расчеты показывают, что предложенные модели дипептида карнозина в обеих таутомерных формах образуют стабильные структуры.

1. Boldyrev A. A., Aldini G., Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological Reviews*, 2013, vol. 93, no. 4, pp. 1803–1845. DOI: 10.1152/physrev.00039.2012

2. Демухамедова С.Д. Теоретическое квантово-химическое моделирование структуры и свойств дипептида карнозина методом DFT. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2022, т. 7, № 2, с. 241–250.

3. Frisch M.J., et al. Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.

4. Dennington, R., Keith, T., and Millam, J. Gauss View, Version 6.0.16. Shawnee, Kansas: Semichem Inc., Shawnee Mission, 2016

Исследования пространственной структуры амилоидных пептидов семени человека

Осетрина Д.А.¹, Абрамова М.А.¹, Кусова А.М.¹, Юльметов А.Р.¹, Бикмуллин А.Г.¹, Клочкова Э.А.¹,
Клочков В.В.¹, Блохин Д.С.^{1*}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;
dblohin@kpfu.ru

Амилоидные фибриллы представляют собой упорядоченные агрегаты белков и их фрагментов. Амилоиды участвуют в более 20 заболеваниях человека, включая болезни Альцгеймера, Паркинсона, а также ВИЧ-инфекцию [1]. Было установлено, что амилоидные фибриллы спермы увеличивают вероятность заражения ВИЧ-инфекцией в 10^5 - 10^6 раз, за счет снижения электростатического отталкивания между вирионом ВИЧ и клеткой-мишенью [2].

Обнаруженные в семени человека амилоидные фибриллы состоят из пептидных фрагментов трех белков спермы: протатическая кислая фосфатаза (PAP), семеногелин 1 (SEM1) и семеногелин 2 (SEM2) [3]. Идентифицировано 9 пептидных фрагментов: PAP(248-286), PAP(85-120), SEM1(45-107), SEM2(45-107), SEM1(49-107), SEM2(49-107), SEM1(68-107), SEM2(68-107) и SEM1(86-107). Структурные исследования амилоидных фибрилл экспериментальными методами затруднено, поэтому основным методом для их изучения является молекулярное моделирование амилоидов. Для запуска расчетов необходима структура пептидов. В связи с этим для изучения амилоидов актуальной задачей является установление пространственной структуры амилоидных пептидов.

Наша работа посвящена структурным исследованиям амилоидных пептидов семени человека. Для изучения пептидов в растворе были применены методы спектроскопии ядерного магнитного резонанса, спектроскопии кругового дихроизма, а также молекулярное моделирование. В ходе наших исследований были установлены пространственные структуры пептидов: PAP(85-120), SEM1(86-107), SEM1(68-85), SEM1(68-107), а также структура пептида SEM1(86-107) в растворе с мицеллами додецилфосфохолина. Мицеллы выступали в роли модели заряженной поверхности мембраны. Полученные результаты в дальнейшем планируется применить для моделирования амилоидов спермы.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект № 20-73-10034).

Список литературы

1. Münch J. Effect of semen and seminal amyloid on vaginal transmission of simian immunodeficiency virus / J. Münch, U. Sauermaun, M. Yolamanova, K. Raue, Ch. Stahl-Hennig, F. Kirchhoff // *Retrovirology*. – 2013. - №10(148). – С. 1–9.
2. Rusert P. Quantification of infectious HIV-1 plasma viral load using a boosted in vitro infection protocol / P. Rusert, M. Fischer, B. Joos, Ch. Leemann, H. Kuster, M. Flepp, S. Bonhoeffer, H. Günthard, A. Trkola, // *Virology*. – 2004. - № 326(1). – С. 113-129.
3. Roan N.R. Peptides released by physiological cleavage of semen coagulum proteins form amyloids that enhance HIV infection / N.R. Roan, J.A. Müller, H. Liu, S. Chu, F. Arnold, Ch.M. Stürzel, P. Walther, M. Dong, H.E. Witkowska, F. Kirchhoff, J. Münch, W.C. Greene // *Cell Host Microbe*. – 2011. - №10(6). - С. 541–550.

Квантово-химическое моделирование межмолекулярного взаимодействия гиалуроновой кислоты с аминокислотами из состава наноконтейнеров адресной доставки и вещества-мишени

Брыксин К.А.^{1*}, Пластун И.Л.¹, Наумов А.А.¹

¹СГТУ имени Гагарина Ю.А.;
kir.bryksin@yandex.ru

В последнее время всё большее распространение в медицине получает тераностика - направление, связанное с адресной доставкой терапевтического и диагностического агента к пораженным клеткам. Одним из веществ-мишеней являются не только клетки, но и муцин – белковая ткань из состава слизистой оболочки. Одним из средств доставки лекарственных средств являются полимерные капсулы и наногели, основанные на белковых структурах. Для исследования комплексообразования при доставке лекарственного вещества на основе белковых капсул проведен анализ степени водородного связывания гиалуроновой кислоты как доставляемого лекарства с аминокислотами из состава белковых капсул и из состава аминокислот, входящих в состав вещества-мишени. Данные аминокислоты могут входить как в состав белковых капсул, так и в состав вещества-мишени. В качестве объекта исследования были рассмотрены комплексы лизин-пролин и лизин-серин. Хорошо известно,

что азотсодержащие аминокислоты, в частности, лизин, серин и пролин, играют важнейшую роль в формировании межмолекулярного взаимодействия белковых структур между собой и с различными веществами, поэтому оценка степени комплексообразования и силы водородного связывания может быть применена как к оценке степени взаимодействия молекулярных слоев капсулы, так и к оценке степени устойчивости прикрепления капсулы к мишени.

Моделирование межмолекулярного взаимодействия проводилось методами теории функционала плотности с функционалом B3LYP и базисом 6-31G(d) при помощи программного комплекса Gaussian, предварительная оптимизация молекул проводилась в программных комплексах Avogadro и GaussView.

На первом этапе был проведен расчет и анализ молекулярного комплекса лизин-пролин. На рассчитанном ИК спектре комплекса присутствует пик на частоте 3501 см⁻¹, что соответствует колебанию –ОН группы. Для исследования комплексообразования при присоединении молекулы гиалуроновой кислоты был выбран этот пик.

На следующем этапе к молекулярному комплексу была присоединена молекула гиалуроновой кислоты, также был проведен расчет и анализ полученной структуры и ИК спектра получившегося молекулярного комплекса. На рассчитанном ИК спектре комплекса пик, соответствующий колебанию –ОН группы, сдвинулся на частоту 3396 см⁻¹, а также пик стал более выраженным, что говорит об усилении водородных связей.

Также был исследован молекулярный комплекс лизин-серин. Был проведен расчет и анализ структуры и ИК спектра комплекса. На рассчитанном ИК спектре проявился пик на частоте 3586 см⁻¹, соответствующий колебанию –ОН группы. Этот пик был выбран для анализа молекулярного комплекса после присоединения молекулы гиалуроновой кислоты.

На следующем этапе к комплексу лизин-серин была присоединена молекула гиалуроновой кислоты, после чего был проведен расчет и анализ получившегося молекулярного комплекса. На рассчитанном ИК спектре молекулярного комплекса лизин-серин-гиалуроновая кислота пик, соответствующий колебанию –ОН группы, сдвинулся на частоту 3325 см⁻¹, а также стал более выраженным, что свидетельствует об усилении водородного связывания в получившемся комплексе.

Основываясь на анализе молекулярных комплексов аминокислот, входящих в состав белкового контейнера доставки и вещества-мишени, а также молекулярных комплексов, полученных при присоединении к парам аминокислот молекулы гиалуроновой кислоты, можно сделать вывод, что в случае образования комплекса с молекулой гиалуроновой кислоты сила водородного связывания возрастает, что может быть полезным при дальнейшем исследовании в области тераностики. Помимо этого, при анализе комплексов, состоящих из одной аминокислоты и молекулы гиалуроновой кислоты, водородные связи, образовавшиеся в молекулярных комплексах, были более слабыми, чем в тройных комплексах.

Колебательная структура в спектре люминесценции водных растворов тимина

Малкин В.М.^{1*}, Тулина Т.А.¹

¹*Санкт-Петербургский государственный университет;
vlmalkin@yandex.ru*

Структура энергетических уровней многоатомных молекул усложняется расщеплением электронных уровней на колебательные и вращательные подуровни [1, 2]. Теоретически ей должны соответствовать линейчатые спектры поглощения, излучения и возбуждения люминесценции. Однако, в растворах при комнатной температуре спектры молекул представляют собой широкие полосы [3-16]. При понижении температуры (77К) спектры люминесценции молекул имеют колебательную структуру (эффект Шпольского) [2, 7, 8], однако этот метод практически невозможен для экспериментов с биологически значимыми молекулами в их наиболее естественной среде — водных растворах при комнатной температуре. Структуру колебательных уровней молекул в водной среде также трудно получить с помощью ИК-спектроскопии, так как вода не пропускает свет в ИК-диапазоне [9].

Мы предположили, что кажущиеся случайными «шумовые» плечи и небольшие «пики» спектров люминесценции распределены не случайным образом.

Проанализировав спектры люминесценции тимина в водных растворах, мы построили гистограммы распределения таких пиков и плеч по длинам волн. Оказалось, что они действительно распределены не случайно, а чаще всего наблюдаются на 295нм (33898 см⁻¹), 303нм (33003 см⁻¹), 312нм (32051 см⁻¹), 319 нм (31348 см⁻¹), 327 нм (30581 см⁻¹), 336 нм (29762 см⁻¹), 344 нм (29068 см⁻¹), 353 нм (28329 см⁻¹), 363 нм (27548 см⁻¹), 372 нм (26882 см⁻¹).

Мы полагаем, что статистическая обработка позволяет наблюдать в спектрах испускания люминесценции проявления колебательной структуры основного энергетического уровня тимина в водном растворе, и что каждая полоса на гистограмме распределения «шума» соответствует переходу с нулевого или первого

Молекулярная биофизика. Структура и динамика биополимеров и биомакромолекулярных систем

колебательного уровня возбужденного состояния на один из колебательных уровней основного состояния. На основании полученных данных удалось получить частоты колебаний ИК-спектра тимина 895 см⁻¹ (близкие к 889 см⁻¹, полученным экспериментально в неводном растворе [10] и теоретическим 907 см⁻¹). [11]), 952 см⁻¹ (ср. 959 см⁻¹[10] и 965 см⁻¹ [11]), 1655 см⁻¹ (ср. 1668 см⁻¹[10] и 1696 см⁻¹ [11].), 767 см⁻¹ (ср. 763 см⁻¹[10] и 767 см⁻¹ [11]), 739 см⁻¹ (ср. 727 см⁻¹[10] и 733 см⁻¹ [11]) , 781 см⁻¹, 666 см⁻¹ (ср. 662 см⁻¹[10] и 667 см⁻¹ [11]), 704 см⁻¹ и т.д.

Литература:

- [1] А.Н.Теренин «Фотоника молекул красителей». М-Л, 1967
- [2] С.А.Раркер «Photoluminescence of Solutions», 1968
- [3] Malkin V.M., Rapoport V.L. Luminescence of aqueous thymine solutions at room temperature // Biophysics. 1999 V.44 (6) pp. 992-996
- [4] Kononov A.I., Bakulev V.M., Rapoport V.L. Exciton effects in dinucleotides and polynucleotides // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1993 V.19 pp. 139-144
- [5] Bukina M.N., Bakulev V.M., Barmasov A.V., Zhakhov A.V., Ischenko A.V. Luminescence diagnostics of conformational changes of the Hsp70 protein in the course of thermal denaturation // Optics and Spectroscopy. 2015 V. 118 (6) 899-901
- [6] Kononov A.I., Bakulev V.M. Red-shifted fluorescence from polyguanylic acid in aqueous solution at room temperature // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1996 V.24 (2-3) pp. 211-216
- [7] Шпольский Э.В. «Успехи физических наук» 1960 Т. 71, стр. 215
- [8] Шпольский Э.В. «Успехи физических наук» 1959 Т. 68, стр. 51
- [9] А. Смит «Прикладная ИК-спектроскопия». М. 1982
- [10] Степаньян С.Г., Е.Д. Радченко, Г.Г. Шеина и др. Конформационный анализ 5-замещённых производных урацила // Биофизика. 1988 Т. 34 вып. 5 стр. 753-758
- [11] Г.Н. Тен, В.В. Нечаев, А.Н. Панкратов и др. Влияние водородной связи на структуру и колебательные спектры комплементарных пар оснований нуклеиновых кислот. II. Аденин — тимин // Журнал структурной химии. 2010 Т. 51 № 5 стр. 889-895

Комплексы ДНК с координационными соединениями металлов, содержащими фенантролиновые лиганды

Шатица М.П.^{1*}, Касьяненко Н.А.¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;
st067901@student.spbu.ru

Для лечения онкологических заболеваний широко применяются координационные соединения платины, обладающие противоопухолевой активностью: цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин. Принцип действия координационных соединений платины заключается в их взаимодействии с азотистыми основаниями ДНК с образованием внутри- и межнитевых сшивок, блокирующих синтез ДНК и деление клеток. Тем не менее, неизбирательность действия и высокая токсичность существующих препаратов платины в совокупности с образованием резистентных к препаратам платины опухолей приводят к необходимости поиска более безопасных и эффективных аналогов. В работе изучен молекулярный механизм комплексообразования молекулы ДНК (основной мишени действия лекарств на основе координационных соединений металлов) с новыми потенциальными противоопухолевыми соединениями - координационными соединениями палладия и марганца, содержащими фенантролиновые лиганды.

Наличие фенантролиновых лигандов в составе соединений может способствовать формированию агрегатов таких соединений в водном растворе, что окажет влияние и на характер взаимодействия этих соединений с ДНК.

Для сравнения рассматривается влияние присутствия свободного фенантролина в растворе на конформацию молекулы ДНК.

Проанализировано влияние ионной силы раствора и pH на рассматриваемое комплексообразование. Действительно, опухолевые клетки, на блокирование деления которых направлено действие используемых соединений, существуют в слабокислой среде.

В ходе исследований использовали коммерческий препарат высокомолекулярной ДНК тимуса теленка (компания Sigma Aldrich). Молекулярную массу образцов ДНК определяли методом вискозиметрии по значению характеристической вязкости ДНК в 0.15 М NaCl. Изучение комплексообразования проводили в водном растворе с добавлением низкомолекулярной соли - 0.005 М NaCl. Были использованы экспериментальные методы: спектрофотометрия, низкоградиентная вискозиметрия и двойное лучепреломление в потоке, проведено изучение плавления ДНК и спектрофотометрическое титрование.

Спектры УФ поглощения соединений имеют две хорошо разрешенные полосы, которые, однако, пересекаются со спектральной областью, в которой поглощает ДНК. В работе предложен способ анализа спектральных характеристик комплексов при использовании таких систем.

Показано, что все используемые соединения связываются с ДНК. Предложен молекулярный механизм комплексообразования.

Конформационная подвижность противоракового пентапептида ААР-Н , определенная методами молекулярного моделирования

Агаева Г.А.^{1*}, Агаева У.Т.¹, Годжаев Н.М.¹

¹*Бакинский Государственный Университет, Институт Физических Проблем;
gulshen@mail.ru*

В последние годы биологически активные вещества, выделенные из морских организмов, играют важную роль в разработке инновационных лекарственных средств. Как известно, рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований мужской мочевыделительной системы, а также основной причиной смертности от рака у мужчин [1]. Рак - это заболевание, характеризующееся чрезмерной пролиферацией, в том числе вследствие трансформации, нарушений апоптоза, пролиферации, и метастазирования, и является одним из самых смертоносных заболеваний [1]. В настоящее время для лечения рака используется консервативная химиотерапия из-за нехватки эффективных препаратов. В 2018 году Ву и др. [2] обнаружили, что пентапептид (ААР-Н), выделенный из морского анемона *Anthopleura anjuna* с аминокислотной последовательностью Tyr-Val-Pro-Gly-Pro, проявляет определенную цитотоксичность в отношении клеток DU-145 рака предстательной железы человека, и его механизм действия может быть связан с регулируемым митохондриями путем апоптоза. Кроме того, Ли и др. [3] обнаружили, что эта молекула индуцирует остановку клеточной фазы S в клетках DU-145. Противоопухолевый механизм олигопептида ААР-Н в клетках DU-145 рака предстательной железы был исследован *in vitro* и *in vivo*. Результаты показали, что ААР-Н был нетоксичным и проявлял противоопухолевую активность. Таким образом, гидрофобный олигопептид ААР-Н может быть разработан в качестве адъюванта для профилактики или лечения рака предстательной железы в будущем. Для определения механизма действия этого пентапептида и исследования его структурно-функциональных связей требуется знание конформационной специфичности и гибкости основной и боковых цепей молекулы, позволяющее рационально конструировать функциональные группы, действующие избирательно на их рецепторном уровне. Основной целью настоящей работы являлось исследование конформационной динамики остова и боковых цепей пептида ААР-Н в вакууме и в полярной среде. Для определения взаимосвязи структура-активность пептида ААР-Н, помимо исследования его пространственной структуры, необходимо выяснить роль функционально активных остатков в стабилизации предпочтительной конформации олигопептида ААР-Н. Сначала конформационные свойства пентапептида были исследованы методом молекулярной механики (ММ), который позволяет определить целый набор энергетически предпочтительных конформаций молекулы пентапептида. Был использован последовательный метод, объединяющий все низкоэнергетические конформации конститутивных остатков. Конформационная потенциальная энергия молекулы задавалась как сумма независимых вкладов невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергий водородных связей. Детальный анализ конформационной гибкости пептида ААР-Н выявил ограниченное количество стабильных конформеров. Полученные результаты показали, что стабильные конформеры пентапептида имеют тенденцию принимать форму бета-загиба, благодаря наличию двух остатков пролина в последовательности. На втором этапе этого исследования была изучена конформационная динамика пептидного остова и подвижность боковых цепей пентапептида в предпочтительном конформационном состоянии. Полученные значения двугранных углов низкоэнергетических конформаций пентапептида были использованы в качестве исходных параметров для моделирования методом молекулярной динамики (МД). Методом МД было исследовано поведение боковых цепей в пределах энергетически предпочтительной конформации пентапептида в вакууме и в окружении молекул воды. После моделирования были получены другие низкоэнергетические структуры, показывающие динамику основной и боковых цепей предпочтительных конформаций. Таким образом при молекулярно-динамическом моделировании была выявлена структурная реорганизация глобального конформационного состояния пентапептида в различных условиях окружения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Simmons T.L., Andrianasolo E., Mcphail K., Flatt P., Gerwick W.H., Marine natural products as anticancer drugs. *Mol. Cancer Ther.* 2005, Volume 4, pp.333–342.

2. Wu Z.-Z., Ding G.-F., Huang F.-F., Yang Z.-S., Yu F.-M., Tang Y.-P., Jia Y.-L., Zheng Y.-Y. and Chen R., Anticancer Activity of Anthopleura anjuna Oligopeptides in Prostate Cancer DU-145 Cells, Mar. Drugs 2018, Volume 16, pp.125-131.

3. Li X., Tang Y., Yu F., Sun Y., Huang F., Chen Y., Yang Z., Ding G.. Inhibition of prostate cancer DU-145 cells proliferation by anthopleura anjuna oligopeptide (YVPGP) via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, Mar. Drugs 2018, Volume 16(9), pp.325-335.

Конформационные и редокс-изменения гемопорфиринов при протекании окислительно-восстановительной реакции между нейроглобином и цитохромом c

Семенова М.А.^{1*}, Бочкова Ж.В.^{2,1}, Смирнова О.М.¹, Игнатова А.А.¹, Паршина Е.Ю.², Зиганшин Р.Х.¹,
Бочаров Э.В.¹, Браже Н.А.², Максимов Г.В.², Кирпичников М.П.^{1,3}, Долгих Д.А.^{1,3}, Черткова Р.В.¹

¹ИБХ РАН;

²Кафедра биофизики, Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова;

³Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова;

marinaapbch@mail.ru

Гибель клеток, связанная с митохондриальной дисфункцией, часто встречается при острых неврологических расстройствах, нейродегенеративных заболеваниях, гипоксиях и ишемии. Апоптоз нейронов регулируется множеством белков, включая нейроглобин (Ngb), небольшой гемсодержащий белок из семейства глобинов. Ngb обнаружен в высокой концентрации в нейронах, причем его суперэкспрессия способствует выживанию нейронов, таким образом, уменьшая повреждения мозга, как при инсульте, так и при болезни Альцгеймера *in vivo*. Одна из наиболее популярных гипотез осуществления нейропротекторной функции Ngb основана на взаимодействии Ngb с митохондриальным цитохромом c (Cyt c), в результате которого предотвращается запуск апоптоза по Cyt c-зависимому пути. Однако молекулярные основы механизма взаимодействия Ngb и Cyt c до сих пор не изучены, характер их взаимодействия не установлен. В связи с этим представляется актуальным исследование механизмов взаимодействия Ngb с Cyt c, понимание которых позволит перейти к рациональному дизайну новых терапевтических средств для ингибирования гибели нейрональных клеток в условиях ишемии и гипоксий различного генеза.

Нами была разработана эффективная система продукции рекомбинантного человеческого Ngb в виде функционально-активной холоформы: сконструирован плазмидный вектор pET-17b-Ngb с геном Ngb, получен бактериальный штамм-продуцент *E. coli* SHuffleT7-Ngb, разработана и оптимизирована схема биосинтеза, выделения из клеток-продуцентов и очистки рекомбинантного Ngb. При помощи спектральных методов анализа получены физико-химические характеристики рекомбинантного Ngb: согласно данным УФ-видимой, ИК-, КД- и ЯМР-спектроскопий рекомбинантный Ngb представляет собой структурированную холоформу белка. Данные хромато-масс-спектрометрического анализа позволили сделать вывод о наличии в структуре окисленной формы Ngb правильно замкнутой дисульфидной связи.

При помощи спектроскопии комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния (КР) с лазерным возбуждением 532 нм показано, что характерные спектры гема Ngb в восстановленной (Fe²⁺) и окисленной (Fe³⁺) формах обладают полосами, соответствующими гемму В-типа, а атом железа является гексакоординированным. С использованием спектроскопии КР с лазерным возбуждением 633 нм установлено, что в Ngb(Fe²⁺) остатки цистеинов белковой части находятся в свободном состоянии, в то время, как в Ngb(Fe³⁺) они образуют дисульфидную связь. Также были выявлены отличия в колебании C-N связей в белковой части восстановленного и окисленного Ngb, что может быть связано с изменением взаимного расположения α -спиралей при переходе Ngb между редокс-формами.

Мы показали, что спектры КР Cyt c(Fe²⁺) обладают характерными пиками в области 500-700 см⁻¹ и 1313 см⁻¹, отсутствующими на спектрах КР Ngb(Fe²⁺), при этом спектры Ngb отличаются наличием пиков 1306 и 1342 см⁻¹. Указанные спектральные особенности позволили определять эти белки при регистрации спектра их смеси.

При помощи спектроскопии КР была разработана методика для регистрации конформационных и редокс-изменений белков, сопровождающих окислительно-восстановительную (ОВ) реакцию между Ngb(Fe²⁺) и Cyt c(Fe³⁺). Чтобы исключить влияние избытка восстановителя на вносимый Cyt c(Fe³⁺) мы получали разностные спектры вычитанием из спектра смеси (1): Ngb(Fe²⁺)+Cyt c(Fe³⁺) спектр смеси (2): Ngb(Fe²⁺)+буфер+Cyt c(Fe³⁺). Так как в смеси (2) происходило реокисление Ngb(Fe²⁺), восстановление вносимого Cyt c(Fe³⁺) возможно за счет избытка восстановителя в растворе. Таким образом, полосы разностных спектров показывают эффекты, вызываемые ОВ-реакцией между гемами.

На разностных спектрах интенсивны пики в области 600-700 см⁻¹, связанные с колебаниями C-S связей между гемом и остатками Cys14 и Cys17 Cyt c. Интенсивный пик в области 1330 см⁻¹ характерен для гемов С-типа. Также наблюдали пики в области 1140 см⁻¹ (колебания метильных радикалов) и 1570-1610 см⁻¹, связанные с колебаниями метиновых мостиков. Можно предположить, что наблюдаемые изменения связаны с подстройкой гема Cyt c в гемовой впадине для ОВ-взаимодействия с гемом Ngb. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что между Ngb(Fe²⁺) и Cyt c(Fe³⁺) происходил перенос электрона.

Кроме того, был проведен сравнительный анализ одномерного 1H-ЯМР-спектра эквимольной смеси Ngb/Cyt c и суммы 1H-ЯМР-спектров Ngb и Cyt c, накопленных по отдельности. Был выявлен сдвиг ряда 1H-ЯМР-сигналов в смеси белков, что указывает на то, что рекомбинантные белки Ngb и Cyt c образуют комплекс при смешивании в растворе.

На основе литературных данных были сконструированы и получены панели вариантов Ngb (с мутациями E60K, E87K, K67E и K95E) и Cyt c (с мутациями K25E, K72E и K25E/K72E) с заменами остатков в предполагаемом интерфейсе взаимодействия этих белков. Эти варианты мутаций предполагают изменение заряда аминокислотного остатка на противоположный, и, следовательно, способны влиять на электростатические взаимодействия между белковыми молекулами.

С помощью описанной выше методики были исследованы конформационные и редокс-изменения гемопорфиринов, сопровождающие ОВ-взаимодействие мутантных форм Ngb с диким типом Cyt c и наоборот. Показано, что взаимодействие NgbK67E, NgbE60K, NgbE87K с диким типом Cyt c сопровождается ОВ-реакцией с переносом электрона, при этом взаимодействие NgbK95E с диким типом Cyt c, вероятно, нарушено, и восстановление Cyt c происходит только за счёт избытка восстановителя в растворе. Также сделано предположение, что взаимодействие Cyt cK25E с диким типом Ngb ослаблено, тогда как для взаимодействия между Cyt cK72E и Ngb дикого типа такого ослабления выявлено не было.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00985).

Конформационные особенности бета-амилоидного пептида 25-35

Агаева Г.А.^{1*}, Наджафова Г.З.²

¹*Бакинский Государственный Университет, Институт Физических Проблем;*

²*Азербайджано-Французский Университет УФАЗ;*

gulshen@mail.ru

Конформационные особенности бета-амилоидного пептида 25-35

Агаева Г.А.¹, Наджафова Г.З.²

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

2 – Азербайджано-Французский Университет УФАЗ, AZ1010, ул. Низами 183, Баку

gulshen@mail.ru

Как известно, болезнь Альцгеймера (БА) является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний и причиной деменции. Заболевание патологически характеризуется агрегацией двух белков в тканях головного мозга, а именно бета-амилоида (A β) и тау-белка, специфичного для мозга. Имеются совокупные доказательства того, что пептиды A β самообразуются в растворимые олигомеры и нерастворимые фибриллы [1]. Отдельный фрагмент A β (25-35) (с последовательностью GSNKGAIIGLM) считается функциональным доменом амилоидного пептида A β , ответственным за его нейротоксические свойства [2], и биологически активной областью A β [3]. Пептид A β (25-35) обладает многими характеристиками полноразмерного A β (1-40/42), включая его амфифильную природу и склонность к агрегации. Его присутствие in vivo было доказано лишь недавно, но токсичность фибриллярного A β (25-35) по отношению к нейрональным клеткам in vitro была показана ранее [3]. Имеются также данные о том, что мономерная форма этого пептида сама по себе может быть цитотоксичной [3]. Механизм токсичности амилоидного пептида остается невыясненным. Тем не менее, многие важные детали о растворимом пептиде A β , включая его пространственную структуру, отсутствуют или противоречат друг другу. Следовательно, изучение конформационных свойств пептида A β (25-35) в его растворимой мономерной форме может сыграть существенную роль в определении природы более ранних его видов до олигомеризации. Можно сделать предположение, что конформации, принимаемые пептидом A β (25-35) в растворе, чрезвычайно чувствительны к используемым методам и экспериментальным условиям.

В представленном исследовании мы использовали методы молекулярного моделирования (ММ) - методы молекулярной механики (ММ) и молекулярной динамики (МД), чтобы получить информацию о пространственной организации пептида A β (25-35) и его конформационной динамике. Преимущество ММ молекулярного моделирования перед другими теоретическими подходами заключается в учете энергетических

вкладов всех типов внутри- и межмолекулярных контактов в стабильных конформациях пептида и его фрагментов, что позволяет идентифицировать более стабильные конформации пептида. Конформационные свойства пептида амилоида- β (25-35) были изучены с помощью метода молекулярной механики, который позволяет успешно решать задачи о структурных характеристиках молекул пептидов. Программа расчета была основана на матричном методе определения координат атомов и потенциальных функций с соответствующей параметризацией. В текущей версии этой программы энергия рассчитывается как сумма независимых вкладов энергий невалентных, электростатических взаимодействий, энергий торсионных барьеров и водородных связей. Конформационный анализ каждого пептидного сегмента С-концевой части выявил ограниченное число наиболее вероятных конформаций и достаточно четко определил силы, стабилизирующие структуры. Также было показано, что возможность образования развернутых структур по сравнению с α -спиральной структурой выше на N-конце и ниже на С-конце. Наши результаты показывают, что пептид А β (25-35) энергетически предпочтительно принимает α -спиральную конформацию на С-концевом октапептидном сегменте. Среди стабильных структур с общей α -спиральной конформацией на С-конце наблюдается значительное разнообразие различных конформаций на N-концевом тетрапептиде. Для моделирования картины внутримолекулярной подвижности молекулы пептид А β (25-35) был применен метод молекулярной динамики. В качестве начальных приближений были использованы стабильные конформационные состояния молекулы. Было показано, что гибкие структуры в N-концевой области А β (25-35) по-разному ориентированы по отношению к структурам в С-концевой части в низкоэнергетических конформациях. Эти результаты согласуются с гипотезой о том, что содержащий спираль конформер является важным промежуточным звеном в сборке фибрилл А β [4]. В дальнейшем будет обсуждаться возможная роль α -спиральной структуры в инициации агрегации пептида А β .

ЛИТЕРАТУРА

1. L. N. Zhao, L. Lu, L. Y. Chew, Y. Mu, Alzheimer's disease-A panorama glimpse, *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (2014) 12631-12650.
2. R. Resende, C. Pereira, P. Agostinho, A. P. Vieira, J. O. Malva, C. R. Oliveira, Susceptibility of hippocampal neurons to A-beta peptidotoxicity is associated with perturbation of Ca²⁺ homeostasis, *Brain. Res.*, 1143 (2007) 11-21.
3. M. E. Clementi, S. Marini, M. Coletta, F. Orsini, B. Giardina, F. Misiti, A-beta(31-35) and A-beta(25-35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: Role of the redox state of methionine-35. *FEBS Lett.*, 579 (2005) 2913-2918.
4. Y. Fezoui, D.B. Teplow, Kinetic studies of amyloid beta-protein fibril assembly - differential effects of α -helix stabilization, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 36948-36954.

Кремниевые аналоги биомолекул в фокусе методов драг-дизайна

Кондратьев М.С.^{1*}, Бадалов А.А.¹

¹*Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия ;
ma-ko@bk.ru*

Соединения на основе кремния часто упоминаются в концепциях, описывающих неуглеродные, альтернативные формы жизни. Электронные конфигурации валентных оболочек кремния и углерода аналогичны, кремний четырехвалентен и теоретически способен образовывать сложные, разветвленные молекулы. По этим причинам интерес представляет изучение кремниевых аналогов аминокислот, сахаров, компонентов нуклеиновых кислот и ряда других биомолекул. Для этого нами были использованы теоретические методы компьютерного моделирования, которые обычно используются в поисковых исследованиях в рамках поиска новых лекарств (драг-дизайн).

Первичная оптимизация структур проводилась в HyperChem посредством молекулярной механики (AMBER). На втором этапе структуры изучаемых молекул рассчитывались с помощью квантово-механического (QM) пакета MORAC2016 с параметризацией PM7. Также были проведены геометрическая оптимизация и поиск энергетического минимума для кремниевого и углеродного пептида в конформациях альфа-спирали и бета-листа, состоящего из 12 остатков Ala. При вычислениях в PM7, как для альфа-спирали, так и для бета-листа кремниевый пептид продемонстрировал более выраженную термодинамическую стабильность, чем углеродный, при этом глобальный экстремум теплоты образования такой кремниевой молекулы отвечает конформации альфа-спирали.

Полученные результаты позволяют развивать гипотезы о принципиальной возможности существования систем, в которых атомы кремния образуют ковалентные связи, формируя большое многообразие конформационно лабильных структур. Такие ансамбли атомов можно рассматривать как аналоги земных биомолекул, и предполагать у них наличие неких аналогичных функциональных активностей.

**Математические модели, описывающие кооперативные взаимодействия при
связывании кислорода гемоглобином**

Лавриненко И.А.^{1*}, Вашанов Г.А.¹, Эрнандес Касерес Х.Л.², Бучельников А.С.³, Нечипуренко Ю.Д.^{3,4}

¹Воронежский государственный университет;

²Кубинский центр нейронаук;

³Севастопольский государственный университет;

⁴Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН;

lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

Биологическим системам свойственна саморегуляция, и одним из проявлений такой регуляции является кооперативность. Несмотря на успехи в изучении структуры биологических макромолекул, механизмы кооперативного связывания лигандов с ними до сих пор не ясны. Появление новых экспериментальных данных заставляет совершенствовать существующие классические модели, разрабатывать новые концепты, а также искать альтернативные интерпретации.

Исторически сложилось так, что гемоглобин стал классическим объектом в исследовании кооперативных систем в биологии. Первое уравнение, описывающее оксигенацию гемоглобина было предложено Г. Гюфнером, однако оно не смогло удовлетворительно описать имеющиеся экспериментальные данные. А. Хилл представил свое уравнение с разумным приближением к данным эксперимента и предположением о том, что молекула гемоглобина способна к агрегации. Дальнейшие исследования кооперативных эффектов стали опираться на уже развитый к тому времени математический аппарат статистической физики. Исходя из выявленного факта существования четырех центров связывания лигандов и идеи последовательной оксигенации, Г. Эдер предложил свое уравнение, ставшее наиболее точным в описании кривой диссоциации гемоглобина. Л. Полинг переосмыслил данное уравнение, принимая во внимание возможные варианты пространственного положения центров связывания кислорода. Близкая к естественной структуре гембелка модель в виде тетраэдра привела к наиболее точному решению этой задачи. Д. Кошланд, Г. Немети и Д. Филмер, опираясь на данные о структурной перестройке олигомеров, разработали свою феноменологическую модель и предложили уравнение оксигенации, основанные на гипотезе индуцированного соответствия (модель Pauling-KNF). Ж. Моно, Дж. Уаймен и Ж. Шанжэ, принимая во внимание данные рентгеноструктурного анализа гемоглобина, предлагают симметричную модель оксигенации (модель MWC) и соответствующее уравнение.

Новые экспериментальные данные с более высоким пространственным разрешением молекулы гемоглобина, данные по наносекундной кинетике связывания лигандов, а также ряд других обнаруженных фактов, потребовали разработки новых моделей кооперативного взаимодействия: модель «кооперона» М. Брунори и соавт., модели А. Сабо и М. Карплуса (модель SK), основанной на стереохимическом механизме М. Перутца, которая в дальнейшем была обобщена и пересмотрена А. Ли и М. Карплусом (модель SKL), модель «третичной структуры двух состояний» (модель TTS) Э. Генри и соавт., а также модели-концепта «морфина» (Morpheein concept) Э. Джаффе и ряда ансамблевых моделей на основе представлений Э. Изинга.

В докладе мы излагаем основные идеи, предлагаемые исследователями механизмы и модели кооперативных взаимодействий, соединив с некоторыми из наших исследований в этой области [1-8]. Так, нами рассмотрены уравнения оксигенации, несущие в своей основе экспоненциальные и степенные зависимости, где показано, что последние лучше аппроксимируют кривые диссоциации оксигемоглобина. Использование введенного нами относительного коэффициента кооперативности позволяет разделить коэффициент Хилла на две составляющие: число субъединиц олигомера и относительный коэффициент кооперативности, характеризующий силу взаимодействия этих субъединиц. Также предложены математические модели оксигенации, несущие в своей основе уравнение Хилла, где коэффициент кооперативности модулирован распределениями Гаусса и Лоренца, как функциями парциального давления кислорода. Разработанные нами модели с одной стороны, основаны на современных концепциях молекулярной биофизики, с другой – позволяют лучше описывать эксперимент.

1. Нечипуренко Ю.Д. Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами. Москва-Ижевск. – ИКИ. – 2015. – 188 с.

2. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Сулин В.Ю., Нечипуренко Ю.Д. / Анализ моделей кооперативного связывания кислорода гемоглобином // Биофизика. – 2021. – Т. 66(6). – С. 1065-1073. doi: 10.31857/S000630292106003X

3. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Нечипуренко Ю.Д. / Новая интерпретация коэффициента Хилла // Биофизика. – 2022. – Т. 67(2). – С. 229-233. doi: 10.31857/S000630292202003X

4. Aristov V.V., Buchelnikov A.S., Nechipurenko Y.D. / The Use of the Statistical Entropy in Some New Approaches for the Description of Biosystems // Entropy. – 2022. – Vol. 24(2). – P. 172. doi: 10.3390/e24020172

5. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Бучельников А.С., Нечипуренко Ю.Д. / Кооперативное связывание кислорода гемоглобином как одна из обобщающих моделей в молекулярной биофизике // Биофизика .– 2022 .– Т. 67(3) .– С. 421-433. doi: 10.31857/S0006302922030012
6. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Нечипуренко Ю.Д. / Новая математическая модель, описывающая оксигенацию гемоглобина // Биофизика .– 2022 .– Т. 67(3) .– С. 444-450. doi: 10.31857/S0006302922030036
7. Нечипуренко Ю.Д., Бучельников А.С. / Связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами в растворе и на микрочипах // Биофизика .– 2022 .– Т. 67(3) .– С. 456-466. doi: 10.31857/S000630292203005X
8. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Hernández Cáceres J. L., Buchelnikov A.S., Nechipurenko Y.D. / A New Model of Hemoglobin Oxygenation // Entropy .– 2022 .– Vol. 24(9) .– P. 1214. doi: 10.3390/e24091214

Математическое моделирование возникновения открытых состояний в молекуле ДНК в зависимости от концентрации дейтерия в окружающей жидкой среде

Дорохова А.А.^{1,2*}, Дроботенко М.И.², Свидлов А.А.^{1,2}, Джимаков С.С.^{2,1}, Лясота О.М.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук" ;

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кубанский государственный университет";

013194@mail.ru

Известно, что концентрация дейтерия играет существенную роль в обменных процессах, протекающих в биосистемах разного уровня организации, при этом изменение изотопного градиента D/H в организме используют для повышения его адаптивных возможностей. Атомы дейтерия, например, включаясь в структуру водородных связей двойных спиралей молекул ДНК вследствие быстрого протий-дейтериевого изотопного обмена, способны влиять на время “хранение–считывание” генетической информации ($t_H/t_D = 0,43$), в том числе путём модификации состояния генетического материала (“открытие” и “заккрытие” отдельных пар азотистых оснований в молекуле ДНК). Возможно, замена атома протия на дейтерий увеличивает энергию, необходимую для разрыва связи и “раскрытия” пар азотистых оснований. Теоретическое исследование этих процессов целесообразно проводить с помощью методов математического моделирования, когда одним из ключевых условий адекватности математической модели ДНК является учет “открытых” состояний (ОС) [1-3].

В настоящей работе построена математическая модель возникновения ОС в молекуле ДНК в зависимости от концентрации дейтерия в окружающей жидкой среде при разных значениях энергии разрыва водородной связи. Для моделирования процессов расплетения двойной спирали ДНК и образования ОС нами применена математическая модель, описывающая вращательное движение азотистых оснований вокруг сахаро-фосфатного остова молекулы ДНК. Для её построения использовали аналогию между молекулой ДНК и механической системой, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников. При этом вращающимся маятникам соответствуют азотистые основания, а упругой нити, к которой прикреплены эти маятники, – сахаро-фосфатные цепочки молекулы ДНК. Водородной связи пары комплементарных азотистых оснований соответствует упругая связь соответствующих маятников [4]. Эта математическая модель основана на уравнениях Ньютона и представляет собой задачу Коши для системы $2n$ обыкновенных дифференциальных уравнений [5].

Установлено, что вероятность возникновения открытых состояний между азотистыми основаниями в двухцепочечной ДНК зависит от концентрации дейтерия в жидкой среде, окружающей молекулу, и от величины энергии разрыва водородных связей (Екр). При энергии разрыва водородных связей равной $0,335 \cdot 10^{-22}$ Дж наблюдается практически линейное уменьшение вероятности появления открытых состояний между азотистыми основаниями в двухцепочечной ДНК (для первых 10 пар оснований гена, кодирующего интерферон $\alpha 17$) в диапазоне концентраций дейтерия от 156 до 40 ppm в жидкой среде, окружающей молекулу. При этом вероятность разрыва водородных связей между азотистыми основаниями в случае внедрения даже одного атома дейтерия в молекулу ДНК превышает вероятность аналогичного разрыва в той же молекуле, содержащей только атомы протия ($P'/P_0 > 1$), что свидетельствует об уменьшении стабильности молекулярной структуры ДНК. Если же энергия разрыва водородных связей равна $0,345 \cdot 10^{-22}$ Дж, то в диапазоне концентраций дейтерия от 156 до 40 ppm в жидкой среде, окружающей молекулу ДНК, наблюдается практически линейное возрастание вероятности возникновения открытых состояний между её азотистыми основаниями.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - кандидатов наук проект МК-2366.2022.1.4 и государственного задания ЮНЦ РАН № 122020100351-9.

1. Basov A., Drobotenko M., Svidlov A., Gerasimenko E., Malyshko V., Elkina A., Baryshev M., Dzhimak S. Inequality in the Frequency of the Open States Occurrence Depends on Single 2H/1H Replacement in DNA // *Molecules*. 2020 18;25(16):3753. doi: 10.3390/molecules25163753.
2. Svidlov A., Drobotenko M., Basov A., Gerasimenko E., Elkina A., Baryshev M., Nechipurenko Y., Dzhimak S. Influence of Environmental Parameters on the Stability of the DNA Molecule // *Entropy*. 2021. Vol. 23(11). P. 1446. <https://doi.org/10.3390/e23111446>
3. Dzhimak S., Svidlov A., Elkina A., Gerasimenko E., Baryshev M., Drobotenko M. Genesis of Open States Zones in a DNA Molecule Depends on the Localization and Value of the Torque // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(8):4428. <https://doi.org/10.3390/ijms23084428>
4. Yakushevich L.V. *Nonlinear Physics of DNA*; JohnWiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2007; 252p.
5. Dzhimak S.S., Drobotenko M.I., Basov A.A., Svidlov A.A., Fedulova L.V., Lyasota O.M., Baryshev M.G. Mathematical Modeling of Open States in DNA Molecule Depending on the Deuterium Concentration in the Surrounding Liquid Media at Different Values of Hydrogen Bond Disruption Energy // *Dokl Biochem Biophys*. 2018; 483(1): 359-362. doi: 10.1134/S1607672918060169.

Математическое моделирование квантовых выходов активированной кумаринами с–314 и с–334 хемилюминесценции под действием комплекса цитохрома С с кардиолипином

Левченко И.Н.^{1*}, Владимиров Г.К.², Володяев И.В.³

¹*Московский Государственный Университет, Физический факультет, г. Москва, Россия, 119234, ул. Колмогорова, 1, стр. 2;*

²*Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Институт регенеративной медицины, г. Москва, Россия, 119048, ул. Трубецкая, д. 8;*

³*Московский Государственный Университет, Биологический факультет, г. Москва, Россия, 119991 Москва, ул. Ленинские горы д.1. стр.12;
irnlevchenko@yandex.ru*

Сравнивая математическое моделирование квантовых выходов физических активаторов С–314 и С–334, которые перехватывают возбуждение у триплетно-возбужденных кетонов и имеют значения квантовых выходов ХЛ на 3–4 порядка выше, чем сами возбужденные кетоны, получаем ХЛ, активированную кумаринами С–314 и С–334, которая показывает значение интенсивностей в ~1500 раз и ~1600 раз выше, чем спонтанная ХЛ липидов, при этом не отличается от нее по параметрам кинетических кривых и имеет константы скорости одного порядка. Точность сравнения математического моделирования квантовых выходов определяется присутствием кардиолипина для стабилизации рН, гашением Fe²⁺ и наличием физическими активаторами С–314 и С–334. Среди факторов, которые искажают значение математического моделирования квантовых выходов, выделяется недостаточное добавление пероксида водорода, избыточное количество азота (II), метанола, денатурация белка, а также изменение конформации ЦитС в комплексе ЦитС–КЛ.

В поисках оптимальных условий возбуждения были проанализированы системы липопероксидазной и квази-липоксигеназной реакций, активированные физическими активаторами - кумаринами С–314 и С–334.

В нашей работе на основании анализа параметров цитохрома С с кардиолипином, физических активаторов С–314 и С–334, а также пероксидазы хрена и люминола, проведены сравнения исследований сенсibilизирующей способности кумаринов С–314 и С–334, как физических активаторов с целью сравнения величины квантовых выходов С–314* и С–334*.

Комплекс цитохрома С с кардиолипином отличается от нативного цитохрома С по следующим свойствам: (1) обладает флуоресценцией тирозиновых и триптофановых остатков; (2) теряет поглощение в полосе Core(405–410 нм), отражающей существование связи Fe(heme)···S(Met80); (3) обладает пероксидазной активностью и, катализирует образование липидных радикалов в мембране; (4) С–334 физический активатор ХЛ, так же как С–314, активно окисляется комплексом ЦитС–КЛ, при этом скорость этого окисления ограничивается лишь концентрацией самого цитохрома С, который тоже разрушается в составе комплекса ЦитС–КЛ под действием пероксида водорода.

**Метод Фурье ИК-спектроскопии в исследовании аномерной чистоты α - и β -форм
кристаллической D(+)-глюкопиранозы**

Нечипоренко А.П.¹, Плотникова Л.В.^{2*}, Везо О.С.², Ситникова В.Е.¹

¹Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики,
Кронверкский пр., 49, г. Санкт-Петербург, 197101, РФ;

²Санкт-Петербургский Государственный университет, Университетская набережная, 7–9, г. Санкт-
Петербург, 199034, РФ;
ljusja@mail.ru

Методом Фурье ИК-спектроскопии проведено исследование серии образцов α - и β -форм кристаллической D(+)-глюкопиранозы с целью оценки возможности выявления примеси сопутствующего аномера. Заметно отличающиеся по оптическим свойствам α - и β -формы моносахарида, показали, что, в отличие от α -D(+)-глюкопиранозы, для спектра которой характерен интенсивный максимум 1009 см⁻¹, в спектре β -D(+)-глюкопиранозы в этой области присутствует сложная полоса с максимумом 993 см⁻¹ и дифференцированным дублетом 1020/1012 см⁻¹. Важным признаком принадлежности структуры глюкопиранозы к β -форме является присутствие полосы 838 см⁻¹, а для α -D(+)-глюкопиранозы – наличие полосы 851 см⁻¹. Кроме того, интерес представляют широкие структурированные полосы в области 1500-1400 см⁻¹, наглядно передающие изменения в оптических характеристиках ОН-групп в результате инверсии пиранозного цикла – пологий наклон правой структурированной ветви полосы с максимумом 1460 см⁻¹ у β -формы и крутой подъем левой структурированной ветви полосы с максимумом 1424 см⁻¹. Все отмеченные признаки проявляются в спектре соответствующей формы глюкопиранозы при наличии примеси второго аномера, выраженность которых усиливается с увеличением содержания последней. Полученные данные показали эффективность метода Фурье ИК-спектроскопии при анализе аномерной чистоты кристаллической D(+)-глюкопиранозы, широко используемой в медицинской и фармакологической практике, косметологии, пищевой промышленности.

**Механизм ингибирования ДНК-связывающего домена белка PARP-1 солями урана:
результаты эксперимента in silico**

Булавко Е.С.^{1,2*}, Иванков Д.Н.²

¹ИФХЭ РАН;

²Сколковский институт науки и технологий;
egor.bulavko@skoltech.ru

Не только радиоактивные изотопы урана способны нанести серьезный вред живым клеткам. Как и многие другие тяжелые металлы, в избыточном количестве уран может изменять структуру белков и ДНК. В частности, было показано, что ион уранила – наиболее стабильная форма урана в условиях, близких к физиологическим, – оказывает негативное воздействие на металлосодержащие белки – цитохромы, трансферрины, ДНК-связывающие домены и др. На уровне организма хроническое отравление проявляется в нарушениях в работе почек, нервной системы, кроветворения.

Цинковые пальцы – одни из основных ДНК-связывающих доменов эукариотических белков. Ион цинка в них необходим для поддержания правильной пространственной структуры интерфейса, взаимодействующего с ДНК. Недавние исследования показали (на примере цинкового пальца белка PARP-1, участвующего в исправлении повреждений ДНК), что функциональность последних нарушается в результате взаимодействия с ацетатом уранила, изменяющим третичную структуру домена. Целью настоящей работы стало исследование возможного молекулярного механизма токсического воздействия урана, а также сопутствующих конформационных изменений в структуре цинкового пальца белка PARP-1.

Для моделирования химических превращений, включающих ион уранила, боковые цепи аминокислот в потенциальных сайтах связывания и каталитические молекулы воды, мы использовали подходы КМ/ММ динамики в сочетании со смещающими потенциалами (метод зонтичной выборки). Получаемые стабильные комплексы мы параметризовали в терминах классического силового поля для расчета длинных молекулярно-динамических траекторий. Последние необходимы для сэмплинга возможных конформационных состояний системы, а также для оценки динамических и энергетических параметров (конформационной энтропии, энтропии растворителя, энтальпии) последних.

По результатам моделирования было показано, что состояние, при котором уран расположен в нативном сайте связывания, разрушается вследствие спонтанного внутреннего гидролиза связи U – Cys162. Энтальпия гидролиза оказывается равной 3,1 ккал/моль, но за счет разрыхления структуры итоговое значение свободной энергии реакции становится 1,5 ккал/моль. Следующая далее реорганизация сайта связывания включает ассоциацию уранил-иона с кластером (Glu190, Asp191) и значительное изменение третичной структуры домена. Свободная энергия финальной стадии оказалась равной -13 ккал/моль, что делает весь процесс энергетически выгодным. Деорганизация ДНК-связывающего интерфейса, по-видимому, приводит к потере афинности к ДНК.

Механизмы ионной селективности в потенциал-чувствительных катионных каналах

Чугунов А.О.^{1*}, Щербаков К.А.², Трофимов Ю.А.¹, Василевский А.А.¹

¹ИБХ РАН;

²Институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича;

batch2k@yandex.ru

Трансмембранные ионные градиенты неразрывно связаны с самим явлением жизни и присутствуют в клетках всех трех таксономических доменов (эукариот, бактерий, архей) — они лежат в основе биоэнергетики, возбудимости клеток и передачи сигналов. Однако разные ионы — например, катионы натрия (Na⁺), калия (K⁺) и кальция (Ca²⁺) — играют разные роли, и их концентрации в разных клеточных компартментах драматически отличаются. Созданием, поддержанием и управляемым сбросом ионных градиентов занимаются ионные насосы (АТФазы) и ионные каналы, многие из которых селективны к конкретному типу ионов. Таким образом, проблема ионной селективности является одной из ключевых в молекулярной биологии.

Важнейшим шагом к расшифровке механизма селективности стало установление пространственной структуры калиевого канала KcsA 25 лет назад [1], служащей прототипом строения всех калиевых и большинства других потенциал-чувствительных катионных каналов. Эта структура показала, что селективный фильтр канала, образованный несколькими “этажами” направленных в пору карбонильных групп, идеально подходит для десольватации иона K⁺, окруженного восемью молекулами воды в стереометрии квадратной антипризмы. Другие ионы (Na⁺ и Ca²⁺) имеют другое строение гидратной оболочки, а потому не могут быть десольватированы калиевым каналом без энергетического штрафа, как в случае K⁺ — это и придает каналу селективность.

Однако несмотря на изученные с тех пор десятки структур различных калиевых и натриевых [2] каналов, механизм селективности последних для Na⁺ пока ускользает от исследователей. В этой работе мы пробуем расшифровать механизм ионной селективности, основываясь как на чисто “геометрическом” подходе, следующем напрямую из структур гидратных оболочек ионов; так и на моделировании молекулярной динамики (МД) ионных каналов и проходящих через их пору ионов.

Во-первых, мы проанализировали большинство доступных пространственных структур калиевых каналов при помощи разработанного нами геометрического подхода: среди множества атомов канала искали комбинации, соответствующие квадратной антипризме как в гидратной оболочке K⁺. Для избежания комбинаторного взрыва отбирали лишь те атомы белка, которые способны образовывать координационную связь в пределах небольшой окрестности. Реализовав алгоритм на Python и просканировав около 200 структур каналов, мы установили, что активные проводящие структуры селективных фильтров во всех случаях неукоснительно следуют “шаблону” гидратной оболочки K⁺. В отличие от них, структуры фильтров в непроводящей форме всегда заметно отклоняются от шаблона.

Во-вторых, с помощью расчетов МД мы показали, что в селективном фильтре симметричных тетрамерных бактериальных натриевых каналов наблюдается явление “поделенной” гидратной оболочки Na⁺ (бипирамида с шестью вершинами). В этом случае часть молекул воды из координационной сферы иона не замещается атомами белка (как это происходит в калиевых каналах), а координируется сольватируемыми группами в фильтре таким образом, чтобы формировать/достраивать гидратную оболочку иона. При этом в МД-расчетах с ионами K⁺ подобного явления не наблюдается. Мы предполагаем, что эффект “поделенной” оболочки играет важную роль в механизме селективности бактериальных натриевых каналов. Структура селективного фильтра этих каналов организована таким образом, что обеспечивает возможность транспорта ионов Na⁺ в полностью гидратированном состоянии. В то же время другие ионы обладают отличной от Na⁺ стереометрией гидратной оболочки и вынуждены замещать часть молекул воды атомами белка, что, по-видимому, повышает энергетический барьер для их прохождения через пору.

В дальнейшем мы планируем подступиться к проблеме селективности эукариотических натриевых каналов. Этот случай представляет особую сложность ввиду асимметричной структуры селективных фильтров у

данных каналов, представляющих собой слитый псевдогетеротетрамер, и отсутствия легко различимых геометрических принципов, объясняющих селективность.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00395).

Литература

Doyle D.A., et al. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280 (5360), 69–77.

Clairfeuille T., et al. (2019). Structural basis of α -scorpion toxin action on Nav channels. *Science* 363 (6433), eaav8573.

Многомасштабное моделирование реакций репарации ДНК фотоферментами

Домрачева Т.М.^{1*}

¹МГУ;

t.domracheva@lcc.chem.msu.ru

Фотоферменты фотолиазы, связываясь с поврежденными участками ДНК, осуществляют репарацию основных фотопродуктов ДНК, образующихся под действием УФ излучения. В основе функционирования фотолиаз лежит реакция фотоиндуцированного межмолекулярного переноса электрона. Наиболее интересной с точки зрения химического механизма является (6-4) фотолиаза, осуществляющая репарацию наиболее цитотоксичных (6-4) пиримидин-пиримидон фотопродуктов ДНК. Несмотря на активное изучение механизма функционирования (6-4) фотолиазы с использованием наиболее современных экспериментальных методов и молекулярного моделирования, химический механизм реакции репарации окончательно не был установлен. Многомасштабное моделирование, сочетающее классическую молекулярную динамику и квантово-химические расчеты фотовозбужденных состояний и координаты реакции, способно разрешить некоторые из противоречий, существующих в понимании механизма действия (6-4) фотолиазы.

В рамках многомасштабного моделирования были рассмотрены основные стадии реакции репарации (6-4) фотопропродукта ферментом (6-4) фотолизой, включающие фотоиндуцированный перенос электрона, ведущий к образованию радикала фотопродукта, разрыв и образование ковалентных связей в радикале фотопродукта и обратный перенос электрона. С использованием расчетов методом теории функционала плотности были получены оптимизированные геометрии для моделирования стадий реакции репарации с участием различных форм критически важного аминокислотного остатка His365, роль которого в реакции репарации обсуждается в литературе. В случае участия нейтрального His365, наиболее вероятной представляется перегруппировка радикала фотопродукта за счет переноса ОН-группы. Для протекания такой реакции необходимо снижение энергетического барьера реакции. В присутствии протонированного His365, происходит сопряженный перенос протона и электрона, что приводит к образованию протонированного (нейтрального) радикала фотопродукта. Для протекания реакции репарации по данному пути необходима подстройка таких свойств фотопродукта, как сродство к электрону. Оценки влияния макромолекулярного окружения на электронные энергии были проведены в рамках расчетов энергий возбужденных состояний структур, определяющих координату реакции репарации, которые проводились с использованием многоконфигурационного квантово-химического метода XMCQDPT2-CASSCF. В рамках данных расчетов была также проведена оценка матричных элементов неадиабатической связи. С использованием молекулярно-динамических расчетов была проведена оценка влияния динамики макромолекулярного окружения на энергии переноса электрона. Для оценки влияния электронных и электростатических взаимодействий на скорость реакции переноса электрона были скомбинированы результаты квантово-химических и молекулярно-динамических расчетов. Применение такого подхода позволяет связать быструю рекомбинацию радикальной пары в результате обратного переноса электрона с присутствием нейтральной формы His365. Присутствие же протонированного His365, выступающего донором протона для радикала фотопродукта, должно замедлять реакцию обратного переноса электрона. Таким образом, можно сделать вывод, что скорость и квантовый выход реакции репарации (6-4) фотопродукта фотоферментом должны критически зависеть от состояния протонирования His365 в активном центре белка.

Работа выполнена при поддержке РНФ 22-23-00418.

Многофункциональный ферритинподобный белок Dps может взаимодействовать с фосфолипидными везикулами и интегрироваться в мембраны E.coli

Антипов С.С.^{1,2*}, Маркелова Н.Ю.², Шавкунов К.С.², Шилова Е.В.¹, Преображенская Е.В.²,
Скоробогатов М.С.¹, Озолин О.Н.²

¹Воронежский государственный университет;

²Институт биофизики клетки РАН, Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный
центр биологических исследований РАН»;

ss.antipov@gmail.com

Внимание к полифункциональным белкам характерно для современной молекулярной биофизики и структурной биологии. Большинство таких белков являются мультидоменными или мультисубъединичными. Разные функции этих белков могут обеспечиваться работой разных модулей, эволюционно объединенных в одну белковую глобулу. Однако недавно были идентифицированы белки, способные выполнять разные функции, не имея для этого специальных структурных модулей. Было предложено несколько методов *in silico* для их идентификации таких белков, названных «белки лунного света», а также белков с экспериментально подтвержденной многофункциональностью, которые собраны в базе данных MoonProt, включающей и Dps.

Было ясно, что, будучи одним из основных белков бактериального нуклеоида, преимущественно продуцируемый во время стационарной фазы роста бактерий, Dps также действует как ферритин, окисляя токсичные ионы железа и накапливая Fe(III) во внутренней полости, образованной 12 идентичными субъединицами. Окисление Fe(II) катализируется перекисью водорода в ферроксидазных центрах расположенных на стыках субъединиц. Опосредованная Dps конденсация бактериального нуклеоида в стационарной фазе роста в основном происходит за счет присутствия положительно заряженных аминокислотных остатков в его неструктурированных N-концевых модулях. Электростатически прикреплёясь к отрицательно заряженному остову ДНК, они могут способствовать взаимодействию белка с любыми локусами генома. Однако эксперименты Chip-seq и SELEX *in vitro* выявили неслучайное распределение сайтов связывания Dps по всему бактериальному геному.

Другой интересной особенностью Dps является его пространственное распределение в бактериальных клетках. Обнаруженный как нуклеотидный белок голодающих клеток, он, как и ожидалось, был обнаружен в ассоциации с ДНК. Однако воздействие бактериофагов окружающей среды на E. coli MG1655 привело к отбору фаготолерантных бактерий с повышенным образованием биопленок, которые продуцировали фибрилоподобные структуры и накапливали Dps во фракции белков внешней мембраны. Мембранное расположение этого белка изучено плохо, но, изучая белки наружной мембраны, участвующие в резистентности к стрептомицину было показано, что, наряду с активируемыми белками (TolC, OmpT и LamB) E. coli, также присутствует три белка (FadL, OmpW и Dps) у штамма, устойчивого к антибиотикам. Вероятно, присутствие Dps на мембране нельзя объяснить только ее утечкой из мертвых клеток вместе, например, с ДНК. Поэтому, целью данного исследования являлась оценка возможности мембранной локализации многофункционального олигомера Dps E.coli.

Для оценки принципиальной способности Dps взаимодействовать с липидами из соевого лецитина были получены искусственные липосомы, широко используемые в качестве систем доставки лекарств. Среднее значение диаметра полученных липосом составляло 103 нм, что давало избыток молекул Dps (0.55 мМ) от 7.6 до 30.4 раз, при добавлении 20-5 мкл суспензии липосом к раствору белка. Хотя такой большой избыток затруднял обнаружение опосредованного липосомами снижение содержания молекул Dps в экспериментах с использованием метода задержки в геле (EMSA), было зарегистрировано снижение их до 41,6 и 53,7% в присутствии 20 и 15 мкл свежеприготовленных липосом. Это, в целом, указывает на способность Dps связывать мембранные фосфолипиды, вероятно, способом, сходным с сахаро-фосфатным остовом ДНК.

На следующем этапе было проверено предположение о способности клеток E.coli K12 MG1655 содержать Dps на своей поверхности. Для этого бактериальные клетки выращивали до максимального внутриклеточного содержания Dps на питательной среде LB до стационарной фазы (16 и 72 часа). После чего клетки визуализировали с использованием конфокальной микроскопии и антител, несущих флуоресцентный краситель Alexa Fluor 488. В результате было обнаружено около 20% клеток с зеленой флуоресценцией без явной зависимости их количества от времени устойчивого роста. Окрашивание бактерий красным флуоресцентным белком (RFP), полученным с использованием плазмиды pET28b-mCherry, подтвердило присутствие Dps на поверхности клеток и выявило его способность образовывать характерные зернистые структуры. При этом подобного результата не наблюдалось для мутанта *dps-null*, что позволяет предположить, что эти структуры формируются как минимум при участии Dps и свидетельствует об отсутствии значимой перекрестной реактивности антител с другими поверхностными белками E. coli.

Для оценки зависимости этого явления от концентрации клеточного Dps, были использованы клетки E. coli XL-1 Blue. После 16 часов культивирования примерно такой же процент клеток демонстрировал Dps на своей поверхности, как и для клеток E. coli k12 MG1655. Собирая бактерии при различной оптической плотности

(OD600 = 0,4, 0,6, 0,8 и 1,0), было зарегистрировано ожидаемое увеличение процента клеток с зеленой флуоресценцией на поверхности. Трансформируя синие клетки E. coli XL-1 Blue с помощью pGEMΔXba_dps, несущей ген dps под контролем промотора РНК-полимеразы T7 и индуцируя его экспрессию с помощью IPTG, мы получили резко увеличенное количество зеленых клеток. Однако большинство из них образовывало крупные агрегаты, где процент клеток с мембранной локализацией Dps корректно оценить невозможно. Поэтому мы оценили его для отдельно расположенных клеток, и он оказался выше, чем для клеток, выращенных до той же оптической плотности без добавления IPTG. Таким образом, стало ясно, что миграция Dps на клеточную поверхность зависит от его клеточной концентрации. Поскольку агрегаты, образованные клетками E. coli K12 MG1655, выращенными до поздней стационарной фазы (72 ч), обычно не были значительно обогащены зелеными клетками, возможно, что IPTG-индуцированное перепроизводство этого белка облегчает агрегацию.

Исследование выполнено при поддержке РНФ в рамках проекта N 18-14-00348

Модель броуновской динамики образования предварительного комплекса цитохрома С и димера III дыхательного комплекса в люменальном пространстве кристы митохондрий

Абатурова А.М.^{1*}, Ризниченко Г.Ю.¹

¹МГУ, биологический факультет;
abaturova@list.ru

Расширение люмена крист митохондрий наблюдается при многих заболеваниях и при старении, сопровождается падением производства АТФ [1, 2]. Эти явления связаны с нарушением работы цепи митохондриального электронного транспорта на участке от III к IV дыхательному комплексу, где переносчиком электрона является единственный мобильный в люмене переносчик – цитохром с. Небольшой (около 12 кДа) белок, цитохром с (цитС), диффундирует в межмембранном и люминальном пространстве митохондрий и осуществляет перенос электрона от субъединицы цитохром с1 димера комплекса III к комплексу IV. Эту реакцию можно разбить на 2 стадии: связывание свободно диффундирующего белка цитС с цитС1 комплекса III в предварительный комплекс и электронный транспорт между цитохромами. В данной работе представлена модель броуновской динамики первой стадии этого процесса - образование предварительного (encounter) комплекса водорастворимого белка цитС с кофактором цитС1 комплекса III, фиксированного в мембране. На модели изучали влияние начального расположения цитС относительно комплекса III2 и роль электростатических взаимодействий в образовании предварительного комплекса.

С помощью программы ProKSim [3] нами были построены компьютерные модели диффузии, электростатического взаимодействия и связывания окисленного цитС (PDB ID 3O1Y) с восстановленным цит с1 III2 (PDB ID 1BGY) в растворе и люмене кристы. Для расчета электростатического потенциала вокруг белковых молекул использовали формализм Пуассона-Больцмана. Заряды на атомах белка были расставлены в соответствии с силовым полем CHARMM27, дополненным параметрами для гема и железо-серного кластера. Молекулы белков и электростатические потенциалы визуализировали с помощью PyMol (<http://pymol.org/>). Оценка параметров модели образования комплекса цитС1-цитС была предварительно выполнена для реакции в растворе. Значения параметров модели оценивали по экспериментальным данным [4], используя условие совпадения модельной и экспериментальной зависимостей константы связывания от ионной силы [5].

III и IV дыхательные комплексы могут образовывать суперкомплекс – респирасому [6], которая создает своеобразный «электростатический канал», направляющий движение окисленного цитС к комплексу III и движение восстановленного цитС к комплексу IV, обеспечивая быстрый перенос электрона между III и IV комплексами. Набухание крист при заболеваниях приводит к разрушению респирасом [7]. На модели мы исследовали влияние начальных положений и ориентации ЦитС относительно дыхательного комплекса III на скорость образования предварительного комплекса ЦитС1(III2)-ЦитС. Мембраны в модели учитывали как геометрические ограничения. Размеры реакционного объема: толщина люмена кристы (ТЛК) 12 и 16 нм, длина мембран 26 и 30 нм. Получены кинетические кривые образования предварительных комплексов при энергии электростатического взаимодействия белков -3.7кТ и расстоянии между атомами Fe цитС и субъединицы Р III2 менее 3.5 нм для ионной силы 130 мМ, рН 7. Кинетическая кривая связывания белков для каждого начального положения состояла из 20000 точек. Из кривых определяли время полупревращения образования предварительного комплекса белков t1/2. Было проведено по 60000 численных экспериментов диффузии цитС и образования предварительного комплекса с III2.

Исследовали 7 начальных положений цит С, у которых расстояние от атома Fe до Fe гема активного III мономера было 5.6 нм, отстоящих на 0.5 нм от поверхности мембраны. В одной серии численных экспериментов ориентация цитС была случайной относительно фиксированного положения центра масс цитС, в других была

фиксирована и соответствовала средней структуре 10000 положений цитС, полученных в предварительных расчетах диффузии цитС. Эти ориентации цитС может преобрести, если до связывания с cytC1 он долго диффундировал в электростатическом поле респирасомы.

Для 4 начальных положений цит С, лежащих ближе к IV комплексу в респирасоме 5GPN, получено $t_{1/2}$ 0.5-0.9 мкс, для остальных 3 положений $t_{1/2}$ 1.2-1.7 мкс. При увеличении толщины люмена кристы от 12 до 16 нм наблюдается увеличение вероятности нахождения цитС в области неактивной субъединицы цитС1 D III2 и увеличение времени $t_{1/2}$ на 4-18%. Самое большее отличие $t_{1/2}$ на 18% было получено для цитС предварительно не ориентированного в поле белков и из положения, лежащего ближе всего в респирасоме 5GPN к IV. Полученный эффект может способствовать уменьшению скорости транспорта электрона цитС при расширении крист и одновременном увеличении расстояния между дыхательными комплексами [7], когда цитС не может предварительно занять ориентацию в электростатическом поле респирасомы. Дальнейшее рассмотрение детальной модели, учитывающей структуру респирасом в кристах, позволит выявить их влияние на перенос электрона в дыхательной цепи.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500060-0.

Литература

1. L. Colina-Tenorio et al., 2018 Shaping the mitochondrial inner membrane in health and disease, DOI: 10.1111/joim.13031
2. Siegmund S.E. et al., 2018, DOI: 10.1016/j.isci.2018.07.014
3. Хрущев С.С. и др. 2013, 47-64., DOI: 10.20537/2076-7633-2013-5-1-47-64
4. G. Engstrom, R. Rajagukguk, A. J. Saunders, C. N. Patel, S. Rajagukguk, T. Merbitz-Zahradnik, K. Xiao, G. J. Pielak, B. Trumpower, C. A. Yu, L. Yu, B. Durham, F. Millett, Biochemistry, vol.42, pp. 2816-24 (2003), DOI: 10.1021/bi027213g
5. Abaturova A.M. et. al. // ITM Web of Conferences, V. 31., 2020. DOI: 10.1051/itmconf/20203104001
6. Lapuente-Brun, E.; Moreno-Loshuertos, R.; Acin-Perez, R. et al. (2013). Science 340 (6140): 1567–1570. DOI:10.1126/science.1230381
7. Sara Cogliati et al., 2013, DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.032

Модель организации хроматина в ядре биологической клетки по данным малоуглового рассеяния (МУР)

Яшина Е.Г.^{1,2*}, Варфоломеева Е.Ю.¹, Пантина Р.А.¹, Байрамуков В.Ю.¹, Ковалев Р.А.¹, Федорова Н.Д.¹,
Григорьев С.В.¹

¹Петербургский институт ядерной физики НИЦ КИ;

²Санкт-Петербургский Государственный Университет;
yashina_91@inbox.ru

Вопрос о том, каким образом невероятно длинная макромолекула ДНК уложена в относительно компактном ядре биологической клетки является одним из фундаментальных проблем микробиологии. На сегодняшний момент наиболее популярным методом для исследования генома является метод Hi-C - захвата конформации хромосом [1]. С помощью этого метода было идентифицировано, что хроматин делится на два полногеномных компартмента: «открытый» хроматин образует компартмент А, «закрытый» хроматин - компартмент В. Компартмент В упакован плотнее, а взаимодействующие гены проявляют большую тенденцию к близкой пространственной локализации, иными словами, гены чаще всего взаимодействуют с соседними генами. В то время как в компартменте А находятся активно транскрибируемые гены, для которых необходима большая доступность для осуществления экспрессии генов и сборок молекулярных машин.

Наиболее популярной моделью для описания крупномасштабной упаковки ДНК является модель фрактальной глобулы, предложенная Гроссбергом в конце 20-ого века. Согласно этой модели нить ДНК, подобно кривой Гильберта, полностью заполняет трехмерное пространство без самопересечений, а ее размерность равна $DF=3$ [2]. Данная модель является хорошим приближением для описания «закрытого» хроматина (Компартмента В), массовая доля которого превалирует в ядре. Однако, эта модель, видимо, не описывает структуру «открытого» хроматина (Компартмента А).

Эксперименты по МУРН, Ультра МУРН и Спин-Эхо МУРН на разных типах ядер: куриных эритроцитов [3], ядра HeLa [4] и крысиных лимфоцитов [5], показали, что наднуклеосомная организация хроматина представляет собой двухуровневую фрактальную структуру.

Мелкомасштабный фрактальный уровень описывается моделью объемного фрактала, в то время как крупномасштабный фрактальный уровень описывается моделью логарифмического фрактала. Эксперименты по МУРН демонстрируют корреляцию транскрипционной активности ядер HeLa с наличием и размером объемно

фрактальной структуры в организации хроматина. По-видимому, открытый хроматин компартмента А описывается структурой объемного фрактала. Кроме того, с точки зрения МУР однородно заполненное пространство фрактальной глобулы представляет собой сплошную среду с границей по краю ядра [6].

Обобщая результаты по МУР и принимая во внимание успех описания неактивного (закрытого) хроматина моделью фрактальной глобулы [1,2], мы предлагаем би-фрактальную модель [3-6] организации активного (открытого) хроматина. Неактивный хроматин является плотной, однородной средой, заполняющей все пространство ядра и служащей контрастом для МУР, на фоне которого и наблюдается бифрактальная структура активного хроматина. На масштабах от нескольких десятков до нескольких сотен нанометров активный хроматин формируется в структуру объемного фрактала с фрактальной размерностью равной $DF=2.5$, в то время, как на масштабах от нескольких сотен нанометров до нескольких микрометров (вплоть до размера самого ядра), активный хроматин образует структуру логарифмического фрактала. В классификации МУРН на фрактальных объектах, модель объемного фрактала соответствует однородной самоподобной классической фрактальной структуре. Она характеризуется хаусдорфовой размерностью DF и наблюдается в эксперименте, как убывающая степенная зависимость интенсивности малоуглового рассеяния от вектора рассеяния с показателем $2 < \nu < 3$ ($\nu = DF$). При этом модель логарифмического фрактала описывает иерархическую структуру, которая описывается логарифмической мерой и формируется согласно принципу сохранения объема при изменении масштаба. Экспериментально структура логарифмического фрактала наблюдается как кубический закон в интенсивности малоуглового рассеяния. Принцип построения этого фрактала до второй итерации следующий: пусть изначально имеется куб объема V ; далее к вершинам куба объемом V добавляются 8 одинаковых кубов поменьше, таких что их суммарный объем равен объему исходного куба V ; на следующей итерации к вершинам каждого из добавленных в предыдущей итерации куба добавляются еще 8 кубов поменьше, таких что их суммарный объем равен объему также равен объему исходного куба V и т.д. В ядрах некоторых клеток число итераций доходит до 4 или 5.

Мы полагаем, что результаты экспериментов Hi-C метода [1-2] и метода МУРН [2-6] дают достаточно полную информацию о структуре ядра, на основе которой можно построить полномасштабную модель организации хроматина в интерфазном ядре клетки. В настоящей работе сделана первая попытка построения такой модели. Вопрос о механизме формирования объемного и логарифмического фрактала в среде активного хроматина остается открытым.

Авторы выражают благодарность А. Радулеску и В. Пипичу за помощь в проведении экспериментов по малоугловому рассеянию нейтронов на установках KWS-2 и KWS-3.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-12-00188).

1.Lieberman-Aiden E. et al. Science, 326, 289 (2009).

2.Halverson J.D.et al., Rep. Prog. Phys., 77, 022601 (2014).

3.Grigoriev S. V. et al., Physical Review E, 102, 3, 032415 (2020).

4.Grigoriev, S. V. et al. Physical Review E, 104, 4, 044404 (2021).

5.Iashina E. G. et al., Physical Review E, 104, 064409 (2021).

6.Iashina E. G., Grigoriev S. V., JETP, 129, 3, 455-458 (2019).

Модификация аптамера AS1411 с целью модуляции его аффинности к белку нуклеолину в зависимости от pH среды

Габрусёнок П.В.^{1*}, Соколов П.А.¹

¹*Санкт-Петербургский государственный университет;*

p.v.gabrusenok@gmail.com

Адресная доставка лекарственных препаратов к тканям и в определенные клетки до сих пор остается не решенной полностью проблемой. ДНК-аптамеры представляют перспективным средством направленной доставки противораковых препаратов в ткани организма с заданными свойствами [1]. Использование аптамеров в этом случае может снижать иммунные реакции и разнообразные побочные эффекты в том числе за счет настройки активности аптамера под такие особенности среды раковых тканей как, например, пониженное значение pH. Ранее уже была показана возможность изменения аффинности АТФ-аптамера к мишени в зависимости от pH среды путем добавления к последовательности аптамера некоторой регуляторной последовательности, интерферирующей со структурой аптамера в определенных диапазонах pH [2]. В данной работе экспериментально показана возможность адаптации указанного механизма pH-зависимости к аптамеру с иной структурой.

В нашей работе продемонстрирована работоспособность метода модификации консервативного аптамера AS1411 к белку нуклеолину [3], модулирующего его аффинность к мишени в зависимости от pH среды.

Нуклеолин был выбран в качестве мишени для противораковой терапии [4,5] по той причине, что в здоровых клетках он находится преимущественно в клеточном ядре, а в переживших раковую трансформацию клетках наблюдается также и на клеточной стенке, и в цитоплазме [6], что делает его надежным маркером опухолевой ткани. Поскольку метод титрования мишенью модифицированного аптамера к АТФ неприменим к нуклеолиновому аптамеру в силу малой стабильности самого нуклеолина и сложности его наработки и выделения, был разработан альтернативный подход к проверке работоспособности рН-зависимой системы. Предлагаемый подход позволяет исключить использование целевых молекул (белков) из экспериментов *in vitro* при работе с консервативными аптамерами (такими как AS1411), переход которых в функциональную конформацию вызван не присутствием мишени, а параметрами среды.

Для реализации рН-зависимой модификации, аптамерная последовательность AS1411 была дополнена 3'-концевым участком (*interfere-tail*), комплементарным 5'-концу аптамера (*quad-tail*) и содержащим один мисматч А·G. Эти последовательности были соединены полииминовым (полиТ) линкером. Снижение показателя рН приводит протонированию аденина в паре А·G, что повышает стабильность дуплекса *quad-tail:interfere-tail* [7]. Исходный же аптамер AS1411 при используемых в работе ионных силах и рН формирует квадруплексную структуру с температурой плавления порядка 55°C. Поэтому мы полагаем, что в случае отсутствия гибридизации участков *interfere-tail* и *quad-tail* аптамерная последовательность AS1411 переходит к функциональной конформации, аналогично тому как это происходит с исходным аптамером AS1411 при температурах, близких к комнатной. По этой причине модификация аптамера указанным способом позволяет изменять фракцию функциональных аптамеров в растворах в зависимости от рН. Стабильность дуплекса *quad-tail:interfere-tail* оценивалась по флуоресценции красителя Cy3, находящегося на 5'-конце модифицированного аптамера, которая зависела от расстояния до тушителя BNQ2 на 3'-конце, позволяя косвенно судить о величине фракции «включенных» аптамеров. Оригинальным методом конкурентного связывания сигнальных олигонуклеотидов с интерферирующим участком *interfere-tail* проверяли работоспособность предложенного дизайна аптамера. Он заключался в титровании раствора модифицированного аптамера раствором сигнальных олигонуклеотидов в заданном рН. При этом в растворах с низким рН люминесценция цианиновой метки изменялась незначительно, а в растворах с рН > 6,5 при титровании наблюдался многократный рост интенсивности люминесценции, свидетельствуя о переходе аптамера к функциональной конформации.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-25-00302.

1. Ireson C.R., Kelland L.R. Discovery and development of anticancer aptamers // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006. Vol. 5, № 12. P. 2957–2962.

2. Thompson I.A.P. et al. Rational design of aptamer switches with programmable pH response // *Nature Communications* 2020 11:1. Nature Publishing Group, 2020. Vol. 11, № 1. P. 1–7.

3. Bie L. et al. Insights into the binding mode of AS1411 aptamer to nucleolin // *Front Mol Biosci. Frontiers Media S.A.*, 2022. Vol. 9.

4. Mosafer J. et al. Study and evaluation of nucleolin-targeted delivery of magnetic PLGA-PEG nanospheres loaded with doxorubicin to C6 glioma cells compared with low nucleolin-expressing L929 cells. // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. Elsevier Ltd*, 2016. Vol. 72. P. 123–133.

5. Brignole C. et al. Cell surface Nucleolin represents a novel cellular target for neuroblastoma therapy // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. BioMed Central Ltd*, 2021. Vol. 40, № 1. P. 1–13.

6. Mongelard F., Bouvet P. Nucleolin: a multiFACeTed protein // *Trends Cell Biol. Trends Cell Biol*, 2007. Vol. 17, № 2. P. 80–86.

7. Lee J.A., Derosa M.C. A pH-driven DNA switch based on the A+·G mispair // *Chemical Communications. The Royal Society of Chemistry*, 2010. Vol. 46, № 3. P. 418–420.

Молекулярная динамика α -спиральной поли-L-глутаминовой кислоты в водном растворе

Чиргадзе Ю.Н.¹, Лихачев И.В.², Балабаев Н.К.², Бражников Е.В.^{1*}

¹*Институт Белка РАН, Пущино, Россия;*

²*Институт математических проблем биологии, филиал Института прикладной математики им.*

М.В. Келдыша РАН, Пущино, Россия;

tefg@vega.protres.ru

α -Спираль является фундаментальным элементом вторичной структуры, с участием которой построены глобулярные белки. Поскольку в нативном состоянии белок существует в водной среде, структурное поведение белка существенным образом определяется его динамическими свойствами. Проблема изучения структуры белков в их нативном состоянии состоит в том, что в большинстве случаев она определена только для

кристаллов. В данной работе мы исследовали динамические свойства поли-L-глутаминовой кислоты в виде структурной модели в спиральной конформации в водном растворе. Модель включает в себя 16 Glu остатков, расположенных в правой α -спирали из 4,5 витков, построенной по данным Полинга и Кори (Pauling & Corey, 1951), в водном растворе, 0,2 М NaCl. В кислой среде при pH около 3,5 поли-L-глутаминовая кислота имеет спиральную конформацию. Поэтому наша модель имеет неионизированные боковые карбонильные группы Glu, в виде COOH, и ионизированные терминальные группы, в виде NH_3^+ и COO^- . В нашем случае детальный анализ динамики всех атомных групп не является целью работы. Мы сконцентрировали работу на изучении только пептидного остова из $\text{C}\alpha$ -атомов. Система включала в себя спиральный пептидный фрагмент, молекулы водной среды, а также 11 ионов натрия и 9 ионов хлора, что обеспечивало электронейтральность раствора. Численная симуляция динамического процесса была выполнена на суперкомпьютере К-60 Института прикладной математики имени Келдыша Российской академии наук. Начальный участок траектории, от 0 до 500 пикосекунд, включал в себя уточнение структуры системы и ее релаксацию. Основная часть траектории α -спиральной поли-L-глутаминовой кислоты была получена в диапазоне от 0,0 до 25,0 наносекунд. Мы проанализировали флуктуации цепи $\text{C}\alpha$ -атомов в различные моменты времени с шагом в 1 наносекунду. Анализ выполнен по данным модулей сдвигов позиций $\text{C}\alpha$ -атомов для двух близких по времени состояний. В пептидной модели вдоль динамической траектории наблюдаются разные функциональные моды. Наиболее интересные моды имеют характерные сдвиги $\text{C}\alpha$ -атомов. Эти моды включают два кластера $\text{C}\alpha$ -атомов из соседних витков спирали, причем кластеры расположены приблизительно на одной стороне спирали. Обнаруженные моды флуктуации представляют собой динамическое свойство свободного фрагмента структуры α -спирали. Мы предполагаем, что оно может играть ключевую роль в динамике молекул белков.

Молекулярная динамика цитотоксинов кобр в высокоподвижной модельной мембране — эффективный инструмент изучения их структурно-функциональных свойств

Дубовский П.В.^{1*}, Коншина А.Г.¹, Ефремов Р.Г.¹

¹ИБХ РАН;

pvdubov@ya.ru

Цитотоксины (ЦТ) из яда кобр – мембрано-активные полипептиды длиной 59-61 аминокислотных остатков. Они обладают антимикробной и антираковой активностями. В их основе — способность ЦТ дестабилизировать плазматическую мембрану бактериальных и опухолевых клеток и/или их внутриклеточных органелл. ЦТ принадлежат к семейству трёх-петлевых белков. Их структурная особенность – присутствие гидрофобного ядра, сформированного 4-мя консервативными дисульфидными связями, из которого исходят три бета-структурные шпильки, или петли. Доказано, что ЦТ взаимодействуют с липидными мембранами окончаниями этих петель [1]. С фундаментальной точки зрения представляет интерес взаимосвязь аминокислотного состава окончаний петель ЦТ с их способностью к встраиванию в мембраны различного липидного состава. Наиболее детальную информацию можно получить, проводя расчеты молекулярной динамики (МД) белка в водно-липидном окружении в полноатомном приближении. Однако на сегодняшний день имеется пример только одного такого успешного изучения: встраивания цитотоксина 2 (ЦТ2) из яда среднеазиатской кобры *N. oxiana* в бислой пальмитоилолеоилфосфатидилхолина (ПОФХ) [1]. Показано, что в ходе МД длительностью 1 мкс молекула ЦТ2 последовательно встраивает в бислой окончания первой, второй и затем третьей петли. При рассмотрении ЦТ с менее гидрофобными окончаниями петель, например, цитотоксина 1 (ЦТ1) из яда *N. oxiana*, этот процесс гораздо более продолжительный. Применение «высокоподвижной модели мембраны» (НМММ, Highly Mimetic Membrane Model) [2] позволяет не только сохранить молекулярные детали взаимодействия белок-мембрана, но и ускорить процесс встраивания токсина в липидный бислой.

В модели НМММ полноразмерные молекулы липидов заменены укороченными аналогами, а в центре мембраны – слой органического растворителя, в частности, дихлорэтана. В такой мембране молекулы липидов характеризуются коэффициентами латеральной диффузии, которые на два порядка больше, чем для обычных мембран. В то же время профиль атомной плотности НМММ системы практически идентичен профилю полноразмерной модели. Это делает модель НМММ особенно привлекательной для изучения встраивания в мембрану именно периферических мембранных белков и пептидов, к которым относятся ЦТ.

В данной работе изучили встраивание и динамику ЦТ1 в бислое ПОФХ. На первом этапе применяли НМММ-приближение. В качестве стартовой модели ЦТ1 использовали структуру ЦТ1 в мицелле додецилфосфохолина [3]. Молекулу токсина располагали вне бислоя, состоящего из 200 молекул липидов (100 в каждом монослое). Варьируемым параметром модели НМММ является коэффициент масштабирования липидов (R_{sa}), или отношение площади, приходящейся на молекулу липида в бислое НМММ, к соответствующей площади в полноатомном бислое. Рассматривали два бислоя со значениями $R_{sa}=1,0$ и $1,1$. В обоих случаях число

атомов углерода в ацильной группе молекул липидов было равно 6. При $R_{sa}=1,1$ молекула ЦТ1 завершала цикл встраивания трёх петель молекулы в бислой НМММ в течение 200 нс (силовое поле CHARMM36m). При $R_{sa}=1,0$ – за ~500 нс. Для детального изучения влияния встроенной молекулы ЦТ1 на липидный бислой ПОФХ (и наоборот) на следующем этапе НМММ-мембрану конвертировали в полноатомный бислой. После уравнивания системы МД-расчёты велись в течение 200 нс. На равновесном участке полноатомной траектории определяли значения площади, приходящиеся на молекулу липида в верхнем и нижнем монослоях, а также площадь, занимаемую молекулой токсина, и дейтериевые параметры порядка ацильных цепей молекул ПОФХ. Как для $R_{sa}=1,0$, так и $1,1$ соответствующие наборы параметров оказались практически совпадающими. Это означает, что значение $R_{sa}=1,1$ является оптимальным для изучения встраивания токсина в липидный бислой, так как обеспечивает неплохое согласие с результатами полноатомной МД и при этом позволяет существенно уменьшить время вычислительного эксперимента.

Предложенный двухступенчатый подход к изучению встраивания ЦТ в липидные мембраны может быть масштабирован на другие ЦТ и периферические мембранные белки.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант 23-44-10021).

Литература:

1. Konshina AG, Dubovskii PV, Efremov RG. Stepwise Insertion of Cobra Cardiotoxin CT2 into a Lipid Bilayer Occurs as an Interplay of Protein and Membrane "Dynamic Molecular Portraits". J Chem Inf Model. 2021, 61(1):385-399.
2. Ohkubo YZ, Pogorelov TV, Arcario MJ, Christensen GA, Tajkhorshid E. Accelerating membrane insertion of peripheral proteins with a novel membrane mimetic model. Biophys J. 2012, 102(9):2130-9.
3. Dubovskii PV, Dubinnyi MA, Volynsky PE, Pustovalova YE, Konshina AG, Utkin YN, Arseniev AS, Efremov RG. Impact of membrane partitioning on the spatial structure of an S-type cobra cytotoxin. J Biomol Struct Dyn. 2018, 36(13):3463-3478.

Молекулярно-динамические характеристики взаимодействия гликопротеина Ib и фактора фон Виллебранда

Федотова И.В.^{1*}, Беляев А.В.¹

¹*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет,
кафедра биофизики, Москва, Россия;
fedotova.iv18@physics.msu.ru*

Тромбоцитарный гемостаз является первым этапом механизма остановки кровотечения при повреждении сосуда. Основным звеном этого процесса являются тромбоциты – клетки, способные предотвращать кровопотерю путем адгезии к белкам субэндотелиального матрикса и последующей агрегации. Решающее значение на начальных этапах формирования тромбоцитарного агрегата в сосудах с высоким напряжением сдвига – в артериолах, венах и артериях – имеет притягивающее специфическое нековалентное взаимодействие между белком плазмы крови фактором фон Виллебранда (vWF) и мембранным рецептором тромбоцитов гликопротеином Ib (GPIb).

Фактор фон Виллебранда циркулирует в кровотоке в виде длинных линейных мультимеров, которые стремятся принять компактную конформацию в отсутствие внешних механических воздействий. Увеличение напряжений сдвига в среде влечет за собой изменение конформации фактора фон Виллебранда на линейную. В такой форме vWF становится способным обратимо связываться с коллагеном и тромбоцитарным рецептором гликопротеином Ib (GPIb) через домен A1. Таким образом, фактор фон Виллебранда может обеспечить снижение скорости тромбоцита вплоть до его полной остановки в области повреждения сосуда [1].

Из литературы известно, что мутации домена A1 фактора фон Виллебранда влияют на его взаимодействие с гликопротеином Ib и могут приводить к болезни Виллебранда – наследственному нарушению агрегации тромбоцитов [2].

На сегодняшний день получено представление о механизмах адгезии и агрегации тромбоцитов, а также есть понимание структурных особенностей мутаций белков, приводящих к болезни Виллебранда, однако молекулярные механизмы взаимодействия домена A1 фактора фон Виллебранда дикого типа и его мутантных структур с GPIb остаются недостаточно изученными. Целью настоящей работы является уточнение теоретических представлений о молекулярных механизмах адгезии тромбоцитов в условиях артериального кровотока.

В работе методами молекулярной динамики исследуется взаимодействие GPIb и домена A1 vWF дикого типа, а также его мутаций, приводящих к болезни Виллебранда типов 2М и 2В. В программном пакете GROMACS с использованием суперкомпьютера Ломоносов-2 построена компьютерная модель, реализующая растяжение белкового комплекса GPIb–A1vWF сдвиговыми силами в физиологических условиях. Рассчитано

значение энергии диссоциации связи GPIb–A1vWF. Методом анализа взвешенных гистограмм построен потенциал средней силы для притягивающих взаимодействий белков GPIb и vWF дикого типа. Предложено объяснение механизма усиления адгезии белков при высоких сдвиговых напряжениях. Получены силовые характеристики и проведен анализ механо-химических особенностей процессов диссоциации связи для различных мутантных структур vWF, соответствующих болезни Виллебранда типов 2М и 2В.

В будущем планируется использовать предложенный в работе подход для численного анализа потенциально опасных мутаций белков, обеспечивающих агрегацию тромбоцитов. Исследование механизмов, управляющих взаимодействием фактора фон Виллебранда с тромбоцитами, имеет важное фундаментальное и медицинское значение и может помочь прогнозировать оптимальные стратегии лечения нарушений гемостаза у пациентов с болезнью Виллебранда.

Работа выполняется при поддержке гранта РНФ № 22-21-00221.

Литература.

1. Springer T.A. von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream // *Blood*. 2014, №124(9). p. 1412-1425.
2. Yago T., Lou J., Wu T., et al. Platelet glycoprotein Iba1 forms catch bonds with human WT vWF but not with type 2B von Willebrand disease vWF // *The Journal of clinical investigation*. 2008, №118(9). p. 3195-3207.

Молекулярно-динамическое моделирование монослой-монослойного слияния мембран

Минкевич М.М.^{1*}, Молотковский Р.Ю.¹, Батищев О.В.¹

¹ИФХЭ РАН;

maria.minkevich16@gmail.com

Слияние мембран участвует во множестве важнейших биологических процессов, таких как секреция, передача сигнала, экзоцитоз и т.д. Процесс слияния мембран сопряжен с преодолением высоких энергетических барьеров, поскольку много энергии требуется для преодоления гидратационного отталкивания и локальных деформаций в мембранах. Слияние инициируется на расстоянии 2-3 нм между мембранами, затем в мембранах образуются точечные выступы ацильных концов липидов. Притяжение между ними приводит к образованию stalka, а затем поры слияния [1]. Stalk является ключевой структурой слияния, поскольку энергетический барьер на образование stalka определяет скорость процесса слияния.

Kalutsky et al., 2022 изучили процесс слияния монослойной и бислойной мембран между пероксисомами и липидными каплями и оценили энергетический профиль для бислойно-монослойного слияния [2]. Результаты показали, что stalk, образованный при слиянии монослоя с бислоем, был энергетически более стабильным, чем в случае бислойного слияния. Примечательно, что стабильность stalka повысилась по двум основным причинам: 1) добавление различных липидных компонентов к мембранам, таких как DOPE; 2) сокращение расстояния между мембранами.

Цель данного исследования - воспроизвести протокол из Kalutsky et al., 2022 для слияния монослоев с использованием методов молекулярной динамики. Нами предполагалось выяснить, как изменяется энергетический барьер при слиянии двух монослоев по сравнению с двумя вышеописанными случаями. Также предполагалось изучить влияние на стабильность stalka изменение содержания липидов в мембранах и начального расстояния между мембранами.

Для этой цели мы используем модифицированную версию GROMACS 2018.8 со специально разработанной координатой реакции ξ_{ch} , называемой “цепная координата” [3]. Эта цепная координата описывает взаимодействие двух монослоев в ограниченном цилиндрическом объеме. Использование “цепной координаты” позволило воспроизвести полученные ранее результаты, а также оценить барьер на образование stalka для монослой-монослойного слияния.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант №22-23-00551.

1. Poojari, C.S., Scherer, K.C. & Hub, J.S. Free energies of membrane stalk formation from a lipidomics perspective. *Nat Commun* 12, 6594 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26924-2>
2. Kalutsky, M.A.; Galimzyanov, T.R.; Molotkovsky, R.J. A Model of Lipid Monolayer–Bilayer Fusion of Lipid Droplets and Peroxisomes. *Membranes* 2022, 12, 992. <https://doi.org/10.3390/membranes12100992>
3. Hub, J.S.; Awasthi, N. Probing a Continuous Polar Defect: A Reaction Coordinate for Pore Formation in Lipid Membranes. *J. Chem. Theory Comput.* 2017, 13, 2352–2366.

Молекулярное моделирование как инструмент изучения молекулярных механизмов антибактериального и противовирусного действия катионных фотосенсибилизаторов

Холина Е.Г.^{1*}, Федоров В.А.¹, Хрущев С.С.¹, Коваленко И.Б.^{1,2}, Страховская М.Г.^{1,2}, Рубин А.Б.¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и
медицинских технологий ФМБА России, Москва, Россия;

tenarra@mail.ru

Одним из подходов для борьбы с патогенами, устойчивыми к традиционным антимикробным препаратам, является фотодинамическая инактивация, в которой используются фотоактивируемые биоциды – фотосенсибилизаторы. Помимо бактерицидного действия, катионные фотосенсибилизаторы высоко эффективны в отношении оболочечных вирусов, мембраны которых происходят из мембран клетки-хозяина. Одним из наиболее эффективных фотосенсибилизаторов в отношении инактивации широкого ряда микроорганизмов является октаakis(холинил)фталоцианин цинка (ФЦ). Целью данной работы было изучение межмолекулярных взаимодействий при связывании ФЦ с компонентами оболочек микроорганизмов и их переносе через мембранные структуры микроорганизмов.

Для изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе антибактериальной активности ФЦ, был применен метод крупнозернистой молекулярной динамики. С помощью метода зонтичной выборки было показано сродство молекул ФЦ к модельным бактериальным мембранам и описан процесс переноса ФЦ через модельные бислои. В результате энергетически выгодного проникновения ФЦ через модельную внешнюю липополисахаридную бактериальную мембрану наблюдалось образование водной поры и деформация бислоя. В ходе последующего равновесного расчета молекулярной динамики с добавлением десяти молекул ФЦ к бислою в состоянии энергетического минимума была подтверждена гипотеза о самоиндуцированном проникновении ФЦ внутрь бактериальной липополисахаридной мембраны, объясняющая природу антибактериальной активности данной группы фотосенсибилизаторов [1].

Для объяснения вирулицидной активности катионных фотосенсибилизаторов и идентификации сайтов их связывания с компонентами вирусной оболочки было построено распределение электростатического потенциала и проведены расчеты броуновской динамики как для моделей отдельных S-белков коронавируса [2,3], так и для целого вириона SARS-CoV-2 [4]. С помощью метода броуновской динамики были получены диффузионно-столкновительные электростатически выгодные комплексы фотосенсибилизаторов с S-белками коронавируса. Для молекул фотосенсибилизаторов было показано наличие общего сайта связывания со всеми исследованными спайковыми белками SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, расположенного в области соединения «ноги» и «головы» на расстоянии около 10 нм от вирусной мембраны. Поскольку диффузионное расстояние синглетного кислорода, который генерируется молекулами фотосенсибилизатора, составляет 10-55 нм, он может вызвать окислительное повреждение как самих спайковых белков, так и липидного бислоя вирионов, в результате чего происходит инактивация вируса.

Следующим этапом исследования было изучение взаимодействия ФЦ с целой моделью оболочки SARS-CoV-2. Для этой цели была использована крупнозернистая модель [5], созданная группами под руководством S.J. Marrink и D. Korkin. Рассчитанная нами электростатическая карта оболочки вириона SARS-CoV-2 демонстрировала крайне неоднородное поле электростатического потенциала с большими чередующимися областями положительного и отрицательного потенциала. Чтобы выяснить, с какими компонентами вирусной оболочки SARS-CoV-2 связываются молекулы ФЦ, было проведено сорок тысяч независимых расчетов броуновской динамики молекулы ФЦ относительно неподвижной оболочки вируса. В 43% полученных диффузионно-столкновительных комплексов молекулы ФЦ были связаны с мембранными белками SARS-CoV-2. Среди них около 80 % образовывали электростатические контакты с S-белками. В остальных 57% комплексов молекулы ФЦ не имели тесных контактов с мембранными белками, а были связаны только с отрицательно заряженными липидами. Таким образом, все отрицательно заряженные компоненты оболочки притягивают молекулы фотосенсибилизатора и являются потенциальными мишенями для синглетного кислорода, образующегося в фотосенсибилизированных реакциях. Результаты, полученные с применением методов компьютерного моделирования, согласуются с наблюдаемой в экспериментальных исследованиях потерей S-белков и разрушением мембраны в результате фотодинамической инактивации коронавируса.

Применение методов компьютерного моделирования позволило описать конкретные пути переноса катионных фотосенсибилизаторов через бактериальную клеточную стенку и выявить области связывания молекул данного класса биоцидов на оболочке коронавируса. Знание молекулярных деталей, лежащих в основе вирулицидной и бактерицидной активности соединений, способствует их рациональному применению в медицинских целях и служит основой для успешного дизайна новых эффективных антимикробных агентов.

Литература

1. Orekhov P. S. Molecular mechanism of uptake of cationic photoantimicrobial phthalocyanine across bacterial membranes revealed by molecular dynamics simulations / P. S. Orekhov, E. G. Kholina, M. E. Bozdaganyan, A. M. Nesterenko, I. B. Kovalenko, M. G. Strakhovskaya // J. Phys. Chem. B. 2018. V. 122. № 14. P. 3711—3722.
2. Sharshov K. The photosensitizer octakis (Cholanyl) zinc phthalocyanine with ability to bind to a model spike protein leads to a loss of SARS-CoV-2 infectivity in vitro when exposed to far-red LED / K. Sharshov, M. Solomatina, O. Kurskaya, I. Kovalenko, E. Kholina, V. Fedorov, G. Meerovich, A. Rubin, M. Strakhovskaya // Viruses. 2021. V. 13. № 4. P. 643.
3. Fedorov V. What Binds Cationic Photosensitizers Better: Brownian Dynamics Reveals Key Interaction Sites on Spike Proteins of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 / V. Fedorov, E. Kholina, S. Khruschev, I. Kovalenko, A. Rubin, M. Strakhovskaya // Viruses. 2021. V. 13. № 8. P. 1615.
4. Fedorov V. Electrostatic Map of the SARS-CoV-2 Virion Specifies Binding Sites of the Antiviral Cationic Photosensitizer / V. Fedorov, E. Kholina, S. Khruschev, I. Kovalenko, A. Rubin, M. Strakhovskaya // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 13. P. 7304.
5. Pezeshkian W. Molecular architecture and dynamics of SARS-CoV-2 envelope by integrative modeling / W. Pezeshkian, F. Grünwald, O. Narykov, S. Lu, T.A. Wassenaar, S.J. Marrink, D. Korkin // bioRxiv. 2022. P. 2021.09.

**Молекулярные детерминанты цинк-зависимых взаимодействий бета-амилоида как
инновационная платформа для создания лечебной технологии нейродегенеративных
заболеваний**

Козин С.А.^{1*}

¹*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН);
kozinsa@gmail.com*

Бета-амилоид был открыт в середине 1980-х в качестве главного пептидного компонента фибриллярных агрегатов (амилоидных бляшек), которые расположены на поверхности нейронов головного мозга пациентов с диагнозом болезни Альцгеймера, а также пациентов с другими нейродегенеративными заболеваниями. Мономерные молекулы бета-амилоида присутствуют в крови и спинномозговой жидкости в низких наномолярных концентрациях как в норме, так и при патологии. Агрегация бета-амилоида с последующим образованием амилоидных бляшек является необходимым условием инициирования патологического каскада нейродегенерации и нейровоспаления при болезни Альцгеймера. Физиологическая роль бета-амилоида может состоять в регуляции синаптической функции, защите от инфекций, восстановлении пораженных участков гематоэнцефалического барьера и компенсации последствий травмы. Актуальными направлениями исследований в области создания эффективных технологий лечения нейродегенеративных заболеваний являются: (1) определение причин, по которым эндогенный бета-амилоид начинает подвергаться патологической агрегации; (2) выяснение роли бета-амилоида в инициировании нейровоспалительных и нейродегенеративных процессов. Сравнительный анализ структурно-функциональных свойств различных природных изоформ бета-амилоида человека и ряда млекопитающих позволил установить роль аминокислотного участка 1-DAEFRHDSGYEVNHQK-16 в качестве металл-связывающего домена бета-амилоида. Установлено, что бета-амилоид через свой фрагмент 11-EVNH-14 образует цинк-зависимые олигомеры и агрегаты, а также участвует в образовании нековалентных цинк-связанных комплексов со специфическими молекулярными партнёрами (белками, нуклеиновыми кислотами, гормонами, сигнальными молекулами и т.п.). Ряд экспериментальных наблюдений указывает на то, что именно такие комплексы в отличие от свободного бета-амилоида являются действующими игроками как нормальных, так и патогенных физиологических процессов. Соответственно, модулирование образования цинк-индуцированных комплексов бета-амилоида посредством рационально сконструированных агентов, специфически связывающихся с доменом 1-16 и/или с участком 11-14, является перспективным инструментом контроля процессов с участием молекул бета-амилоида в норме и при патологии.

Молекулярные механизмы антибиотикорезистентности, связанные с гидролизом β - лактамных антибиотиков

Кривицкая А.В.^{1*}, Хренова М.Г.^{2,1}

¹ФИЦ Биотехнологии РАН;

²МГУ им. Ломоносова;

al.krivickaya@mail.ru

На долю β -лактамных антибиотиков приходится 70% всех лекарственных средств. Для β -лактамных антибиотиков преобладающими механизмами устойчивости являются модификация пенициллин связывающих белков и инактивация антибиотиков бактериальными ферментами β лактамазами. Оба эти процесса на примере реакции ингибирования пенициллин-связывающего белка 2 (ПСБ2) из *Neisseria Gonorrhoeae* антибиотиком цефтриаксоном и реакции инактивации антибиотика имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM 1 были рассмотрены методами молекулярного моделирования. Комбинированными методами квантовой механики/молекулярной механики описан эффект активации субстрата ферментом, установлены молекулярные механизмы реакций в активных центрах этих ферментов, а методами классической молекулярной динамики проанализированы конформационные перестройки в структурах исследуемых объектов.

Пенициллин-связывающие белки 2 из *Neisseria Gonorrhoeae* являются критически важными ферментами в формировании клеточной стенки бактерий. Ингибирование ПСБ2 используется при лечении различных заболеваний, включая гонорею. Цефтриаксон — единственный препарат, используемый в настоящее время для лечения гонореи, он встраивается в активный центр ПСБ2 вместо природного субстрата, необратимо ингибируя таким образом действие фермента. Однако известны случаи резистентности ПСБ2 к этому антибиотику. Известны дикий штамм FA19, не проявляющий устойчивость к пенициллину, и штаммы 35/02 и H041, обладающие рядом мутаций, которые позволяют им проявлять устойчивость к действию антибиотиков. Экспериментальные данные по константам эффективности (k_2/K_s) демонстрируют, что эффективность ингибирования падает в 150 раз и 2300 раз для 35/02 и H041, соответственно. Для FA19 из литературы известны индивидуальные параметры (k_2 и K_s), но для мутантных форм определить их экспериментально не представляется возможным. Деацилирование происходит медленно, поэтому считается, что реакция происходит необратимо. Таким образом, рост резистентности с точки зрения молекулярного механизма связан либо со снижением сродства ПСБ2 к цефтриаксону, либо со снижением скорости ацилирования.

Молекулярное моделирование механизма реакции ингибирования ПСБ2 из данных штаммов цефтриаксоном показало, что изменение положение субстрата в активном центре фермента ввиду мутации G545S отражается в формировании оксианионного центра и, как следствие, высоте энергетического барьера первой стадии реакции. Анализ молекулярно-динамических траекторий фермент-субстратных комплексов, в частности электронно-плотностными дескрипторами, позволил идентифицировать набор структур как реакционные и нереакционные. Показано, что доля реакционных структур падает с ростом резистентности. Просканирована поверхность свободной энергии Гиббса, определены элементарные стадии реакции. Установлено, что механизм реакции в мутантных ПСБ2 и из штамма дикого типа отличаются: разрыв связи C–N и отрыв фрагмента антибиотика происходит последовательно в белке из штамма дикого типа и одновременно в мутантных белках. Новое положение субстрата в каталитическом кармане также влечет за собой изменения сродства к антибиотику. Анализируя конформационные изменения петли $\beta 3$ - $\beta 4$, показано, что с ростом резистентности сродство ПСБ2 к цефтриаксону понижается.

Преобладающим механизмом инактивации β -лактамных антибиотиков является экспрессия бактериальных ферментов β -лактамаз. Известно, что реакция инициируется нуклеофильной атакой каталитического гидроксид-аниона, что в дальнейшем приводит к разрыву β -лактамного кольца и образованию отрицательно заряженного интермедиата реакции. В этом интермедиате заряд делокализован между тремя атомами пирролинового кольца имипенема – NC2C3-. Затем происходит протонирование интермедиата, однако на какой атом, N или C3, неизвестно. Экспериментальные данные демонстрируют, что конечным продуктом реакции для обоих ферментов является протонированный по углероду R-изомер имипенема ((R)-имин). Однако неясно: образуется ли (R)-имин в активном центре ферментов или же в результате таутомеризации из N-продукта импенема (сенамина) в растворе.

В ходе работы изучены особенности строения фермент-субстратных комплексов L1 и NDM-1. Значимой структурной особенностью является разный аминокислотный состав петли 10, накрывающей активный центр в обоих ферментах. В L1 над активным центром находится гидрофобный жесткий аминокислотный остаток Pro226, что делает положение субстрата в активном центре структурно более жестким, малоподвижным. В NDM-1 над субстратом находится гибкий Gly219, вследствие чего активный центр NDM 1 более подвижен. Эти особенности строения обуславливают разницу в активации имипенема и ходе реакции.

Анализ молекулярно-динамических траекторий фермент-субстратных комплексов показал, что формирование более жесткого активного центра в L1 приводит к более эффективной активации субстрата

ферментом, и как следствие, более низкому энергетическому барьеру и большей стабилизации интермедиата первой стадии реакции.

Сканированием поверхности потенциальной энергии установлен механизм реакции гидролиза иминопептида данными ферментами. Енамин образуется как основной продукт в активном центре NDM-1 и как единственный продукт в активном центре L1. В NDM-1 за счет большей подвижности петли 10 в активный центр попадает вода, что определяет существование альтернативного пути реакции, который приводит к образованию (S)-имина. Этот процесс происходит с более высокими энергетическими барьерами.

Исследовано поведение продуктов ферментативной реакции в растворе. Применено моделирование классической молекулярной динамики енамина и отрицательно заряженного интермедиата реакции. Анализ полученных конформаций по ключевым геометрическим критериям показал, что более вероятно таутомеризация емина в (R)-имин. Полученные результаты согласуются с известными экспериментальными данными.

Молекулярные механизмы инициации ферроптотических процессов при действии комплексов цитохрома с с фосфатидной кислотой

Сучков М.Ю.^{1*}, Степанов Г.О.¹, Осипов А.Н.¹
¹*РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России;*
²*РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России;*
max.suchkov3001@yandex.ru

Биофизические механизмы апоптоза, которые характеризуются увлечением пероксидазной активности цитохрома С после его взаимодействия с митохондриальными фосфолипидами сегодня достаточно хорошо изучены. Сегодня внимание ученых во всем мире привлечено к исследованию молекулярных и клеточных механизмов ферроптоза связанных с действием свободного железа. Так очень затруднительным является вопрос об источнике свободного железа, который является катализатором перекисного окисления биологических мембран, которое происходит при ферроптозе [2].

Целью данной работы было исследование между способностью цитохрома с терять ион железа при возрастающих концентрациях пероксида водорода, а также изменением его пероксидазной активности на протяжении данного процесса. Полученные зависимости сравнивались как для образцов содержащих только цитохром с, так и для цитохрома с образующего комплексы с различными анионными фосфолипидами (фосфатидилхолином, кардиолипином и фосфатидной кислотой).

Оценка содержания ионов железа в цитохроме С выполнялась при помощи спектрофотометрии (по интенсивности полосы Core), эти спектры сравнивались кинетической кривой люминол-зависимой хемилюминесценции, отражающей пероксидазную активность цитохрома С

Хорошо известно, что при взаимодействии высокой концентрации перекиси водорода с цитохромом С происходит падение полосы Core при 410 нм, что и объясняет выход гемового железа, который может влиять на развитие ферроптотических процессов. Было показано, падение полосы Core цитохрома с в присутствии фосфатидной кислоты начинается много быстрее (при концентрациях пероксида водорода 300 мкМ и цитохрома с 5 мкМ), чем в контрольных образцах, где изменение поглощения начиналось с 500 мкМ концентраций пероксида. При этом также было видно, что образцы содержащие фосфатидную кислоту сначала (до начала падения полосы Core) уже проявляют пероксидазную активность, которая была примерно в 10 раз выше, чем у комплексов цитохрома с с фосфатидилхолином.

В результате проведенных экспериментов было показано, что снижение интенсивности полосы Core сопровождается увеличением интенсивности хемилюминесценции, что в свою очередь говорит о повышении пероксидазной активности цитохрома С, сопровождающим в т.ч. выход железа из гема.

Таким образом, показано, что цитохром С при взаимодействии с перекисью водорода способствует повышению концентрации железа, что в свою очередь может индуцирует процесс ферроптоза.

Библиографические ссылки

1. Kagan V. E. et al. Redox phospholipidomics of enzymatically generated oxygenated phospholipids as specific signals of programmed cell death //Free Radical Biology and Medicine. – 2020. – Т. 147. – С. 231-241
2. Ursini F., Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4 //Free Radical Biology and Medicine. – 2020. – Т. 152. – С. 175-185

Молекулярный комплекс рутина с хедерасапонином С

Яковешин Л.А.^{1*}, Ратников В.Д.¹

¹Севастопольский государственный университет ;
chemsevntu@rambler.ru

Тритерпеновые гликозиды способны к образованию разнообразных молекулярных комплексов с биологически активными веществами [1]. Наиболее изучены комплексы гликозидов солодки и плюща. Недавно получен комплекс тритерпенового сапонины глицирама с рутином (**Rut**) [2]. **Rut** – это один из самых известных растительных гликозидов фенольной природы [3]. Глицирам является моноаммонийной солью глицирризинной кислоты (главного сапонины солодки). Комплексы гликозидов плюща с **Rut** не описаны. Поэтому был получен новый молекулярный комплекс **Rut** с главным тритерпеновым гликозидом плюща хедерасапонином С (**HedC**).

Комплексообразование изучено методами электронной и ИК-Фурье-спектроскопии. Сравнение ИК-спектров показало, что наблюдается смещение полос поглощения валентных колебаний связей О–Н: 3415→3343 и 3343→3259 см⁻¹ (для **Rut**) и 3329→3259 см⁻¹ (для **HedC**). Кроме того, отмечены смещения полос поглощения валентных колебаний связей С–О в составе групп С–О–С и С–ОН: 1405→1359, 1059→1053, 1013→1027 и 999→1027 см⁻¹ (для **Rut**) и 1027→1024 см⁻¹ (для **HedC**). В ИК-спектрах установлены смещения полос поглощения валентных колебаний связей С=О: 1656→1651 см⁻¹ (для **Rut**) и 1722→1730 см⁻¹ (для **HedC**). Смещение полос поглощения свидетельствует о наличии водородных связей между компонентами комплекса.

Константа устойчивости комплекса $K = (1,2 \pm 0,5) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ рассчитана по методу А.К. Бабко на основе изомольной кривой.

Проведено предварительное исследование антиоксидантной активности комплекса **Rut** с **HedC**. Анализ антиоксидантной способности комплекса (в пересчете на тролокс) показал увеличение антиоксидантной емкости АСВ на 16,89% (по сравнению со стандартом **Rut**).

Литература

1. Yakovishin L.A., Grishkovets V.I. Ivy and licorice triterpene glycosides: promising molecular containers for some drugs and biomolecules // *Studies in Natural Product Chemistry*. – 2018. – Vol. 55. – P. 351–383.
2. Yakovishin L.A., Ratnikov V.D., Bazhan P.I., Zaitsev G.P. New molecular complex of ammonium glycyrrhizate with Rutin // *Chimica Techno Acta*. – 2022. – Vol. 9, № 1. – 20229101.
3. Gullón B., Lú-Chau T.A., Moreira M.T., Lema J.M., Eibes G. Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability // *Trends Food Sci. Technol.* – 2017. – Vol. 67. – P. 220–235.

Нанобиовзаимодействия сывороточного альбумина и шунгитового углерода

Рожков С.П.¹, Горюнов А.С.^{1*}, Рожкова Н.Н.²

¹ИБ КарНЦ РАН;

²ИГ КарНЦ РАН;

goryunov@krc.karelia.ru

Изучение молекулярных механизмов взаимодействия и биологической активности наноструктур и наноматериалов в отношении объектов живой природы необходимо для оценки биомедицинских нанорисков, нанорисков для окружающей природной среды, а также решения задач бионаноконструирования. При этом белки являются важнейшим объектом и компонентом в подобных исследованиях. Для этих целей из всего многообразия белков именно сывороточные альбумины (СА) используются наиболее часто. К примеру, их применяют в качестве сенсоров конформационных и фазовых изменений при взаимодействии биомолекул с наночастицами (НЧ) различной природы при образовании белковой короны, для покрытия поверхностей, как биосурфактанты, для функционализации бионаноконъюгатов, индукции и ингибирования процессов фибриллообразования. Такой спектр возможного применения альбумина обусловлен как доступностью и дешевизной СА, так и относительной полнотой знаний их конформационного состояния, межмолекулярного взаимодействия и фазового поведения в дисперсиях с различным микроокружением. Это позволяет ему быть идеальным объектом в вопросах изучения влияния белков на коллоидную стабильность наночастиц в дисперсии, их фазовые, окислительно-восстановительные и транспортные свойства.

Именно совокупность вышеперечисленных свойств позволило нам успешно исследовать молекулярные механизмы биологической активности наноматериалов природного происхождения - абиогенных наночастиц шунгитового углерода [1-3]. Наночастицы шунгитового углерода (ШУ), полученные методом зеленой химии из

шунгитовой горной породы и стабилизированные в водной дисперсии, получили экспериментальное и теоретическое свидетельство о своей графеновой природе.

Изучение биологической активности нанотрубок шунгита на молекулярном уровне показало, что ШУ воздействует на связывание лигандов (жирных кислот) с СА, его конформацию и агрегацию через перенос части лиганда с белка на наночастицы. При взаимодействии с ШУ соотношение фракций СА в дисперсии меняется в пользу той, что содержит меньше лиганда. При этом устойчивость агрегатов СА, содержащих физиологическое количество лиганда, повышена по сравнению с белком без лиганда. Также наблюдается увеличение однородности распределения по размеру агрегатов молекул, микроокружения и центров связывания лигандов.

Показано, что шунгитовый нанотрубка выступает как агент, способный влиять на степень окисления белков крови как непосредственно повышая степень окисления (железо гема гемоглобина), так и снижая степень свободнорадикального окисления (цис-34 сывороточного альбумина). Взаимодействие и образование комплексов наночастиц с белком (белковая корона), с существенным изменением конформационного состояния белка или без такового, приводит к уменьшению сродства к нему физиологических лигандов (жирных кислот к альбумину, кислорода к гемоглобину). При этом акцептором лигандов и электронов может являться сам шунгитовый нанотрубка в водной дисперсии, что характеризует его роль в регуляции процессов окисления и переноса лигандов в системах с участием белков и гемосовместимости в целом.

Один из механизмов биоактивности НЧ ШУ связан с воздействием НЧ на фазовые превращения в белковых системах, сопряженные с формированием белковых комплексов и ассоциатов как предзародышевых аморфных кластеров промежуточной (скрытой) фазы. При этом в таких казалось бы совершенно различных системах, как дисперсии наночастиц углерода и СА наблюдается в целом однотипное поведение сетки водородных связей с изменением концентрации компонентов. Возникающие при этом первичные ассоциаты имеют в среднем близкий размер и не изменяются с ростом концентрации компонента. Это может говорить о том, что сначала молекулами белка или базовыми элементами ШУ заполняются первичные дефекты сетки водородных связей, но затем формируются более крупные дефекты, способные принять более крупные ассоциаты. В дисперсии белка коллоидная устойчивость к разделению фаз поддерживается за счет образования белковых ассоциатов-кластеров двух основных типов и размеров как кластеров скрытой фазы. В присутствии НЧ коллоидная устойчивость дисперсии обеспечивается почти исключительно за счет ассоциации белка с НЧ с образованием белковой короны. Такой подход может быть использован для описания коллоидных свойств и устойчивого поведения дисперсий частиц как биогенной, так и абиогенной природы.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0006).

1. Goryunov A.S., Rozhkov S.P., and Rozhkova N.N., Eur. Biophys. J., 49, 85 (2020)
2. Goryunov A.S., Borisova A.G., Rozhkov S.S. and Rozhkova N.N. Current Nanoscience, 19, 68 (2023)
3. Рожков С.П., Горюнов А.С., Колодей В.А., Пронькина Л.А., Рожкова Н.Н. Биофизика, 67, 1093 (2022)

Некоторые любопытные особенности кинетики замерзания воды и новый взгляд на механизм биологической активности белка-антифриза

Финкельштейн А.В.^{1,2,3*}, Мельник Б.М.^{1,2}, Гарбузинский С.Г.¹

¹*Институт белка Российской академии наук;*

²*Биотехнологический факультет МГУ им. Ломоносова;*

³*Биологический факультет МГУ им. Ломоносова;*

afinkel@vega.protres.ru

Рассмотрение кинетики замерзания показывает, что (i) при малых отрицательных температурах зарождение льда в объеме воды требует огромного времени и, значит, не может происходить ни в озере, ни в организме; (ii) зарождение льда при таких температурах требует наличия каких-то лёд-связывающих поверхностей, но (iii) даже тогда образование льда может иметь место, как правило, только при температурах на несколько градусов ниже 0°C. Однако некоторые формы поверхности могут инициировать зарождение льда при практически нулевой температуре. Белки-антифризы отвечают за адаптацию организмов к низким температурам, но механизм их действия был все еще неясен. Исследуя влияние лед-связывающего белка sfAFP на температуру замерзания воды и плавления льда, мы показали, что задача белка-антифриза состоит не в том, чтобы, как обычно считалось, связаться с уже образовавшимися кристаллами льда и остановить их рост, - а в том, чтобы связываться с теми «лёд-нуклеирующими» поверхностями клеток, где могут образовываться зародыши льда, экранировать их, и тем самым полностью предотвращать образование льда.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (грант № 21-14-00268).

Литература

1. Мельник Б.С., Финкельштейн А.В. - Физический базис функционирования белка-антифриза. - Мол. Биол. 2022, 56, №2, 343-352.
2. Finkelstein A.V., Garbuzynskiy S.O., Melnik B.S. - How Can Ice Emerge at 0 oC? - Biomolecules, 2022, 12, 981. <https://doi.org/10.3390/biom12070981>.

Новые биокатализаторы на основе цистеиновых протеаз в комплексе с микро- и наночастицами хитозана

Холявка М.Г.^{1*}, Гончарова С.С.¹, Редько Ю.А.¹, Лавлинская М.С.¹, Сорокин А.В.¹, Панкова С.М.¹,
Королева В.А.¹, Пайметьева Д.С.¹, Артюхов В.Г.¹
¹Воронежский государственный университет;
kholyavka@bio.vsu.ru

Микро- и наноразмерные материалы находят широкое применение в различных сферах человеческой деятельности, в том числе в биомедицине. Они широко используются для создания инновационных форм лекарственных средств, способных адресно доставлять и порционно высвобождать во времени биологически активные вещества. Из-за большой площади раздела фаз микро- и наночастицы характеризуются высокими значениями загрузки лекарственной субстанции, что позволяет рационально использовать препарат и снижать его токсическое действие. Для таких фармацевтических форм остро стоит проблема выведения препарата из организма, связанная со стерической невозможностью прохождения частиц многих полимеров через почечные каналы. Одним из возможных решений является создание микро- и наночастиц на основе биodeградируемых носителей, способных метаболизироваться в организме человека и выводиться из него без каких-либо затруднений. К наиболее перспективным полимерам этого типа относится хитозан.

Хитозан и его производные обладают уникальными свойствами в качестве носителей для различных ферментов, применяемых в фармацевтической промышленности. Низкая стоимость, доступность, антимикробная активность, биоразлагаемость и адгезивные свойства делают хитозан перспективным носителем для доставки лекарств. Хитозан является биосовместимым и практически не вызывает побочных реакций при контакте с клетками человека.

В качестве объектов исследования были выбраны фицин, папаин и бромелин (Sigma, США), микро- и наночастицы получали из среднемолекулярного (200 кДа) и высокомолекулярного (350 кДа) хитозанов (ЗАО «Биопрогресс», Россия).

Методики получения микро- и наночастиц хитозана, а также их комплексов с протеазами подробно описаны в работах [1-3]. Размеры микро- и наночастиц измеряли на приборе Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments, США). Обратный рассеянный свет от He/Ne-лазера мощностью 4 мВт (632.8 нм) собирали под углом 173°.

Стабильность комплексов ферментов с микро- и наночастицами оценивали после инкубации в 0.05 М трис-HCl буфере с pH 7.5 при 37 °C в течение 7 суток путем измерения протеолитической активности образцов через 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 и 168 ч по количеству окрашенного продукта реакции в результате расщепления субстрата азоказеина [4].

Установлено, что ассоциаты фицина, папаина и бромелина с частицами средне- и высокомолекулярного хитозанов, полученными в присутствии аскорбиновой кислоты, существенно отличаются по размерам от ассоциатов с частицами, сформированными без аскорбиновой кислоты. При взаимодействии частиц хитозана с ферментом размеры ассоциатов существенно превышают размеры свободных частиц.

Активность комплексов фицина с наночастицами средне- и высокомолекулярного хитозанов оказалась выше по сравнению с комплексами микрочастиц средне- и высокомолекулярного хитозанов на 8 и 5 % при формировании частиц в отсутствие аскорбиновой кислоты и соответственно на 9 и 13 % при получении частиц в присутствии аскорбиновой кислоты.

При создании комплексов папаина с микрочастицами средне- и высокомолекулярного хитозанов без добавления аскорбиновой кислоты ферментативная активность уменьшилась не более чем на 8 % по сравнению со свободным папаином, при комплексообразовании в присутствии аскорбиновой кислоты активность папаина увеличилась на 18 и 10 % соответственно. При образовании ассоциатов папаина с наночастицами, сформированными в присутствии аскорбиновой кислоты, его каталитическая способность увеличилась на 3 % для среднемолекулярного хитозана и на 16 % для высокомолекулярного хитозана.

Активность комплексов бромелина с наночастицами средне- и высокомолекулярного хитозанов оказалась выше по сравнению с комплексами микрочастиц средне- и высокомолекулярного хитозанов на 5 и 7 % при получении частиц в отсутствие аскорбиновой кислоты и соответственно на 9 и 8 % при получении частиц в присутствии аскорбиновой кислоты.

Образование комплексов цистеиновых протеаз с микро- и наночастицами средне- и высокомолекулярного хитозанов, полученными как без, так и с добавлением аскорбиновой кислоты, приводило к стабилизации протеолитической активности образцов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №21-74-20053)

1. Королева В.А., Холявка М.Г., Ольшанникова С.С., Артюхов В.Г. / Получение комплексов фибрина с наночастицами хитозана и оценка их стабильности по уровню удельной ферментативной активности // Биофармацевтический журнал. – 2018. – Т. 10. – № 4. – С. 58-62.

2. Ольшанникова С.С., Редько Ю.А., Лавлинская М.С., Сорокин А.В., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. / Получение комплексов папаина с микрочастицами хитозана и оценка их стабильности по уровню ферментативной активности // Химико-фармацевтический журнал. – 2021. – № 11. – С. 51-55.

3. Редько Ю.А., Ольшанникова С.С., Холявка М.Г., Лавлинская М.С., Сорокин А.В., Артюхов В.Г. / Разработка методики получения ассоциатов бромелина с микро- и наночастицами хитозана // Химико-фармацевтический журнал. – 2022. – Т. 56, № 7. – С. 45-49.

4. Baidamshina D.R., Koroleva V.A., Trizna E.Yu., Pankova S.M., Agafonova M.N., Chirkova M.N., Vasileva O.S., Akhmetov N., Shubina V.V., Porfiryev A.G., Semenova E.V., Sachenkov O.A., Bogachev M.I., Artyukhov V.G., Baltina T.V., Holyavka M.G., Kayumov A.R. / Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized Ficin // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – V. 164. – P. 4205–4217.

Новые теоретические и экспериментальные данные о механизмах катастроф и спасений тубулиновых микротрубочек

Александрова В.В.^{1,2}, Анисимов М.Н.^{1,2}, Гудимчук Н.Б.^{1,2*}

¹*МГУ имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия;*

²*Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия;*
nikita_gb@mail.ru

Микротрубочки являются важными полимерами белка тубулина, которые демонстрируют циклы удлинения и укорочения во всех эукариотических клетках. Стохастические переключения микротрубочек между фазами удлинения и укорочения называются катастрофами и спасениями. Эти переключения тонко регулируются в клетках на протяжении всего их жизненного цикла. Например, во время клеточного деления частота катастроф микротрубочек существенно увеличивается, а частота спасений, наоборот, уменьшается, чтобы подстроить поведение микротрубочек под конкретные задачи, стоящие перед клеткой. Неравновесная динамика микротрубочек помогает реорганизовать цитоскелет, изменять и поддерживать форму клетки, генерировать механические силы для ремоделирования мембран, изменения положения органелл и разделения дуплицированных хромосом во время митоза. Накопленные за последние годы биохимические данные и данные электронной криотомографии заставили пересмотреть ранее широко принятую модель сборки микротрубочки. Вопреки классическим представлениям было обнаружено, что микротрубочки растут за счет добавления не прямых, а изогнутых тубулинов в комплексе с гуанозинтрифосфатом (ГТФ) к кончикам изогнутых тубулиновых протофиламентов как в клетках, так и в очищенных системах белков. Опираясь на эти новые структурные данные и используя подход броуновской динамики, мы недавно построили подробную теорию сборки микротрубочки [1]. В этой модели изогнутые протофиламенты тубулина выпрямляются под действием тепловых флуктуаций, что позволяет формировать латеральные связи между ними. Построенная модель обеспечила описание сборки и разборки микротрубочек при различных концентрациях тубулина и генерации механических сил в масштабе времени нескольких секунд. В настоящей работе мы расширили компьютерные симуляции до временной шкалы часов, чтобы исследовать механизмы катастроф и спасений микротрубочек. Сформулированная нами новая Монте-Карло модель явно учитывает как нуклеотидное, так и конформационное состояния тубулина. Эта модель позволяет воспроизводить катастрофы и «старение» микротрубочек - постепенное снижение устойчивости микротрубочек с течением времени. Интересно, что модель с полностью ограниченными параметрами предсказывает крайне низкую частоту спонтанных спасений микротрубочек. Они возникают в симуляциях только если стенка микротрубочек содержит участки встроенного ГТФ-тубулина. Чтобы проверить это теоретическое предсказание, мы провели эксперименты в очищенной системе *in vitro*, создав специальные микропедесталы на поверхности покровного стекла, которые позволили наблюдать динамику микротрубочек вдали от каких-либо поверхностей. Эта усовершенствованная постановка эксперимента позволила избежать неспецифических эффектов, возникающих при контакте микротрубочек с поверхностью покровного стекла. Мы обнаружили, что изолированные микротрубочки имеют существенно более низкую частоту встраивания ГТФ-тубулинов в местах дефектов микротрубочки и более низкую частоту спасений по сравнению с частотой спасений в общепринятой постановке эксперимента, что подтверждает

выводы разработанной нами компьютерной модели. В целом, наше исследование устанавливает единую теорию для описания процессов сборки микротрубочек и их неравновесной динамики.

Анисимов М.Н. является стипендиатом Фонда развития теоретической физики и математики «БАЗИС». Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проект № 21-74-20035).

Литературные источники:

1. Gudimchuk, N.B., Ulyanov, E.V., O'Toole, E., Page, C.L., Vinogradov, D.S., Morgan, G., Li, G., Moore, J.K., Szczesna, E., Roll-Mecak, A., Ataullakhanov, F.I., Richard McIntosh, J., 2020. Mechanisms of microtubule dynamics and force generation examined with computational modeling and electron cryotomography. Nat. Commun. 11, 3765, DOI: 10.1038/s41467-020-17553-2

О предпочтительности кодонов

Комаров В.М.^{1*}, Самченко А.А.¹, Кондратьев М.С.¹

¹Институт биофизики клетки РАН;

²Институт биофизики клетки РАН;

komarov_vm@mail.ru

В современной геномике весьма важным и интригующим моментом остается вопрос о происхождении неравноправного участия кодонов (codon usage bias) в функционировании живого организма.

Традиционно, здесь используется общее положение об определяющей роли GC-состава в формировании основных структурных свойств геномной ДНК. В соответствии с этими представлениями в качестве возможной меры предпочтительности кодона очень часто привлекаются оценки величины вклада гуанина или цитозина в третье положение кодона (GC3) в составе белок кодирующих генов. Однако в реальных обстоятельствах, исходя, например, из конкретного строения генома человека, такая «GC3 предпочтительность» оказывается не столь впечатляющей и оставляет около 25%! Поэтому на данный момент многие склонны все же считать, что в существующих условиях вырожденности генетического кода, наблюдаемое неравноправие синонимических кодонов как у про-, так и у эукариот, есть следствие нетривиального баланса двух факторов – влияния естественного отбора и мутационной предрасположенности.

Ранее в своих работах мы уже указывали на важный вклад существующей «скрытой» неоднозначности исходной формы комплементарного Н-спаривания азотистых оснований в иницировании наблюдаемых особенностей структурно-функциональной организации молекул нуклеиновых кислот. Данная неоднозначность связана с би-стабильным характером пирамидального строения экзоциклических амино групп аденина, гуанина и цитозина, участвующих в водородном связывании. Пониженный, 2-х кратный полиморфизм структуры АТ-пар по сравнению с 4-х кратным полиморфизмом GC-пар обуславливает наблюдаемое доминирование А/Т-треков над G/C-треками в составе двойных спиралей ДНК любых организмов. Реализуется, таким образом, естественный отбор пар в обеспечении надежности протекания в клетке процессов сохранения и передачи генетической информации.

Есть основания ожидать, что повышенная неоднозначность формы GC-спаривания оснований по сравнению с АТ-спариванием должна каким-то образом отразиться и в обсуждаемом случае, при формировании предпочтительного состава нуклеотидных триплетов в структуре «кодон-антикодон» центра связывания нуклеиновых кислот для поддержания высокой точности и стабильности протекания генетических процессов.

Нами, с использованием данных GenBank и ресурса www.kazusa.or.jp/codon, был выполнен спектральный анализ частот встречаемости всех 64 типов кодонов в генах широкого представительства про- и эукариот, охватывающий масштабный диапазон размеров исследуемых геномов (от 1,6 Mb до 140 000 Mb) с разным GC-составом. В качестве примера реликтовых эукариот были выбраны геномы амобы (*Amoeba proteus*), тихоходки (*Tardigrada*), мечехвоста (*Limulus Polyphemus*), моллюска (*Nautilus pompilius*). Другие эукариоты, а также прокариоты, были представлены геномами человека (*Homo sapiens*), шимпанзе (*Pan troglodytes*), мыши (*Mus musculus*), мраморной двоякодышащей рыбы (*Protopterus aethiopicus*), лягушки (*Xenopus tropicalis*), мухи (*Drosophila melanogaster*), цветка (*Arabidopsis thaliana*), клеточного слизевика (*Dictyostelium discoideum*), паразита (*Leishmania major*), дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), малярийного паразита (*Plasmodium falciparum*), бактерии (*Escherichia coli*) и очень маленькой бактерии (*Candidatus Pelagibacter*). Спектральный анализ был проведен на основе разработанной собственной компьютерной программы с описанием алгоритма в [А.А.Самченко и др., Биофизика, 61 (6), 1045-1058 (2016)].

Полученные результаты в целом подтвердили сделанное нами предположение. Было выявлено, что для каждого организма оказывается свойственным существование двух групп предпочтительных кодонов. Первая группа – наиболее многочисленная. В ней сосредотачивается примерно от 64 до 95 процентов такого типа кодонов с наличием во втором положении либо А либо Т(У) основания. Обозначается, таким образом, приоритет вклада "наиболее надежных" оснований с исходно низким структурным полиморфизмом комплементарного Н-

спаривания. Этим достигается сохранение достаточно стабильной и четкой пространственной фиксации центрального звена системы узнавания «замок-ключ» (кодон-антикодон) в функциональных комплексах ДНК-мРНК, мРНК-тРНК, тРНК-рРНК.

Во второй, весьма малочисленной группе, собрались оставшиеся приоритетные кодоны с центральным G или C азотистым основанием.

В целом, разбиение предпочтительных кодонов по двум таким группам оказывается довольно значительным, может доходить до соотношения 95:5 (%), и зависит от состава конкретного генома.

Определение биоэквивалентности дикому типу рекомбинантного S-белка SARS-CoV-2, путем оценки гуморального иммунного ответа морских свинок и специфичности связывания человеческого ACE2

Косенко М.Н.^{1*}, Онхонова Г.С.¹, Гудымо А.С.¹, Данильченко Н.В.¹, Таранов О.С.¹, Олькин С.Е.¹,
Иматдинов А.Р.¹, Прудникова Е.Ю.¹, Даниленко Е.И.¹, Зайковская А.В.¹, Евсеенко В.А.¹, Пьянков
С.А.¹, Рыжиков А.Б.¹

¹ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора;
kosenko_mn@vector.nsc.ru

Спектр задач, в которых используются рекомбинантные белки, охватывает многие области от фундаментальных биологических исследований до таких прикладных направлений, как пищевая промышленность. Технологии, основывающиеся на рекомбинантных белках, показали свою эффективность при создании новых вакцин против инфекций, циркулирующих в человеческой популяции. При этом определение биоэквивалентности получаемых рекомбинантных белков «натуральным» является важной частью как структурных, так и функциональных исследований

В результате исследования была разработана методика экспрессии рекомбинантного S-белка SARS-CoV-2 в клетках HEK293 с последующей очисткой с помощью аффинной и ионообменной жидкостной хроматографии. Ведение поэтапного контроля с привлечением современных средств обработки полученных данных позволило добиться высокой чистоты получаемого продукта.

Кинетическим методом биослойной интерферометрии показана функциональная активность целевого белка. Также для оценки биологической активности была проведена двукратная внутримышечная иммунизация морских свинок комплексом полученного рекомбинантного белка с ИСКОМ адьювантом «Матрикс-В». Методом ИФА и в реакции нейтрализации показан специфический вируснейтрализующий гуморальный ответ – кросс-реактивность в ИФА с антигеном Дельта -1:3200; в реакции нейтрализации средние значения геометрических титров антител сывороток в отношении SARS-CoV-2 варианта Дельта 1:63.

Паккерные состояния иононовых колец каротиноидов

Сурков М.М.^{1*}, Мамчур А.А.¹, Ярошевич И.А.¹

¹Кафедра биофизики, Биологический факультет, Московский государственный университет им.
М.В.Ломоносова;
macsurmak.m02@mail.ru

Свойства белок-пигментного комплекса определяются входящим в его состав пигментом и способом его координации в активном центре. В случае каротенопротеинов, конфигурация сайта связывания пигмента зависит от конформационной динамики каротиноида в их составе. Один из вариантов изменения конформации каротиноида – переход его иононового кольца между различными вариантами неплоской структуры – паккерными состояниями (от англ. to pucker – «морщиться»). В нашем исследовании в рамках методов молекулярного моделирования была исследована конформационная динамика пяти различных каротиноидов.

Объектами исследования были выбраны иононовые кольца астаксатина (AST), бета-каротина (BCT), кантаксатина (CAN), лютеина (LUT) и зеаксатина (ZEA). Энергии паккерных состояний были рассчитаны в рамках метода молекулярной динамики с использованием пакета GROMACS. Длительность симуляции составила 1 мкс для каждого каротиноида. В результате для исследованного ряда каротиноидов охарактеризованы энергетические профили паккерных состояний (паккерные карты). Было показано, что барьер

перехода между энергетическими минимумами для иононовых колец, содержащих два sp²-гибридных атома углерода (BCT, LUT, ZEA) вдвое ниже, чем для иононовых колец AST и CAN, содержащих по три sp²-гибридных атома углерода. Для AST показано снятие энергетического вырождения для двух паккерных состояний, обусловленное образованием внутримолекулярной водородной связи.

Для каждого паккерного состояния, в рамках методов вычислительной квантовой химии с использованием пакета ORCA, были построены профили потенциальной энергии вращения вокруг C6 – C7 и C6' – C7' связей. Показана значительная модификация соответствующих профилей в зависимости от паккерного состояния боковой циклической группы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00012 (<https://rscf.ru/project/22-74-00012/>).

Литература

1. Cremer, D. and Pople, J.A. (1975) General Definition of Ring Puckering Coordinates. Journal of the American Chemical Society, 97, 1354-1358.

2. Пакет программ GROMACS URL: <https://www.gromacs.org/>

3. Пакет программ ORCA 4.1 URL: <https://orcaforum.kofo.mpg.de/>

Пейсмекерные токи участвуют в регуляции сократимости предсердного миокарда 3-х недельных крысят

Купцова А.М.^{1*}, Хисамиева Л.И.¹, Фасхутдинов Л.И.¹, Шакиров Р.Р.¹, Зиятдинова Н.И.¹, Зефилов Т.Л.¹

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет;*

anuta0285@mail.ru

Активированные гиперполяризацией циклические нуклеотидно-управляемые каналы (HCN4) являются ключевыми мембранными белками, участвующими в инициации и регуляции сердцебиения. Клетки-кардиостимуляторы в синоатриальном узле генерируют электрический импульс, который лежит в основе сокращения кардиомиоцитов предсердий и желудочков. HCN4 каналы способствуют контролю мембранного потенциала покоя и ритмической активности возбудимых клеток, экспрессирующие эти каналы. Помимо обильной экспрессии в пейсмекере и проводящей системе, мембрана клеток рабочего миокарда взрослых крыс характеризуется низкими уровнями HCN. Однако на ранних эмбриональных стадиях HCN4 обильно транскрибируется во всем сердце и вносят важный вклад в автоматизм желудочковых миоцитов, запускаемый If. К рождению транскрипция HCN4 подавляется в кардиомиоцитах рабочего типа и остается на низком уровне во взрослом организме, что предотвращает патологическое ремоделирование сердца.

Цель данной работы – изучить влияние блокады пейсмекерных токов, в регуляции сократимости миокарда предсердий 3-х недельных крыс.

В качестве объекта исследования были выбраны белые беспородные крысята 3-х недельного возраста, находящиеся на начальном этапе формирования симпатической иннервации сердца.

Сократительную активность миокарда изучали в эксперименте *in vivo* на полосках миокарда правого предсердия на установке Power Lab (AD Instruments, Австралия). Регистрация спонтанно генерированных потенциалов действия производилась на микроэлектродной установке. В качестве фармакологических препаратов использовали блокатор токов, активируемых гиперполяризацией, ZD7288 в концентрации 10-6 М.

Исходная сила сокращения изолированного миокарда правого предсердия имела значение 0,26±0,13 г. После добавления в рабочий раствор блокатора ZD7288 (10-6 М) наблюдалось постепенное снижение силы сокращения в течение 21-й минуты эксперимента. В ходе 1-й минуты блокады If сила сокращения изолированных полосок миокарда предсердий уменьшилась до 0,25±0,13 г (p<0,01). К 14-й минуте эксперимента сила сокращения уменьшилась до 0,23±0,13 г (p<0,05). На заключительной минуте эксперимента сила сокращения уменьшилась до 0,22±0,12 г (p<0,01). Уменьшение силы сокращения изолированных полосок миокарда предсердий составила 15% от исходного значения.

При введении в перфузируемый раствор ZD7288 в концентрации 10-6 М длительность потенциала действия на уровне 50% повышалась с 11,86±1,21 мс до 19,14±1,77 мс (p≤0,01). На 7-й минуте исследования зарегистрировано наибольшее увеличение длительности потенциала действия на уровне 90% с 22,43±3,6 мс до 30,71±2,69 мс (p≤0,01), параметра общей длины цикла потенциала действия с 160,28±7,85 до 171±9,14 мс (p≤0,01). Исходное значение параметра частоты генерации потенциала действия составляло 375,04±16,84 ед/мин. На 7-ой и 15-ой минутах эксперимента значения данного показателя уменьшались до 351,71±18,12 ед/мин (p≤0,01) и 354,58±17,23 ед/мин (p≤0,01), соответственно.

Таким образом, результаты исследований показали, что блокада If оказывает существенное влияние на рабочий миокард предсердий крыс 3-х недельного возраста.

Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Перекисное окисление липидов, индуцированное цитохромом с в присутствии фосфатидной кислоты. Перспективная роль в развитии апо- и ферроптотических процессов

Волков В.В.^{1*}, Степанов Г.О.¹, Осипов А.Н.¹
¹*РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России;*
volkov.vv.work@mail.ru

Известно множество заболеваний, патогенетическим звеном которых является нарушение механизмов регулируемой клеточной гибели. В настоящее время открыты и активно исследуются ряд таких механизмов, как апоптоз, ферроптоз, пироптоз и другие. В последние годы показана четкая связь различных механизмов гибели клеток с окислением конкретных фосфолипидов: фосфатидилсерина при фагоцитозе, кардиолипина при апоптозе, фосфатидилэтаноламина с арахидоновой кислотой при ферроптозе. Такая особенность фосфолипидов играть самое ключевое участие в клеточных процессах позволила выделить новое направление в науке – регуляторную липидомику[1]. Как было отмечено, в механизмах развития апоптоза хорошо изучена роль кардиолипина, приводящего сначала к структурным изменениям в цитохроме С (далее CytC), а затем и к изменению его пероксидазной активности, что приводит к перекисному окислению липидов биологических мембран (ПОЛ).

Пероксидазная активность CytC резко (в десятки раз) возрастает в присутствии ненасыщенного кардиолипина митохондрий, что приводит сначала к окислению мембран, а затем и к образованию пор. Однако процессы перекисного окисления митохондриальных мембран, индуцируются не только в присутствии кардиолипина, но даже более выражено в присутствии фосфатидной кислоты и ее роль ранее не изучена.

В данной работе, при помощи хемилюминесценции показано, что интенсивность CytC-индуцированного ПОЛ при увеличении в составе мембран от 10 до 50% содержания тетраолеилкардиолипина (TOCL) или диолеил фосфатидной кислоты (DOPA) увеличивается до 24 раз относительно контрольных образцов содержащих только диолеил фосфатидилхолин (DOPC).

Нужно заметить, что при титровании данной модели возрастающими концентрациями CytC зависимость интенсивности хемилюминесценции, которая характеризует ПОЛ, нелинейная. Максимальной она становится при соотношении анионных фосфолипидов к CytC равном 200-250 к 1 для фосфатидной кислоты и 100-150 к 1 для кардиолипина.

Одновременно, при помощи метода ЭПР в присутствии спиновой ловушки POBN также детектировались изменение концентрации гидроперекиси фосфолипидов (LOOH). Увеличение количества гидроперекисей наблюдалось только в системе с липосомами, содержащими TOCL или DOPA, в то время как липосомы, содержащие только DOPC, не показывали изменение концентрации LOOH.

Таким образом, показано, что:

1. Способность CytC инициировать ПОЛ в присутствии TOCL- или DOPA-содержащих липосом возрастает до 24 раз (относительно DOPC).

2. При увеличении количества CytC его способность вызывать ПОЛ изменяется нелинейно (сначала увеличивается, а потом резко снижается), что может быть связано с особенностями структурных изменений CytC, которые, как известно, зависят от соотношения фосфолипид/CytC.

3. При помощи ЭПР подтверждено образование продуктов пероксидации – гидроперекисей фосфолипидов в системах с липосомами из TOCL или DOPA, липосомы, содержащие только фосфатидилхолин показали отсутствие наработки LOOH при CytC -зависимом ПОЛ.

4. Данная способность CytC усиливать ПОЛ может играть ключевую роль в развитии как апоптотических, так и ферроптотических процессов. Причем если в присутствии TOCL скорее всего речь идет об активном развитии процесса ПОЛ, то DOPA скорее влияет на процессы инициации процессов перекисного окисления.

Исследование процесса инициации апо- и ферроптотических процессов, помогут в поиске механизмов регуляции, а значит и лечении различных патологий таких как онкология, сердечно-сосудистые и многие другие заболевания.

1. Kagan, V.E., et al., Redox phospholipidomics of enzymatically generated oxygenated phospholipids as specific signals of programmed cell death. *Free Radic Biol Med*, 2020. 147: p. 231-241.

Перестройка конформационной структуры биомакромолекул на поверхности сплюснутого металлического наносфероиды в переменном электрическом поле

Кручинин Н.Ю.^{1*}, Кучеренко М.Г.¹

¹*Оренбургский государственный университет;
kruchinin_56@mail.ru*

В настоящее время большой интерес вызывает использование золотых наночастиц сферической формы с адсорбированными на их поверхности биомолекулами для создания нанозондов с настраиваемыми плазмонными характеристиками в биофизических и биомедицинских исследованиях, а также в сенсорах на основе эффекта гигантского комбинационного рассеяния. При этом конформационная структура адсорбированных макромолекул может перестраиваться под воздействием либо статического электрического поля [1-2], либо электромагнитного излучения [3-4]. Если поместить сплюснутый металлический сфероид во внешнее однородное электрическое поле, которое направлено вдоль его оси вращения, то на его поверхности будут индуцироваться заряды, распределение которых будет значительно отличаться от случая поляризованной сферической металлической наночастицы: на поверхности сплюснутого сфероиды при смещении от его центра вдоль оси вращения поверхностная плотность заряда меняется резко, достигая значений близких к максимальным на небольшом расстоянии от нейтрального экватора.

С использованием метода молекулярной динамики были исследованы конформационные изменения полиамфолитных полипептидов с различным расстоянием между противоположно заряженными звеньями в макроцепи, адсорбированных на поверхности сплюснутого золотого наносфероиды с периодическим изменением во времени его поляризации вдоль оси вращения. При низкой температуре и самом низком рассмотренном пиковом значении дипольного момента сплюснутого наносфероиды в отсутствие и присутствии ионов натрия и хлора конформационная структура полипептида изменялась от стартовой обволакивающей наночастицу к конформации в виде узкого кольца вокруг наносфероиды около экватора. При более высоких значениях пикового значения дипольного момента наносфероиды происходило сужение и набухание макромолекулярного кольца вокруг наночастицы, а при дальнейшем увеличении амплитуды поляризующего переменного электрического поля происходила десорбция полипептида. Результирующие конформационные структуры полиамфолитных полипептидов, полученные при моделировании с ионами, оказались схожими с конформациями тех же полипептидов, полученными по результатам моделирования без ионов. При этом на кривых распределений линейной и радиальной плотностей атомов полипептидов наблюдались изменения, связанные с частичной нейтрализацией ионами заряженных приполярных областей наносфероиды.

При моделировании с высокой температурой наблюдались периодические изменения конформационной структуры адсорбированных полиамфолитных полипептидов на поверхности сплюснутого золотого наносфероиды с частотой внешнего поляризующего переменного поля. В моменты времени, когда дипольный момент наносфероиды был равен нулю, конформационная структура полипептида была близкой к стартовой конформации, полностью обволакивающей наносфероид. А в моменты времени, когда значения дипольного момента наносфероиды были максимальными по модулю, большая часть заряженных звеньев полипептида адсорбировалась на противоположно заряженных приполярных областях поляризованного наносфероиды. При этом большинство из адсорбированных заряженных аминокислотных остатков находилось на краю обширной приполярной области вблизи экватора. Также наблюдалось выбрасывание петель макроцепи вдоль направления вектора дипольного момента сплюснутого наносфероиды.

В рамках приближения квазистационарного поля произведено построение аналитической модели формирования конформационной структуры звеньев цепи полиамфолита, взаимодействующих с поверхностью сплюснутого наносфероиды, поляризующегося во внешнем переменном электрическом поле. При достаточно высоких частотах изменения внешнего поля (но не нарушающих условия его квазистационарности) необходимо учитывать временную дисперсию диэлектрической проницаемости металла наночастицы. В области низких частот, существенно меньших плазменной частоты металла для потенциала поля поляризованного наносфероиды становится справедливой формула, полученная в условиях постоянного внешнего поля. В итоговом выражении модели для распределенной плотности звеньев цепи полиамфолита в виде отдельных факторов выделены величины, ответственные за энтропийные эффекты формирования конформаций и эффекты дистанционного взаимодействия диполей полиамфолитных звеньев с протяженным внешним полем и полем поляризации сфероиды. Расчет энтропийного фактора произведен приближенным способом посредством аппроксимации поверхности сфероиды фрагментами сферы. При этом обеспечивался правильный учет кривизны адсорбирующей поверхности на большей части сжатого сфероиды.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научного проекта № FSGU-2020-0003.

1. Kruchinin N.Yu., Kucherenko M.G. // Colloid Journal. 2021. V. 83. No. 5. P. 591-604.

2. Kruchinin N.Yu., Kucherenko M.G. // Russian Journal of Physical Chemistry A. 2022. V. 96. No. 3. P. 624-632.
3. Kruchinin N.Yu., Kucherenko M.G. // High Energy Chemistry. 2021. V. 55. No. 6. P. 442-453.
4. Kruchinin N.Yu., Kucherenko M.G. // Polymer Science Series A. 2022, V. 64. No. 3. P. 240-254.

Применение метода броуновской динамики для описания чувствительности динамики тубулиновых микротрубочек к температуре

Ельцов И.А.^{1,2*}, Ульянов Е.В.¹, Виноградов Д.С.³, Гудимчук Н.Б.^{1,3}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²Московский физико-технический институт, Москва, Россия;

³Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия;
elstov.ia@phystech.edu

Микротрубочки - это динамические полимеры тубулина, которые выполняют множество важных функций на протяжении всего жизненного цикла эукариотической клетки. Микротрубочки проявляют способность резко удлиняться и укорачиваться на несколько микрометров. Этот процесс очень чувствителен к температуре: микротрубочки полимеризуются при температурах выше комнатной и деполимеризуются при температуре ниже 20 градусов по Цельсию (при физиологической концентрации тубулина). Воздействие температуры на стабильность микротрубочек изучено недостаточно, однако ее влияние используется в клеточной биологии как способ быстрого определения стабильности микротрубочек посредством охлаждения клеток. Недавно наша лаборатория разработала вычислительную модель, описывающую динамику микротрубочек, используя комбинированный подход броуновской динамики и Монте-Карло (Gudimchuk et al., Nat. Commun. 2020). Эта модель позволила описать структуры концов микротрубочек и прояснить механизмы генерации микротрубочками толкающих и тянущих сил. В настоящей работе мы расширяем нашу модель, чтобы описать чувствительность сборки и разборки микротрубочек к температуре. Температура играет сложную роль в поведении молекул. Мы рассматриваем общую задачу перехода частиц через энергетический барьер, чтобы учесть влияние температуры на вероятность присоединения тубулина к концу микротрубочки. Используя полученную аналитическую зависимость при моделировании сборки микротрубочки можно избежать необходимости учитывать все молекулы тубулинов, плавающих в растворе, сконцентрировавшись на описании взаимодействия мономеров тубулина внутри микротрубочки. Эти взаимодействия в рамках нашей модели представлены тремя типами энергетических функций: латеральный потенциал, потенциал продольной связи между тубулинами и потенциал изгиба. Предложенный нами метод позволяет учитывать поведение молекул тубулина в зависимости от температуры вне микротрубочки (неявно), а также температурную зависимость динамики тубулинов внутри решетки микротрубочки (явно). С помощью созданной модели, мы проанализировали процесс перехода микротрубочки от сборки к разборке и сформулировали два основных гипотетических механизма потери стабильности микротрубочки при охлаждении. Совокупно, наш анализ дает оценку активационных барьеров между тубулинами и проливает новый свет на старую проблему термостабильности тубулинового цитоскелета.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-74-20035.

Литературные источники:

Gudimchuk, N.B., Ulyanov, E.V., O'Toole, E., Page, C.L., Vinogradov, D.S., Morgan, G., Li, G., Moore, J.K., Szczesna, E., Roll-Mecak, A., Ataullakhanov, F.I., Richard McIntosh, J., 2020. Mechanisms of microtubule dynamics and force generation examined with computational modeling and electron cryotomography. Nat. Commun. 11, 3765, DOI: 10.1038/s41467-020-17553-2

Применение понятий энтропии и информации для исследования биосистем: от молекул до организмов

Аристов В.В.¹, Бучельников А.С.², Карнаухов А.В.³, Нечипуренко Ю.Д.^{2,4*}

¹Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН, Москва, Россия;

²Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия;

³Институт биофизики клетки РАН - ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино Московской области, Россия;

⁴Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

nech99@mail.ru

Понятие энтропии, давно известное в термодинамике, до сих пор не получило широкого применения в биофизике. В настоящей работе анализируются возможности использования понятий энтропии (негэнтропии) и информации в качестве инструментов, способных описать сущностные стороны биосистем. Статистическая энтропия может быть применена для описания локальных неравновесных распределений системы как необходимого условия ее живого состояния. Применение статистических методов, связанных с именем Блюменфельда, переосмысливается в обсуждении представлений неравновесных процессов. Исследуются возможности применения различных определений энтропии для описания биосистемы. Рассматриваются модельные задачи, для решения которых применяются методы статистической физики и кинетической теории.

Кооперативные взаимодействия между молекулами, комплексами и клетками приводят к усложнению структуры и уменьшению статистической энтропии системы. Для многоклеточного организма энтропия значительно меньше, чем энтропия для той же массы колонии одноклеточных организмов. В пределе система частей организма реализуется единственным образом, чему соответствует минимум энтропии. В иных случаях энтропия больше. Кооперативность снижает энтропию системы; мы показали это численно на простом примере связывания лигандов с макромолекулой, несущей два реакционных центра. Мы рассмотрели качественную и количественную связь между энтропией системы и кооперативностью связывания лигандов с макромолекулами. Наблюдаемое наличие минимумов и максимумов в зависимости энтропии от параметров связывания можно интерпретировать как возможность адсорбционной системы нести соответственно больше или меньше информации [1, 2].

Задача о неоднородной релаксации для кинетического уравнения воспроизводит важные черты процессов метаболизма. Шредингеровские представления о питании живой системы негэнтропией приобретают определенность. Неравновесное локальное распределение имеет меньшую энтропию, чем равновесное, что позволяет интерпретировать неравновесную локальную энтропию как присущую живому состоянию и сравнить её с локальной равновесной энтропией, присущей неживому веществу.

Исследуются и нестационарные процессы для биосистем. Понятие энтропии может сыграть свою роль в построении теорий старения, имея в виду деградацию, как своеобразное проявление второго начала термодинамики для открытых неравновесных систем. Предлагается кинетическое уравнение, опирающееся на вводимое понятие структурной функции распределения и представление о двух характерных масштабах для биологической системы: времени метаболических процессов и времени жизненного цикла. Медленные изменения структурной функции распределения трактуются как старение биосистемы. Старение (деградация) живой системы — на разных уровнях — от клетки до организма в целом трактуется как потеря информации и рост энтропии. Обсуждается связь с информационной теорией старения в различных вариантах и концепцией кооперона [3-7].

Для изучения процессов, происходящих при старении, предлагается в качестве модели рассмотреть тканевые структуры кожи. Продвигаясь от глубины кожного покрова к поверхности, мы переходим границы живого и мертвого состояния клеток. Статистический комбинаторный подход позволяет провести оценку для увеличения энтропии в рамках этой модели. Также и энтропия (дивергенция) Кульбака—Лейблера дает возрастание этой величины.

Рассматривается проблема старения с точки зрения возможности поддержания биосистемы в стабильном во времени состоянии. Для этого предполагается создание условий «приоткрытия» системы на большом масштабе времени: например, в определенном темпе заменять клеточные структуры полипотентными клетками.

Литература

1. V. V. Aristov, A. S. Buchelnikov, Yu. D. Nechipurenko. The use of the statistical entropy in some new approaches for the description of biosystems. *Entropy*. 2022. 24. 172.
2. В.В. Аристов, А.В. Карнаухов, В.Ф. Левченко, Ю.Д. Нечипуренко. Энтропия и информация в описании биосистем. *Биофизика*, 2022, Т. 67 (4), С. 741–748.
3. А.В. Карнаухов, Е.В. Карнаухова. Информационная гипотеза старения: Каким образом ускользает от старения зародышевая линия? *Биофизика* 2009, Т. 54 (4), С. 726–738.

4. A. Vujin, K. Dick. The information theory of aging: Hacking immortality? *Health Science Inquiry*. 2020, V. 11. P. 148–154.
5. A.V. Karnaukhov, E.V. Karnaukhova et al. Informational theory of aging: The life extension method based on the bone marrow transplantation. *Journal of Biophysics*. 2015, P. 1–14. Article ID 686249.
6. А.В. Карнаухов, Е.В. Карнаухова и др. Информационная теория старения: Основные факторы, определяющие продолжительность жизни. *Биофизика*, 2017, Т. 62, (5). С. 1008–1015.
7. В.Ф. Левченко, В.А. Котолупов Уровни организации живых систем: коопероны. *Журн. эвол. биохим. и физиол.* 2010, Т. 46(6), 84 – 92.

Применение эндопептидаз IdeS и IdeZ в масс-спектрометрическом фингерпринтинге иммуноглобулинов, в медицине и ветеринарии

Константинова С.В.¹, Устенко Е.В.¹, Бокша И.С.^{1*}, Поляков Н.Б.¹, Лунин В.Г.¹

¹*Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного
академика Н. Ф. Гамалеи;
boksha_irina@mail.ru*

Эндопептидазы IdeS и IdeZ синтезируются патогенными стрептококками *Streptococcus pyogenes* и *S. zooepidemicus* обладают исключительной субстратной специфичностью. Эти цистеиновые протеазы расщепляют тяжелые цепи IgG в единственном месте в шарнирной области в два этапа: сначала расщепление одной из двух тяжелых цепей с образованием расщепленной в одном месте молекулы (scIgG), сохраняющей одну из тяжелых цепей интактной. Молекула scIgG менее чувствительна к расщеплению, чем целая молекула IgG, и расщепление молекулы scIgG с образованием F(ab')₂ и Fc происходит в 100 раз медленнее, чем нативной молекулы IgG. Исключительно высокая субстратная специфичность послужила основой применения IdeS и IdeZ в качестве биофармацевтического средства для временного удаления патогенных IgG при аутоиммунных состояниях человека и предотвращения реакции отторжения у сенсibilизированных больных после трансплантации почки (IdeS), а также в качестве антигена субъединичной ветеринарной вакцины от стрептококковой инфекции (IdeZ). По данным литературы, использование гидролиза IdeS упрощает процедуру расшифровки аминокислотной последовательности моноклональных антител. Гены ideS и ideZ клонированы (в случае ideS ген клонирован из коллекционного штамма, в случае ideZ ген синтетический) и экспрессированы в системе гетерологичной экспрессии в *Escherichia coli*. В аминокислотную последовательность каждой эндопептидазы введен аффинный домен 6-His-tag. Ферменты IdeS и IdeZ выделены и очищены металл-аффинной хроматографией. Идентичность первичной структуры полученных рекомбинантных IdeS и IdeZ природным ферментам подтверждена масс-спектрометрией. Полученные IdeS и IdeZ гомогенны при электрофорезе в полиакриламидном геле (ПАГ) и активны в отношении IgG человека и различных видов животных. Специфичность расщепления иммуноглобулинов IgG человека эндопептидазами IdeS и IdeZ подтверждена методом электрофореза в ПАГ и масс-спектрометрией. В нашей работе продемонстрировано преимущество применения гидролиза рекомбинантными IdeS и IdeZ в дополнение к стандартно применяемому набору протеаз при определении структуры (аминокислотной последовательности) моноклонального антитела - иммуноглобулина человека – посредством масс-спектрометрического анализа (фингерпринтинга). Также впервые разработана система твердофазного иммуноферментного анализа и продемонстрировано применение рекомбинантной IdeZ для диагностики и определения титра специфических антител в крови лошадей, контактировавших с патогенным стрептококком и переболевших мытом. Применение рекомбинантных IdeS и IdeZ перспективно с точки зрения биотехнологии, а также медицины и ветеринарии.

Природные IgG аутоантитела гидролизуют рекомбинантные внеклеточные фрагменты субъединиц NR1 и NR2 рецептора NMDA

Смирнова Л.П.^{1*}, Ермаков Е.А.², Бокша И.С.^{3,4}, Камаева Д.А.¹, Иванова С.¹
¹ТНИМЦ;

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН;

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научный центр психического
здоровья;

⁴Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного
академика Н. Ф. Гамалеи;
lpismirnova2016@gmail.com

Продукция антител к рецепторам глутамата типа NMDA, обнаружена у пациентов со многими неврологическими и психическими расстройствами. Антитела против различных глутаматных рецепторов, включая AMPA-GluR3, NMDA-NR1, NMDA-NR2A/B, mGluR1 или mGluR5, присутствуют в субпопуляциях пациентов с эпилепсией, энцефалитом, мозжечковой атаксией, системной красной волчанкой (СКВ) и нейропсихиатрической СКВ, синдромом Шегрена, шизофренией, манией или инсультом. Эти аутоиммунные антитела к рецепторам глутамата могут связывать нейроны в нескольких областях мозга, активировать рецепторы глутамата, снижать экспрессию рецепторов глутамата, нарушать индуцированную глутаматом передачу сигналов и функцию, активировать эндотелиальные клетки гематоэнцефалического барьера, убивать нейроны, повреждать мозг, вызывать поведенческие, психиатрические или когнитивные расстройства. Но патогенетические механизмы этих явлений остаются неизученными. Исследования протеолиза нейроспецифических белков сывороточными антителами (абзимами), которые могли бы установить молекулярные особенности нарушения нейронных взаимодействий, лежащих в основе вышеперечисленных заболеваний, обладают высокой степенью актуальности. В данной работе изучена каталитическая активность IgG в отношении рекомбинантных субъединиц NR1 и NR2 NMDA рецептора в эксперименте *in vitro*. Рекомбинантная модель субъединиц включала в себя пептидные фрагменты из наиболее функционально активных участков субъединиц рецептора. Для этого были сконструированы два химерных белка DBD-NMDAR1 и DBD-NMDAR2, содержащих фрагменты NR1 и NR2 субъединиц на основе плазмиды pL761. Плазмида pL761 была сконструирована на основе вектора pR1504, содержащего нуклеотидную последовательность декстрансвязывающего домена DBD1 из *Leuconostoc mesenteroides*, GS-спейсер и выбранную нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу глутаматного рецептора NMDAR1 или NMDAR2.

Сывороточные IgG здоровых лиц были очищены методом аффинной хроматографии на колонке с Protein-G Sepharose. Принадлежность изучаемой активности непосредственно IgG была подтверждена электрофоретической гомогенностью; высокоэффективной гель-фильтрацией при pH 2,6; определением активности «*in situ*».

Реакционную смесь, содержащую 0,5 мг/мл белков DBD-NMDAR1 или DBD-NMDAR2 и 0,1 мг/мл IgG здоровых лиц, инкубировали в течение 9 часов при температуре 37°C. Оценку продуктов гидролиза субъединиц NR1 и NR2 иммуноглобулинами класса G производили посредством электрофореза и хромато-масс-спектрометрического анализа на масс-спектрометре Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Германия), соединенном с нанопотоковым хроматографом Easy-nLc 1000 (Thermo Scientific, США). Обработка результатов производилась с помощью программного обеспечения Thermo Xcalibur Qual Browser и PEAKS Studio-7.5.

Инкубация рекомбинантных белков DBD-NMDAR1 и DBD-NMDAR2 с препаратами IgG здоровых доноров приводила к снижению интенсивности полосы рекомбинантного белка на электрофореграмме, причем более эффективно шел гидролиз DBD-NMDAR2 белка.

Данные масс-спектрометрического анализа после соответствующей обработки показали следующие результаты. В случае гидролиза DBD-NMDAR1 белка количество идентифицированных пептидов (после гидролиза) из домена NR1 (среднее значение: 23 пептида) было значительно выше ($p=0,005$), чем из несущего домена DBD (10 пептидов). В случае DBD-NMDAR2 количество идентифицированных пептидов из домена NR2 (60 пептидов) также было достоверно выше ($p=0,017$), чем из несущего домена DBD (45 пептидов).

Инкубация рекомбинантных белков DBD-NMDAR1 и DBD-NMDAR2 с препаратами IgG здоровых доноров приводила к снижению интенсивности полосы рекомбинантного белка на электрофореграмме, причем более эффективно шел гидролиз DBD-NMDAR2 белка.

Данные масс-спектрометрического анализа после соответствующей обработки показали следующие результаты. В случае гидролиза DBD-NMDAR1 белка количество идентифицированных пептидов (после гидролиза) из домена NR1 (среднее значение: 23 пептида) было значительно выше ($p=0,005$), чем из несущего домена DBD (10 пептидов). В случае DBD-NMDAR2 количество идентифицированных пептидов из домена NR2 (60 пептидов) также было достоверно выше ($p=0,017$), чем из несущего домена DBD (45 пептидов).

Таким образом, впервые показано, что сывороточные IgG здоровых лиц гидролизуют NR1 и NR2 субъединицы NMDA рецептора в эксперименте *in vitro*, причем гидролиз субъединиц рецептора достоверно превышает гидролиз других участков химеры. При этом более активному гидролизу антителами подвергается белок DBD-NMDAR2. Учитывая высокую патогенетическую значимость нарушения работы NMDA рецепторов при психических и неврологических расстройствах, новые знания о протеолитических абзимах могут способствовать установлению новых молекулярных механизмов развития заболеваний.

Работа выполнена по теме НИР: Биопсихосоциальные механизмы патогенеза и клинического полиморфизма, адаптационный потенциал и предикторы эффективности терапии у больных с психическими и поведенческими расстройствами в регионе Сибири, регистрационный номер 122020200054-8.

Пространственная структура молекулы сойморфина-6

Агаева Л.Н.^{1*}, Абдинова А.А.², Ахмедова С.Р.³, Ахмедов Н.Ф.¹, Ахмедов Н.А.¹

¹Бакинский Государственный Университет, Институт физических проблем ;

²Азербайджанский Государственный Педагогический Университет ;

³Азербайджанский Технический Университет;

leylanamig@mail.ru

Опиоидные пептиды бывают животного и растительного происхождения. Ряд экзогенных пептидов, получаемых с пищей, обладают опиоподобными свойствами. Такие пептиды были названы экзорфинами. Открытие опиоидной активности пептидных компонентов пищи послужило основанием предположить, что некоторые виды пищи могут воздействовать на центральную нервную систему подобно опиатным препаратам. Экзорфины выделены из различных видов растений. Сойморфины-5, -6 и -7 производные β -коглицинина сои, были обнаружены сравнительно недавно. Сойморфины в заметных количествах образуются при переваривании сои. При расщеплении β -субъединицы β -коглицинина сои панкреатической эластазой *in vitro* сойморфин-5 составляет 9,1 % всех продуктов.

Нами были исследованы структурно-функциональные организации опиоидных пептидов, а в настоящее время исследуется пространственная структура экзорфинов. Эта работа является продолжением наших предыдущих исследований.

Расчет молекулы сойморфина-6 выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей.

Пространственная структура молекулы сойморфина-6 (Tyr1-Pro2-Phe3-Val4-Val5-Asn6-NH₂) рассчитана на основе низкоэнергетических конформаций сойморфина-5 и метиламида N-ацетил-L-аспарагина. Результаты расчета молекулы сойморфина-6 показали, что происходит энергетическая дифференциация между формами основной цепи и конформациями. В энергетический интервал 0-30 кДж/моль попадают конформации восьми шейпов. В низкоэнергетических конформациях энергия невалентных взаимодействий изменяется в интервале (-127.3) – (-90.3) кДж/моль, электростатических взаимодействий (6.3 – 10.5) кДж/моль, торсионных взаимодействий (10.1 – 16.8) кДж/моль. Глобальной конформацией молекулы сойморфина-6 является B3RR1R2R2R11 шейпа effff. В этой конформации только первый остаток Tyr1 находится в В форме основной цепи, остальные остатки находятся в R форме основной цепи и образуют спиральную структуру. Боковые цепи аминокислотных остатков направлены так, что возникают эффективные взаимодействия между атомами основной цепи и атомами основной и боковых цепей. Образуются водородная связь между атомами C=O Pro2 и N – H Val5; между атомами C=O Phe3 и N – H C-концевой группы NH₂. В этой конформации вклад невалентных взаимодействий наибольший и эта конформация, благодаря невалентным взаимодействиям, является глобальной. Она невыгодна по электростатическим взаимодействиям, вклад электростатических отталкиваний наибольший. Конформация B3RB1R2R2B31 шейпа eeff с относительной энергией 0.8 кДж/моль, от глобальной конформации отличается формой основной цепи Pro2 и расположением боковых цепей Tyr1 и Phe3 в пространстве. Она выгодна по электростатическим взаимодействиям, электростатические отталкивания наименьшие. Конформация B3RR1R2B2R21 шейпа eeffe имеет относительную энергию 11.3 кДж/моль. Здесь первый остаток Tyr1 и Val5 находится в В форме основной цепи, остальные аминокислотные остатки находятся в R форме основной цепи и образуют полусвернутую структуру.

В конформации B3RR3B2B2B31 шейпа efee N-концевой дипептидный фрагмент Tyr1-Pro2 и C-концевой трипептидный фрагмент Val4-Val5-Asn6 находятся в развернутой форме основной цепи, Pro2-Phe3 образует изгиб и между этими участками создаются эффективные взаимодействия.

В конформации B2BB2B2B2B31 шейпа eeeee все аминокислотные остатки находятся в развернутой форме, боковые цепи всех аминокислотных остатков, кроме Asn6 ориентированы в одном направлении.

Конформация выгодна по электростатическим взаимодействиям, имеет относительную энергию 19.3 кДж/моль. Конформация V3RB3B2B2B31 шейпа efeee от предыдущей отличается формой основной цепи Pro2 и положением боковых цепей Tyr1 и Phe3, поэтому ее относительная энергия всего на 1.2 кДж/моль больше, чем у полностью развернутой формы.

В конформации B1BB2R2R2R33 шейпа eeeff с относительной энергией 27.3 кДж/моль первые три аминокислотных остатка Tyr1-Pro2-Phe3 находятся полностью в развернутой форме, а следующие три аминокислотных остатка полностью в свернутой форме основной цепи. Конформация B1BR2B2B2B31 шейпа eefee имеет относительную энергию 28.6 кДж/моль и от конформации развернутой формы отличается формой основной цепи Phe3. N-концевой дипептидный фрагмент и C-концевой трипептидный фрагмент находятся полностью в развернутой форме и их друг от друга отделяет третий аминокислотный остаток - фенилаланин.

Таким образом, пространственную структуру молекулы сойморфина-6 можно представить восемью структурными типами и можно предположить, что молекула свои физиологические функции осуществляет в этих структурах. На основе этих структур можно предложить ее синтетические аналоги и рассчитать пространственную структуру молекулы сойморфина-7. Теоретический конформационный анализ гексапептидной молекулы сойморфина-6 привел к такой структурной организации молекулы, которая не исключает реализацию молекулой целого ряда функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

Разделение фаз N-белка SARS-CoV-2 и вирусной РНК: предполагаемый механизм и регуляция нуклеозидными производными

Светлова Ю.И.¹, Цветков В.Б.¹, Книжник Е.К.¹, Ведехина Т.С.¹, Варижук А.М.^{1*}

¹*Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М.*

Лопухина ФМБА, Москва, Россия;

annavarizhuk@gmail.com

Нуклеокапсидный белок (N) коронавируса, ассоциированного с острым респираторным синдромом (SARS-CoV-2), способен формировать в водных средах биомакромолекулярные конденсаты с РНК по механизму разделения фаз “жидкость-жидкость” (LLPS). Предполагается, что подобное разделение фаз в цитоплазме клетки-хозяина значимо для уклонения вируса от иммунной системы за счет блокирования внутриклеточного сигнального пути, а также является необходимым этапом репликации вируса. В принятой для описания многокомпонентных конденсатов модели “скаффолд-клиент” роль скаффолда, т.е. индуктора разделения фаз, отводится белку N. В роли клиентов могут выступать компоненты репликационного/транскрипционного аппарата. Их концентрирование и перераспределение на геномной РНК SARS-CoV-2 инициирует репликацию-транскрипцию и переключение с классической транскрипции на прерывистую для наработки субгеномных РНК.

Ранее было показано, что низкомолекулярные модуляторы LLPS, способные снижать плотность конденсатов, усиливают активность ингибиторов вирусной полимеразы, облегчая им доступ к мишени. Наряду с ингибиторами LLPS N-РНК, они могут найти применение в разработке стратегий комбинированной противовирусной терапии, а дальнейшее исследование фазовых переходов N-РНК может способствовать рациональному дизайну противовирусных агентов нового поколения. Соединения, стабилизирующие конденсаты, в теории способны нарушать жизненный цикл вируса, блокируя распаковку нуклеокапсида непосредственно после заражения, и также представляются терапевтически значимыми. Несмотря на растущий интерес, поиск и характеристика подобных модуляторов LLPS N-РНК находятся на начальном этапе. Одним из ограничений является отсутствие простой и адекватной *in vitro*-модели конденсатов.

Целью данной работы было получение модели конденсатов N-РНК при физиологических условиях и оценка влияния нуклеозидных/нуклеотидных аналогов из числа известных противовирусных агентов на эти конденсаты. Ключевое отличие предложенной модели от описанных ранее состоит в выборе фрагментов РНК и соотношения N:РНК. Были использованы участки генома SARS-CoV-2, которые содержат узнаваемые N элементы первичной и вторичной структуры, тогда как в предыдущих исследованиях использовались преимущественно олигорибонуклеотиды случайного состава. Выбранное нами соотношение N:РНК в первом приближении соответствует таковому в вирионах SARS-CoV-2. Предпосылками к рассмотрению влияния нуклеозидных/нуклеотидных аналогов на LLPS N-РНК послужили результаты недавних исследований чувствительности вирусных конденсатов к АТФ, который можно назвать основным эндогенным модулятором фазовых переходов биополимеров.

Для получения конденсатов в условиях, имитирующих физиологические, были использованы флуоресцентно-меченный рекомбинантный N-белок и РНК из 5'-нетранслируемой области вирусного генома, формирующая разветвленную шпильку с мотивами узнавания N; разделение фаз регистрировали методами флуоресцентной микроскопии и турбидиметрии. Для валидации модели конденсатов сопоставляли ожидаемые и

наблюдаемые эффекты pH, температуры, ионной силы раствора, а также контрольных известных модуляторов. Для оценки влияния нуклеозидных/нуклеотидных модуляторов рассчитывали изменения коэффициента разделения N и общей площади конденсатов на единицу поверхности по данным флуоресцентной микроскопии смеси N-РНК в присутствии/в отсутствие модуляторов. Влияние нуклеозидных/нуклеотидных аналогов на конденсаты соотносили с противовирусной активностью в клеточной модели.

Ключевым результатом анализа чувствительности конденсатов к внешним факторам можно считать косвенное подтверждение гипотезы, объясняющей связь специфических электростатических взаимодействий N-РНК и неспецифических гидрофобных взаимодействий неструктурированных участков N. Согласно этой гипотезе, механизм РНК-зависимого фазового перехода включает следующие этапы: 1) узнавание мотивов, характерных для 5'-нетранслируемой области вирусного генома, РНК-связывающим доменом N повышает вероятность контактов остова соседнего участка РНК с положительно заряженным фрагментом N возле димеризационного домена; 2) связывание РНК меняет конформацию димеризационного домена, вызывая его частичную денатурацию; 3) частичная денатурация белка и экспонирование гидрофобных участков инициируют фазовый переход.

Ключевым результатом анализа эффектов нуклеозидных/нуклеотидных аналогов является установление слабой корреляции между модуляцией LLPS N-РНК и противовирусной активностью в ряду 5'-норкарбоциклических нуклеозидных производных и соединений с флексимерными аналогами нуклеиновых оснований [1]. В случае ненуклеозидных модуляторов – производных перилена подобной корреляции не наблюдалось. Лидерами из числа нуклеозидных аналогов оказались 5'-норкарбоциклические производные, увеличивающие эффективность разделения фаз N в 11-15 раз. Эти соединения представляются перспективной основой для разработки терапевтических агентов, однако для учета возможных побочных эффектов потребуется проверка их действия на конденсаты (немембранные органеллы) клетки-хозяина.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации № МД-5000.2022.3.

[1] J Svetlova et al. Nucleoside Analogs and Perylene Derivatives Modulate Phase Separation of SARS-CoV-2 N Protein and Genomic RNA In Vitro. International Journal of Molecular Sciences 2022, 23 (23): 15281.

Разработка метода оптимизации получения микрокристаллических образцов для белковой серийной кристаллографии

Самыгина В.Р.^{1,2*}, Дубова К.М.¹, Петерс Г.С.¹, Конарев П.В.^{1,2}

¹НИЦ "Курчатовский институт";

²ФНИЦ "Кристаллография и Фотоника" РАН;

lera@crys.ras.ru

Белковая кристаллография является наиболее распространенным методом определения структуры биологических макромолекул. Использование замороженных образцов зачастую смещает равновесие конформационных ансамблей в белковых кристаллах, что затрудняет изучение механизмов функционирования лабильных структурных элементов белков. Белковая серийная микрокристаллография открыла новые возможности для определения структуры промежуточных продуктов реакции с временным разрешением и исследования многообразия конформационных состояний макромолекул в условиях близких к физиологическим.

Этот метод требует образцов, содержащих большое количество высокоупорядоченных кристаллов нано- или микроразмеров. Однако процессы роста и структурные особенности высококачественных микрокристаллов еще недостаточно хорошо изучены.

Микрокристаллы получают путем смешивания белка с растворами осадителя (метод кристаллизации в объеме), для которого необходима фазовая диаграмма микрокристаллизации с целью получения массового зародышеобразования. Рост кристаллов должен контролироваться и, при необходимости, может быть остановлен быстрым разбавлением буфера с высоким содержанием осадителя при достижении желаемых размеров кристаллов [1].

В данной работе была предложена методика использования малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) для мониторинга процесса микрокристаллизации лизоцима в рентгеновских капиллярах с использованием различных кристаллизационных растворов. Эксперимент проводился на станции "БиоМУР" Курчатовского источника синхротронного излучения (Москва, Россия). Метод МУРР позволил определить время появления первых кристаллов после смешивания раствора белка с осадителем и момент ингибирования роста кристаллов. Появление брэгговских пиков на зарегистрированных профилях рассеяния лизоцима указывало на начальную временную точку образования первых кристаллов. Предложенный подход может

помочь контролировать качество приготовления суспензий микрокристаллов для серийной кристаллографии с временным разрешением. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-29-12054.

Литература:

I.Kupitz C et al. (2014) Phil.Trans.Soc. B 369, 20130316.

Роль матричного белка М1 вируса гриппа А на начальных этапах инфекции: результаты молекулярного моделирования

Булавко Е.С.^{1,3*}, Калуцкий М.А.², Батищев О.В.¹

¹*ИФХЭ РАН;*

²*Институт мультидисциплинарных наук Макса Планка;*

³*Сколковский институт науки и технологий;*

egor.bulavko@skoltech.ru

Вирус гриппа А - оболочечный РНК-содержащий вирус, который становится причиной как сезонных эпидемий, так и глобальных пандемий гриппа. Заражение им клеток происходит путем эндоцитоза с последующим слиянием мембран вируса и хозяина, индуцируемом понижением рН эндосомы. Матричный белок М1 образует сплошной спиральный каркас под липидной оболочкой вируса, связываясь с ней посредством N-концевого домена, в то время как С-концевой домен образует комплекс с вирусной РНК. М1 выполняет некоторые важные функции на различных стадиях жизненного цикла, однако его роль в процессе слияния вирусной и эндосомальной мембран остается предметом споров. Методом эксперимента *in vitro* недавно было показано, что М1 активно участвует в перестройке вирусной мембраны и следующим за ней высвобождением генома. Тем не менее, детали процессов реорганизации белкового скэффолда и индукции деформирования мембраны остаются неизвестными. Целью настоящей работы стало изучение конформационной динамики комплексов ди- и олигомеров N-доменов М1 с мембраной при изменении рН с 7.7 до 4.0.

Для моделирования описанных выше систем мы использовали подходы молекулярной динамики в крупнозернистом и полноатомном силовых полях. Закисление среды имитировалось протонированием титруемых аминокислот (в первую очередь остатка His-110). Мы также оценили свободную энергию, запасаемую в структуре скэффолда при изменении рН, для чего применили метод термодинамического интегрирования.

По результатам исследования было показано, что стабильность белкового скэффолда модулируется его взаимодействием с мембраной, так как в ее отсутствие время жизни димеров М1 составляет не более 500 нс. Длинные симуляции олигомеров, сложенных в бесконечную периодическую структуру, имитирующую ленту спирали каркаса, показали, что при понижении рН в течение нескольких десятков микросекунд происходит частичное погружение спиралей М1 в мембрану и изменение взаимной ориентации мономеров, которая теперь больше напоминает таковую в кристаллической структуре димера М1 при рН 4.0. Также на примере димера мы показали, что закисление среды приводит к накоплению в системе излишка свободной энергии порядка 9,7 кТ на моль белка. Модуль изгиба мембраны имеет порядок 20 кТ, из чего следует, что кумулятивного потенциала скэффолда достаточно для того, чтобы индуцировать перестройку вирусной оболочки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ #20-54-14006

Роль сетей водородных связей в фотосинтетических реакционных центрах 2-го типа

Васильева Л.Г.^{1*}

¹*Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино, Россия;*

vsyulya@mail.ru

В последние годы существенно пополнились данные о пространственных структурах мембранных белков, расшифрованных с высоким разрешением. Это дает возможность исследовать взаимосвязи между структурой и функцией трансмембранных комплексов. В частности, значительное внимание привлекают кластеры водородных связей в структурах интегральных белков вблизи поверхности мембран, образуемые за счет взаимодействий ионизируемых аминокислотных остатков и молекул воды. На настоящий момент наиболее изучена роль сетей водородных связей в структурах ряда мембранных транспортных белков и рецепторов (в частности, у фоторецепторов бактериородопсинов), на акцепторной стороне фотосинтетических реакционных

центров (реакционные центры пурпурных бактерий, фотосистема-2 растений), а также на донорной стороне фотосистемы-2. Показана роль водородных связей в обеспечении структурной пластичности и стабильности мембранных комплексов. Менее изучено влияние кластеров водородных связей на окислительно-восстановительный потенциал кофакторов, а также на взаимодействие мембранных комплексов с мобильными переносчиками электрона. Планируется обзор опубликованных работ и собственных результатов по данной теме.

Роль фазовых переходов биополимеров в образовании и функционировании ядерных стресс-гранул (А-телец)

Гаврилова А.А.^{1*}, Фонин А.В.¹, Фефилова А.С.¹
¹*Институт цитологии Российской академии наук;*
asultanbekova@incras.ru

Изучение молекулярных основ процессов, происходящих в живой клетке в нормальных и неблагоприятных (стрессовых) условиях – одна из фундаментальных задач молекулярной и клеточной биологии. За последние десятилетия накопилось большое количество данных, свидетельствующих о существенной роли немембранных органелл в пространственной организации внутриклеточного пространства и регуляции сигнальных путей в ответе на стресс.

Как правило, немембранные органеллы представляют собой жидко-капельные образования, образующиеся в результате неспецифических мультивалентных взаимодействий между неупорядоченными участками РНК-связывающих белков и молекулами РНК. В ряде случаев жидко-капельные конденсаты биополимеров могут трансформироваться в гелеобразные агрегаты и даже более упорядоченные структуры, как патологические, так и функционально значимые. Примером нединамичных функционально значимых структур, образующихся в результате фазовых переходов биополимеров, являются А-тельца.

А-тельца возникают в ядрышке в ответ на стресс, вызванный изменением температуры, pH, осмотического давления и т.д. Они содержат в амилоидном состоянии сотни белков, ответственных за пролиферативную активность, транскрипцию и другие клеточные функции. Образование А-телец начинается с активации транскрипции с межгенных спейсеров рибосомальной ДНК (ribosomal intergenic spacers, rIGS) длинной некодирующей РНК (днРНК), которая называется rIGSRNA (ribosomal intergenic spacer RNA). rIGSRNA выступает в качестве структурного элемента и зародышкообразователя А-телец. Дальнейшее созревание А-телец происходит за счет рекрутирования белков-партнеров rIGSRNA. Транскрипты rIGSRNA представляют собой отрицательно заряженные последовательности с низкой степенью сложности и состоят из тандемных повторов (CU)*n*/(AG)*n*. Увеличение концентрации этих молекул в окрестности геномных локусов rIGS ведет к образованию бимолекулярных конденсатов, к которым, за счет электростатических взаимодействий, привлекаются внутренние неупорядоченные и амилоидогенные белки, содержащие неупорядоченные положительно заряженные участки. Наличие гидрофобных ACM (amyloid-converting motif)-мотивов в составе этих белков при условии их высокой концентрации в составе А-телец создает условия для трансформации конденсатов в гелеобразное состояние и, далее, в агрегаты амилоидных фибрилл. Этот этап завершает созревание А-телец. Окончание стрессового воздействия вызывает разборку А-телец с помощью шаперонной системы клетки и растворение амилоидных фибрилл. Таким образом, А-тельца обеспечивают хранение белков в стрессовых условиях в амилоидной форме без необходимости их деградации и синтеза *de novo*.

Известно, что образование патологических амилоидных фибрилл сопутствует ряду тяжелых, в том числе нейродегенеративных заболеваний. В связи с этим, представляется существенным изучение структуры, механизмов разборки функциональных фибрилл, а также причин перехода этих фибрилл в нерастворимое состояние.

Данная работа направлена на изучение механизмов образования и функциональной роли А-телец. Нами были разработаны подходы для визуализации А-телец. Сигналом к формированию А-телец является транскрипция днРНК rIGSRNA, с которой связывается убиквитилигаза VHL (von Hippel-Lindau protein). Для визуализации А-телец в исследуемых клетках были созданы плазмиды, кодирующие белки слияния флуоресцентного белка EGFP с изоформами VHL (VHL30 и VHL19). Далее полученные конструкторы трансфецировали в клетки аденокарциномы человека MCF-7 и инкубировали в диапазоне температур от 40 до 43 градусов Цельсия для индуцирования клеточного теплового шока. Осмотический стресс был создан введением в клетки NaCl, а индукция стресс-ответа в исследуемых клетках вследствие изменения pH была осуществлена путем закисления сред для культивирования клеток и инкубации клеток в присутствии 1% кислорода.

Показано, что вне зависимости от типа стрессового воздействия, наблюдается увеличение ядерной локализации изоформ VHL в клетках MCF-7, подвергшихся стрессовому воздействию, а также формирование компартментов, окрашиваемых красителями, специфически взаимодействующих с амилоидными фибриллами.

Это указывает на формирование А-телец. Динамичность образовавшихся в результате стрессового воздействия А-телец была исследована методом восстановления флуоресценции EGFP после ее фотообесцвечивания (FRAP). Установлено, что А-тельца, образовавшиеся в результате инкубации клеток в течение 1 часа при 43 градусах Цельсия, теряют свою динамичность.

Образование А-телец в клетках, подвергшихся стрессовому воздействию, было также исследовано с помощью электронной микроскопии. Для этих целей использовали ультратонкие срезы клеточной культуры, помещенные на никелевые сетки и дополнительно обработанные контрастирующим раствором. Показано, что тепловой стресс вызывает формирование в ядрышках исследуемых клеток аморфных и фибриллярных электронно-плотных структур.

Для визуализации целевого rGSRNA транскрипта в фиксированных клетках был выполнен FISH. Установлено образование rGS16RNA кластеров в ядрышках клеток MCF-7, подвергшихся тепловому стрессу.

Была исследована способность белка VHL образовывать фибриллярные структуры *in vitro*. Для этих целей препараты VHL инкубировали в растворах с нейтральным pH в присутствии высоких концентраций краудинг-агентов и в растворах с кислым pH. Установлено, что в растворах нейтральным pH молекулы VHL образуют аморфные агрегаты, в то время как в растворах с кислым pH – амилоидные фибриллы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда грант РНФ № 21-75-10166 (руководитель Фонин А.В.).

Создание и изучение наноструктур на основе ДНК

Касьяненко Н.А.^{1*}

¹СПбГУ;

n.kasyanenko@spbu.ru

Использование биополимеров, особенно молекулы ДНК, для создания наноструктур в настоящее время используется в различных технологических разработках. Благодаря высокой специфичности, технология ДНК-оригами позволяет запрограммировать и получить методом самосборки различные 3-D конструкции, которые можно использовать в качестве материала при создании наноразмерных структур различного назначения, которые находят применение в наномедицине, нанофотонике, нанооптике и др.

Альтернативный подход использует индуцированные конформационные переходы, основанные на полиэлектролитных свойствах ДНК и на ее уникальных характеристиках – высокой жесткости, способности достаточно легко трансформировать уникальную двуспиральную структуру в гибкие одноцепочечные полимеры, на ее амфифильности (сочетании гидрофобных оснований и гидрофильного сахара-фосфатного остова). Использование высокомолекулярной ДНК, способной компактизоваться в результате комплексообразования с противоположно заряженными агентами (полиаминами, поликатионами, многозарядными ионами металлов) в растворе позволяет индуцировать формирование наноразмерных упорядоченных структур. Такой подход использует неспецифические взаимодействия ДНК с лигандами. Манипуляции с качеством растворителя, изменением pH и ионной силы раствора, использование ПАВ может позволить регулировать процесс формирования наноструктур, заранее определяя их свойства и физико-химические характеристики. При необходимости такие структуры можно «декорировать» наночастицами и биологически активными агентами. Специфическое связывание различных лигандов с макромолекулой обеспечивает целенаправленную модификацию свойств формируемых наноструктур. Оптимизация такого подхода может обеспечить его использование при создании многокомпонентных систем. Как известно, наночастицы благородных металлов обладают уникальными плазмонными свойствами, которые применяются в различных технологиях: в биомедицинских приложениях при создании биосенсорных устройств, биокатализаторов, переносчиков биологически активных веществ, усилителей оптических сигналов и др.

В зависимости от природы и способа синтеза наночастицы могут обладать различными свойствами. Один из многообещающих способов синтеза наночастиц основан на использовании молекулы ДНК как шаблона. Получаемые таким образом наноматериалы привлекают внимание широким спектром применения. «Умные» многофункциональные наноматериалы, формируемые путем самосборки сложных комплексов в растворе, привлекают внимание не только широким набором возможных прикладных разработок, но и необходимостью решать фундаментальные задачи, касающиеся конформационного анализа, полиэлектролитных свойств, возможного фазового разделения в таких системах.

Одной из целей работы был подбор условий для синтеза сопряженных с ДНК частиц золота, серебра и палладия. Рассматривали возможное влияние интегрированных с ДНК наночастиц благородных металлов на конформационные и оптические свойства макромолекулы, на люминесценцию связанных с ДНК лигандов, на компактизацию макромолекулы, индуцированную различными агентами.

Предложен новый способ создания наночастиц палладия (PdNPs) без восстановителя с использованием синтетического сополимера. Проведено сравнение размеров и свойств полученных наночастиц с золотыми (AuNPs), синтезированными аналогичным путем, а также показана возможность формирования биметаллических наночастиц Au/PdNPs. Предложен способ металлизации ДНК золотыми и палладиевыми наночастицами в присутствии и отсутствии поверхностно-активного вещества с использованием боргидрида натрия в качестве восстановителя. Рассмотрены комплексы ДНК-наночастицы-противоопухолевые препараты на основе координационных соединений металлов.

Для характеристики систем использовали методы динамического светорассеяния, атомной силовой микроскопии, спектрофотометрии, гидродинамические методы оценки размеров и жесткости макромолекул.

Сравнительный анализ состава и структуры хрусталиков пресноводных рыб и моллюсков

Капитунова А.И.^{1*}, Доминова И.Н.¹, Жуков В.В.¹, Кундалевич А.А.¹, Самусев И.Г.¹
¹*Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия;*
AIKapitunova@mail.ru

Предполагается, что оптические свойства хрусталиков камерного глаза определяются в основном содержанием в них кристаллинов. При этом у водных животных с камерными глазами сферический хрусталик играет основную роль в преломлении света и создании изображения на сетчатке. Известно, что в составе хрусталика рыб присутствуют α -, β - и γ -кристаллины, среди которых количественно преобладают γ М-кристаллины, практически отсутствующие у других животных. Их присутствие и тип фолдинга, возможно, определяют высокое значение радиального градиента индекса преломления хрусталика рыб, что корректирует сферическую абберацию. Хрусталики камерных глаз беспозвоночных гидробионтов, предположительно обладают аналогичными свойствами, которые, однако, обусловлены иным составом белков. Обладателями таких глаз являются преимущественно моллюски, главным образом брюхоногие и головоногие. В тоже время полный и точный состав кристаллинов, образующих хрусталик глаза, известен лишь для ограниченного числа животных, к которым относятся некоторые млекопитающие и *Danio rerio*, информация же для других рыб и моллюсков либо отсутствует полностью, либо известны лишь отдельные белки, входящие в состав хрусталика.

В базе NCBI Protein нами было обнаружено 7 групп кристаллинов для моллюсков и определены для них средние значения показателя гидрофобности (GRAVY), процентное соотношение вторичных структур белков и значения инкремента показателя преломления (dn/dc). Для сравнения аналогичные показатели были определены для кристаллинов хрусталиков рыбы *D. rerio*. Для некоторых кристаллинов моллюсков характерна видоспецифичность. Большинство из них, за исключением μ - и ζ -кристаллинов, являются гидрофильными белками с преобладанием α -спиралей и неупорядоченных структур (coil) в качестве вторичных структур. Расчет значений dn/dc показал, что их наибольшие значения характерны для γ М-кристаллинов *D. rerio* и единственного S-кристаллина *Pomacea canaliculata*. В целом сравнение упомянутых свойств кристаллинов моллюсков с таковыми белками хрусталиков *D. rerio* позволило предложить на роль кристаллинов хрусталиков моллюсков α - и S-кристаллины.

Для дальнейшего сопоставления белков хрусталиков водных моллюсков и рыб на спектрометре Renishaw Virsa были получены спектры комбинационного рассеяния света для хрусталиков карпа *Cyprinus carpio*, судака *Sander lucioperca*, сига *Coregonus lavaretus*, угря *Anguilla anguilla*, а также моллюсков *Lymnaea stagnalis* и *Pomacea canaliculata*. Для сравнения с кристаллинами млекопитающих также был получен спектр комбинационного рассеяния хрусталика мыши *Mus musculus*. Для крупных хрусталиков *C. carpio*, *S. lucioperca*, *M. musculus* был использован лазер с длиной волны $\lambda = 532$ нм, а для меньших размеров (*C. lavaretus*, *D. rerio*, *A. anguilla*, *L. stagnalis* и *P. canaliculata*) – лазер с длиной волны $\lambda = 785$ нм, поскольку он обладает меньшей энергией излучения и не изменяет структуру объекта. Хрусталики помещали на кварцевую подложку и выполняли съемку спектров в области 250 – 4000 см⁻¹. Основные различия спектров рыб и моллюсков были обнаружены в диапазоне 1000 – 2000 см⁻¹. При этом, спектр хрусталика мыши почти не отличим от спектра хрусталиков рыб, что может свидетельствовать о схожем составе хрусталиков позвоночных животных, а именно, о присутствии γ -кристаллинов в их составе. В тоже время, аминокислотные последовательности кристаллинов этих животных имеют различия, что подтверждается наличием на спектрах рыб пика около 700 см⁻¹, соответствующего участку C–S двух остатков метионина и отсутствующего в спектрах мыши. Однако, принципиальных различий в фолдинге белков нет, и представлен он преимущественно антипараллельными бета-листами и неупорядоченными участками, что отражается в схожей форме пиков в диапазонах амида- I от 1230 до 1280 см⁻¹ и амида-III от 1650 до 1680 см⁻¹.

Спектры комбинационного рассеяния света для хрусталиков моллюсков *L. stagnalis* и *P. canaliculata* значительно отличались от спектров рыб и мыши, что может быть объяснено наличием в хрусталиках таксон-специфических кристаллинов, точная принадлежность которых к определенной группе пока не известна. Так различия спектров между моллюсками и рыбами и мышью наблюдались в области 1500 – 1700 см⁻¹. При этом самый интенсивный пик был отмечен в районе 1550 см⁻¹ и имел большую интенсивность, чем пик амида-III – 1650 – 1680 см⁻¹, что характерно для белков с большим количеством α-спиралей или неупорядоченных структур и полным отсутствием или меньшим количеством β-листов. В дополнение наблюдался еще широкий пик в диапазоне около 1240 – 1245 см⁻¹, характерный для неупорядоченной структуры белка. Стоит также отметить, что в спектрах моллюсков и мыши присутствует пик на 750 см⁻¹, характеризующий наличие триптофана.

Тонкая структура хрусталиков *S. luciopectora*, *L. stagnalis* и *P. canaliculata* была проанализирована с помощью фазово-контрастной (Olympus IX51) и сканирующей электронной (Hitachi TM4000Plus) микроскопий. Анализ структуры срезов и поверхностей расколов позволяет заключить, что материал хрусталиков *S. luciopectora* имеют выраженную слоистую структуру, в отличие от гомогенных хрусталиков брюхоногих моллюсков.

В целом полученные результаты позволяют заключить, что сходные оптические задачи, стоящие перед зрением гидробионтов, возможно, решаются у рыб и моллюсков различными структурными компонентами хрусталика, которые требуют дальнейшего детального изучения.

Сравнительный анализ трехмерной структуры нонапептидной и октапептидной молекул

Исмаилова Л.И.^{1*}, Аббаслы Р.М.¹, Ахмедов Н.А.¹

¹*Бакинский Государственный Университет, Институт физических проблем;
lara.ismailova.52@mail.ru, ranaabbasli54@mail.ru*

В настоящее время активно исследуется роль регуляторных пептидов в жизни и деятельности организмов. Регуляторные пептиды относятся к группе нейромодуляторов, которые являются ключевым звеном механизма регуляции функций человеческого организма. Современная медицина и биотехнология ставят перед собой важную задачу создания эффективных лекарственных препаратов, которые отличались бы широким спектром действия и минимальным числом побочных эффектов. При создании новых лекарственных препаратов исследователи обращаются к использованию собственных ресурсов человеческого организма. Чтобы определить выполняемые пептидами функции, необходимо изучить пространственное строение и структурно-функциональную организацию этих молекул.

Компьютерное моделирование, основанное на использовании метода теоретического конформационного анализа и программ, позволяющих получать графическое изображение пространственных структур молекулы, было выполнено для двух нейропептидов: нонапептидной молекулы Leu-Pro-Pro-Gly-Pro-Leu-Pro-Arg-Pro-NH₂ (Antho-RPamide) и октапептидной молекулы Pro-Pro-Gly-Leu-Gly-Pro-Leu-Arg-NH₂. Обе молекулы отличаются большим содержанием пролина, наличием двух остатков лейцина и одного аргинина. Известно, что нонапептид был выделен из нейрона морского анемона и обладал высокой биологической активностью. Что касается октапептидной молекулы, то ее активность отсутствует полностью. Это чисто экспериментальный факт. Целью наших исследований стало определение пространственной организации нона- и октапептидной молекул, так как пространственная структура пептидной молекулы полностью определяет её функциональные особенности. Актуальность исследования пространственной структуры нейропептидных молекул обусловлена тем, что в настоящее время определена первичная структура большого числа пептидных молекул, выделенных из нейронов моллюсков, молекул, обладающих ингибиторными свойствами. Тормозя некоторые процессы в клетке, эти пептиды регулируют биохимические процессы, происходящие в ней. Нейропептидные молекулы являются распространенным классом выдающихся сигнальных пептидных молекул.

Для нахождения пространственного строения пептидов, нами использовались теоретический подход, позволяющий рассчитывать трехмерную структуру биомолекул исходя из известной аминокислотной последовательности и разработанная нами, компьютерная программа. Такой подход позволяет с достаточной точностью количественно описать геометрию молекулы, определить значения двугранных углов основной цепи и боковых цепей молекулы, а также найти энергетические взаимодействия атомов в этой молекуле. Расчет проводился в рамках механической модели молекул с учетом невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. При расчете пространственной структуры пептидных молекул использовался метод теоретического конформационного анализа. Для каждой из этих молекул были найдены низкоэнергетические конформации, значения двугранных углов основной и боковых цепей аминокислот, входящих в нее. При этом оценивалась энергия внутри- и межостаточных взаимодействий в каждой низкоэнергетической структуре. Расчет нейропептидных молекул проводился фрагментарно.

Расчет обнаружил наличие резкой энергетической дифференциации конформаций, форм основной цепи и шейпов для обеих молекул. В энергетический интервал 0 – 42 кДж/моль для нонапептидной молекулы попадают 8 низкоэнергетических конформаций, а для октапептидной молекулы - 11 низкоэнергетических структур. Расчет показал, что низкоэнергетическими для нонапептида являются развернутые формы основной цепи, а для октапептида – свернутые и полусвернутые формы основной цепи.

В глобальной конформации B2122BRBRB2122RB3122 В (0,0 кДж/моль) нонапептидной молекулы вклад невалентных взаимодействий составляет (-150,4) кДж/моль, электростатических взаимодействий (-11,8) кДж/моль и торсионных 21,0 кДж/моль. Построенные конформационные карты для боковой цепи Arg8 показали, что она направлена в растворитель и имеет конформационную свободу, поэтому может взаимодействовать с рецептором. Молекула может являться активной.

Октапептидная молекула имеет глобальную конформацию BBBB3222PRR2122B3222 . У нее С-конец свернутый, что создает для аминокислоты Arg8 условия для взаимодействия со всеми остальными аминокислотными остатками. У боковой цепи Arg8 нет конформационной свободы, а, следовательно, нет возможности взаимодействовать с рецептором, поэтому октапептидная молекула неактивна.

Таким образом, пространственную структуру нейропептидных молекул Leu-Pro-Pro-Gly-Pro-Leu-Pro-Arg-Pro-NH₂ и Pro-Pro-Gly-Leu-Gly-Pro-Leu-Arg-NH₂ можно представить ограниченным набором низкоэнергетических конформаций, в которых нона- и октапептидная молекулы выполняют свои основные функции. Выполненный расчет нейропептидов привел к таким структурным организациям молекул, которые не исключают реализацию ими функций, требующих взаимодействий с различными рецепторами.

Стабилизация полноразмерного S-белка коронавируса SARS-CoV-2 в полимере SMA для исследования в электронном микроскопе

Мамаева Н.¹, Глухов Г.С.¹, Новоселецкий В.Н.¹, Деркачева Н.И.², Соколова О.С.^{1*}

¹МГУ, биологический факультет;

²Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова,
Москва, Россия;
sokolova184@gmail.com

Изучение интегральных мембранных белков является одной из основных задач современных исследований в области структурной биологии. В нативных условиях мембранные белки встроены в липидный бислой, который участвует в поддержании стабильности их структуры и необходим для их правильного функционирования. Однако для структурных и функциональных исследований мембранные белки необходимо изолировать от липидной среды, сохраняя при этом их стабильность и активность. Поэтому очистка мембранных белков является более сложной задачей, чем очистка растворимых белков. В качестве объекта исследования в данной работе был выбран полноразмерный S-белок коронавируса SARS-CoV-2 дикого типа (штамм Wuhan-Hu-1), который является возбудителем эпидемии заболевания COVID-19. Благодаря своим функциям, S-белок является одной из наиболее важных целей для вакцин против COVID-19 и терапевтических исследований. Данная работа направлена на изучение конформационной вариативности S-белка коронавируса и возможности получения структуры полноразмерного S-белка дикого типа в составе липодисков.

Полноразмерный S-белок коронавируса SARS-CoV-2 является очень гибкой молекулой что обусловливается необходимостью связывания ACE2 клеточных рецепторов. Молекулярное моделирование полноразмерного S-белка показало, что основные конформационные изменения S-белка происходят в двух точках «ножки» спайк-белка, которые образуют три оси вращения. Использование стирол-малеинового ангидрида (SMA) в качестве солибилизирующего агента представляет собой перспективный метод очистки мембранных белков для получения трёхмерных структур с помощью методов электронной микроскопии. В ходе данной работы мы впервые применили SMA для очистки S-белка коронавируса и получили реконструкцию с разрешением 2,4 нм.

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология»

Стабильность и кинетические характеристики бактериальных люцифераз при воздействии различных температур

Деева А.А.^{1*}, Суковатый Л.А.¹, Лисица А.Е.¹, Мельник Т.Н.², Немцева Е.В.^{1,3}

¹Сибирский федеральный университет;

²Институт Белка РАН;

³Институт Биофизики СО РАН;

adeeva@sfu-kras.ru

Люциферазы катализируют реакцию светоизлучения биoluminesцентных организмов, среди которых наиболее широко в природе распространены светящиеся бактерии. Их можно встретить как в тропических водах мирового океана, так и в северных широтах, в пресной воде и на суше. Однако бактериальные люциферазы (БЛ) принадлежат к термолабильным ферментам, инактивация которых происходит при ~37 °C [1], что затрудняет их использование в качестве репортеров или меток для молекулярного анализа *in vivo*, а также элементов биосенсоров в полевых исследованиях. Стоит отметить, что устойчивость БЛ к термической инактивации *in vitro* может варьироваться в зависимости от вида бактерий, из которых был выделен фермент. Ранее на основании филогенетического анализа было показано, что данные белки можно разделить на две высоко гомологичные группы [2]. Более того, к одной из групп относятся БЛ с быстрой кинетикой биoluminesцентной реакции, к другой – с медленной. Для некоторых «медленных» люцифераз ранее была обнаружена более высокая термостабильность, среди «быстрых» же чаще можно обнаружить психрофильные ферменты. Таким образом, изучение влияния различных температур на активность и структуру БЛ с различными типами кинетики представляет собой актуальную задачу с точки зрения их применения в аналитических методах.

Целью исследования было установить зависимость от температуры кинетических и структурных характеристик двух типов бактериальных люцифераз: «медленной» *Vibrio harveyi* и «быстрой» *Photobacterium leiognathi*. Помимо этого, было исследовано влияние на температурные зависимости бактериальных люцифераз природного экстремофила сахарозы.

Экспериментально были изучены следующие характеристики БЛ двух типов при различных температурах: (1) активность, (2) скорость термоинактивации и (3) денатурация, индуцированная нагреванием. Кинетику реакции люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi* (ООО «Биолумдиагностика») при температуре 5–45 °C измеряли методом остановленного потока на анализаторе SX-20 (Applied Photophysics). Компоненты реакции инкубировали при заданной температуре в течение 5 мин перед измерением кинетики. Скорость термоинактивации ферментов оценивали путем измерения их остаточной активности (при 20°C) после инкубации в течение различного времени при необходимой температуре в диапазоне 40–55 °C. Для инкубации ферментов использовали твердотельный термостат Гном (ДНК-Технология). Калориметрические измерения проводили на дифференциальном сканирующем микрокалориметре SCAL-1 (Scal Co. Ltd.) при скорости сканирования 1 град/мин и давлении 2,5 атм. Кроме того, было проведено по три запуска моделирования молекулярной динамики (МД) обоих ферментов в течение 100 нс при температурах 5, 10, 27, 45, 60 °C с использованием программного пакета GROMACS 2020.4.

Анализ кинетики реакции при 5–45 °C выявил различную чувствительность двух люцифераз к температуре раствора. В частности, при каждом изменении температуры на 5 °C наблюдалось выраженное изменение активности люциферазы *P. leiognathi*, тогда как активность люциферазы *V. harveyi* оставалась постоянной в диапазоне температур 20–35 °C. Результаты МД показали, что более высокая активность люциферазы *P. leiognathi* при низких температурах может достигаться за счет особенностей динамики мобильной петли, формирующей активный центр. Структура люциферазы *V. harveyi* оказалась более стабильна при 60 °C, о чем свидетельствует меньшее стандартное отклонение параметра RMSD за время моделирования. Наблюдаемая термолабильность люциферазы *P. leiognathi* и ее более высокая активность в оптимальных условиях (при 20–25 °C) по сравнению с люциферазой *V. harveyi* согласуются с представлениями о структурно-функциональных особенностях холодаадаптированных белков.

Помимо активности, была изучена структурная стабильность белков, которая играет важную роль в поддержании их функции при изменении температуры. Было установлено, что в одних и тех же условиях скорость термоинактивации люциферазы *V. harveyi* всегда меньше, чем фермента *P. leiognathi*. Сахароза замедляет термоинактивацию ферментов в 2–4 раза, но без существенного снижения энергии активации процесса, которая в буфере и сахарозе составила для люциферазы *V. harveyi* 237 ± 30 кДж/моль и 224 ± 7 кДж/моль, а для фермента *P. leiognathi* 255 ± 27 и 243 ± 47 кДж/моль, соответственно. Наблюдаемый эффект сахарозы может быть связан с уменьшением колебаний мобильной петли при высоких температурах, которое наблюдалось в ходе МД. Исследование денатурации БЛ с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии показало, что температура плавления люциферазы *V. harveyi* выше, чем фермента *P. leiognathi* (47,0 и 45,4 °C соответственно). В присутствии сахарозы температура плавления обоих ферментов увеличивается до 50,1 и 52,0 °C для *P. leiognathi* и *V. harveyi* соответственно. Таким образом, оба подхода показали, что

люцифераза *V. harveyi* обладает более высокой температурной стабильностью, чем *P. leiognathi*, и сахароза способна защищать белки от температурной инактивации и денатурации.

Литература:

1. Zavgalsky G. B. et al. Role of Hsp70 (DnaK–DnaJ–GrpE) and Hsp100 (ClpA and ClpB) chaperones in refolding and increased thermal stability of bacterial luciferases in *Escherichia coli* cells // *Biochemistry (Moscow)*. – 2002. – Т. 67. – №. 9. – С. 986-992.

2. Deeva A. A. et al. Structure-Function Relationships in Temperature Effects on Bacterial Luciferases: Nothing Is Perfect // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Т. 23. – №. 15. – 8119.

Степень сродства Бромистого этидия и Метиленового Синего к одноцепочечной полирибоадениловой кислоте

Вардеванян П.О.^{1*}, Антонян А.П.¹, Парсаданян М.А.¹, Мовсесян З.О.¹

¹*Ереванский государственный университет;*

p.vardevanyan@ysu.am

Исследованы особенности взаимодействия фенотиазинового красителя метиленового синего (МС) и фенантридинового красителя бромистого этидия (БЭ) с синтетическим одноцепочечным полинуклеотидом poly(rA) при ионной силе раствора 100 мМ, при изменении соотношения ($r=D/P$ - лиганд/фосфат) – $1,0 \leq r \leq 20$, методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопий. На основании полученных спектров построены кривые связывания МС и БЭ с оц-poly(rA) в координатах Скэтчарда (зависимость r/C_f от r). Кривая Скэтчарда отражает кооперативное связывание МС с оц-poly(rA), поскольку выпуклая при достаточно низких значениях r , а при больших значениях этой переменной кривая резко уменьшается, затем незначительно изменяется при более высоких значениях r . Аналогичный анализ спектров поглощения при взаимодействии БЭ с оц-poly(rA) дает непрямолинейную кривую Скэтчарда, которая резко уменьшается при низких значениях r , а при более высоких значениях этой переменной кривая претерпевает небольшое уменьшение. Непрямолинейные кривые в координатах Скэтчарда указывают на то, что взаимодействие или антикооперативное и осуществляется по принципу исключенных мест связывания, или имеет место связывание более чем одним способом, с различными константами связывания. Полученные нами кривые анализировались, исходя из того, что оба лиганда могут образовать по крайней мере два типа комплексов с оц-полинуклеотидами [1]. Из этих кривых определены параметры для двух способов связывания указанных лигандов с оц-poly(rA) – значения констант ассоциации K и числа оснований n , приходящихся на одно место связывания.

Прямолинейный участок на указанных кривых связывания, соответствующих низким значениям r , имеет большую крутизну и характеризует сильное связывание обоих лигандов с оц-полинуклеотидом. Анализ этого участка дает высокие значения K ($105 \div 106$ М⁻¹). С другой стороны, МС и БЭ в растворе находятся в катионной форме, а poly(rA) является полианионом, в результате чего эти лиганды могут связываться с этим полинуклеотидом также электростатическим механизмом. Этот способ характеризуется значением констант связывания – K ($103 \div 104$ М⁻¹). Количественный анализ значений полученных параметров выявил, что константа связывания МС с оц-poly(rA) сильным способом более чем на порядок больше, чем константа связывания БЭ с этим полинуклеотидом.

Достаточно высокое значение получено и для n при сильном способе связывания МС с указанным полинуклеотидом, в то время как в случае БЭ аналогичное значение находится в соответствии с таковым, полученным для комплексов БЭ с дц- и оц-ДНК [1]. Большое значение K (в случае сильного способа) при связывании МС с оц-poly(rA) отражают высокое сродство этого лиганда к полиадениловой кислоте в оц-состоянии. В случае БЭ значение константы связывания сильным способом указывает на то, что сродство этого лиганда к оц-poly(rA) менее выражено, по сравнению с МС. Этот факт подтверждается и на основании значений n : для МС на этом полинуклеотиде существует более ограниченное число центров адсорбции, с высоким сродством к ним, в то время как в случае БЭ число этих центров менее ограничено. Фактически, структура полинуклеотида более доступна для полуинтеркаляции БЭ, чем для МС, несмотря на то, что последний связывается с более высоким сродством с этими центрами. Полученные данные находятся в хорошем соответствии с литературными [2,3].

Исходя из вышеизложенного, мы заключаем, что основным способом связывания и МС, и БЭ с оц-poly(rA) является полуинтеркаляция. Другое важное заключение - МС проявляет высокое сродство к оц-poly(rA) со значением константы связывания K порядка ~ 106 М⁻¹. При этом, взаимодействие МС с этим полинуклеотидом кооперативное, что и обуславливает высокие значения K и n . В случае БЭ кооперативность отсутствует, что указывает на то, что структура полинуклеотида для этого лиганда более доступна и большее число центров связывания существует на этом полинуклеотиде, чем для МС.

1. Vardevanyan P.O., Arakelyan V.B., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Hovhannisyan G.G., Shahinyan M.A. // Analysis of experimental binding curves of EtBr with single- and double-stranded DNA at small fillings. Modern Physics Letters B, 2014, 28, 22, p.1450178-1-11.

2. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Sahakyan V.G. Peculiarities of interaction of synthetic polyribonucleotide poly(rA)-poly(rU) with some intercalators. J. of Biomol. Struct. & Dyn., 2017, p. 3607-3613.

3. Hossain M., Kabir A., Kumar S.G. // Binding of the phenothiazinium dye methylene blue with single stranded polyriboadenylic acid. Dyes and Pigments, 2012, 92, 1376-1383. doi:10.1016/j.dyepig.2011.09.016.

Структура и свойства полисахаридных гидрогелей для доставки терапевтических ферментов, витаминов и диагностических маркеров

Богданова Л.Р.², Зуева О.С.^{1*}, Сальников В.В.², Файзуллин Д.А.², Зеленихин П.В.³, Ильинская О.Н.³,
Зуев Ю.Ф.²

¹*Казанский государственный энергетический университет;*

²*Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ КазНЦ РАН;*

³*Казанский Федеральный Университет;*

ostefzueva@mail.ru

Гидрогели на основе белков и полисахаридов являются перспективными биотехнологическими материалами для доставки лекарственных и диагностических препаратов [1]. Это связано с их природным происхождением, сходством структуры и основных физико-химических свойств с межклеточным матриксом живых систем, обеспечивающим их хорошую биосовместимость. Наиболее технологичными являются физические и близкие к ним ионотропные гидрогели, в которых трехмерная полимерная сетка поддерживается механическим переплетением полимерных молекул и/или стабилизирована межмолекулярными взаимодействиями, такими как ионные мостики, водородные связи и гидрофобные взаимодействия.

Гидрогели на основе полисахаридов проявляют оригинальные физико-химические и биотехнологические свойства при доставке лекарств, в тканевой инженерии, в регенеративной медицине, в молекулярной диагностике и терапии [2,3]. Полисахариды из природных источников обладают низкой токсичностью, биосовместимостью и высокой стабильностью в физиологических условиях. Настоящая работа демонстрирует наши результаты по использованию полисахаридных гидрогелей для доставки терапевтических ферментов, витаминов и диагностических маркеров.

В работе использованы два полисахарида. Альгинат натрия - линейный полимер из бурых морских водорослей. Гелеобразование альгината стимулируется двухвалентными катионами при постоянной температуре. Второй полисахарид, к-каррагинан, линейный анионный полимер, экстрагированный из красных морских водорослей. Эти полисахариды активно используются в тканевой инженерии и доставке фармакологических препаратов. В настоящей работе было проведено комплексное исследование влияния технологических особенностей приготовления гидрогелей на их инкапсулирующие свойства.

Одна из основных технологий, используемых при доставке лекарств, это микроинкапсулирование. Наличие в структуре полисахаридных гидрогелей участков различной полярности позволяют инкапсулировать как гидрофильные, так и гидрофобные целевые биоактивные соединения.

Результаты комплексного исследования структуры и свойств систем на основе полисахаридов для доставки лекарственных и диагностических средств представлены для препаратов различного функционального происхождения, а именно ферментов биназы и липазы, витамина В9 (фолиевая кислота) и бриллиантового зеленого, как модели медицинского контрастного вещества [4]. В докладе представлен краткий обзор данных о структуре полисахаридных гидрогелей, стабилизируемых физическими и ионными связями, рассмотрены методики их приготовления и условия использования.

Установлено, что применение к-каррагинана и альгината наряду с правильно подобранными условиями создают перспективы получения эффективных материалов для биомедицины. Преимущество применения альгината в качестве объекта для инкапсуляции биологически-активных веществ заключается в мгновенном образовании ионотропных гелей, диспергированных в среде частично структурированного раствора с меньшей концентрацией сшивок, которая влияет на высвобождение этих веществ из гидрогелей. Кроме того, как правило, все материалы, сшитые ионными сшивающими реагентами, проявляют рН-чувствительное набухание и выход лекарственных соединений за счет диффузии через их пористую структуру, что позволяет использовать сконструированные системы для пролонгации действия лекарственного соединения.

Показано, что перспективы успешного биомедицинского применения гидрогелей может сдерживать токсичность сшивающих катионов и присутствие углеродных нанотрубок, используемых для модификации систем доставки и придания им новых свойств.

References:

1. L. Bogdanova, P. Zelenikhin, A. Makarova, O. Zueva, V. Salnikov, Yu. Zuev, O. Ilinskaya. Alginate-based hydrogel as delivery system for therapeutic bacterial RNase. *Polymers*. 2022, 14, 2461.
2. L.R. Bogdanova, A.M. Rogov, O.S. Zueva, Yu.F. Zuev. Lipase enzymatic microreactor in polysaccharide hydrogel: structure and properties. *Russian Chemical Bulletin*. 2019, 68, 400-404.
3. L.R. Bogdanova, A.O. Makarova, O.S. Zueva., L.Ya. Zakharova, Yu.F. Zuev. Encapsulation of diagnostic dyes in the polysaccharide matrix modified by carbon nanotubes. *Russian Chemical Bulletin*. 2020, 69, 590-595.
4. O.N. Makshakova, L.R. Bogdanova, A.O. Makarova, A.M. Kusova, E.A. Ermakova, M.A. Kazantseva, Yu.F. Zuev. k-Carrageenan Hydrogel as a Matrix for Therapeutic Enzyme Immobilization. *Polymers*. 2022, 14, 4071.

Структура и функции ядерных белков HmgB1 и HmgB2

Чихиржина Е.В.^{1*}, Старкова Т.Ю.¹, Томилин А.Н.¹, Цимоха А.С.¹, Поляничко А.М.¹

¹*Институт цитологии Российской академии наук;*

e.chikhirzhina@incras.ru

Хроматин представляет собой сложную высоко динамичную систему, которая включает в себя множество факторов. Длина ДНК в хромосоме значительно превышает размер ядра эукариотической клетки и вопрос упаковки ДНК очень важен в биологии не только со структурной точки зрения, но и потому что он тесно связан с правильным функционированием всего генетического аппарата клетки. Высокая степень компактизации ДНК в ядре достигается за счет ее взаимодействия с разнообразными гистоновыми и негистоновыми белками. Гистоны (H2A, H2B, H3 и H4) образуют белковую частицу вокруг, которой закручена ДНК. Эти частицы соединены линкерным участком ДНК, с которым взаимодействует пятый гистон H1. С этим же участком связаны белки большого семейства негистоновых белков – белки с высокой электрофоретической подвижностью (High Mobility Group). Среди таких белков наиболее интересными с нашей точки зрения являются белки HmgB1 и HmgB2, которые активно участвуют не только в регуляции структуры хроматина, но и принимают непосредственное участие во многих клеточных процессах, таких как транскрипция, репарация, рекомбинация. Кроме того, в составе многих транскрипционных факторов в качестве ДНК-связывающих элементов были обнаружены домены, гомологичные домену белка HmgB1. Белки HmgB1 и HmgB2 не обладают специфичностью при взаимодействии с ДНК. Однако также как и гистон H1 они способны узнавать и связываться с участками ДНК с различными структурными нарушениями. Интересным является и тот факт, что при определенных условиях (в следствие посттрансляционных модификаций или изменения окислительно-восстановительного статуса) HmgB1 покидает ядро, перемещается в цитоплазму, а затем выходит во внеклеточное пространство. Все эти процессы тесно связаны с развитием различных заболеваний человека, начиная от сердечных патологий и кончая нарушениями в развитии плода. При выходе HMGБ1 из ядра его количество в ядре уменьшается, а белок HmgB2 продолжает функционировать в нормальном режиме. В связи с вышесказанным важно понимать тонкие структурные различия белков HmgB1 и HmgB2, что, несомненно, влияет на механизмы их взаимодействия с ДНК и другими партнерами.

Белки HmgB1 и HmgB2 весьма близки по своей структуре и аминокислотной последовательности. Оба состоят из короткого N-концевого участка, двух ДНК-связывающих доменов А и В, соединенных линкером, и неупорядоченной С-концевой последовательности из остатков глутаминовой и аспарагиновой аминокислот. Наиболее распространенным методом исследования вторичной структуры белков является круговой дихроизм в УФ-диапазоне. Этот метод позволяет отслеживать изменения структуры как самих белков, так и их комплексов с ДНК.

В работе методами кругового дихроизма (КД) и УФ спектроскопии изучали вторичную структуру белков HmgB1 и HmgB2 тимуса теленка, а также особенности их взаимодействия с ДНК. Кроме того, с помощью метода масс-спектрометрии проведен сравнительный анализ пост-трансляционных модификаций (ПТМ) белков HmgB1 и HmgB2.

В работе показано, что характер расположения ПТМ в исследованных белках различен. В то время как ПТМ HmgB1 расположены преимущественно в А ДНК-связывающем домене и на линкерном участке между А и В доменами, ПТМ HmgB2 сосредоточены в его В домене и также в области линкерного участка. Показано, что, несмотря на высокую степень гомологии между HmgB1 и HmgB2, вторичная структура этих белков различна. Анализ спектров КД белков показал, что в физиологических условиях белок HmgB1 характеризуется более упорядоченной вторичной структурой, чем HmgB2. В то же время HmgB2 проявляет большую

конформационную гибкость при изменении внешних условий. Мы полагаем, что такая гибкость способствует структурной адаптации белка HmgB2 в гораздо большей степени, чем для белка HmgB1. Это обстоятельство, несомненно, влияет на их взаимодействие с другими белками, с ДНК и на структуру ДНК-белковых комплексов. Последнее может определять различие в выполняемых белками HmgB1 и HmgB2 функциях в клеточном ядре.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 22-14-00390).

Структура лед-связывающего белка из рыбы длиннорогий бычок *Myoxocephalus octodecemspinosus* на основе спектров кругового дихроизма

Олейник Г.А.^{2*}, Баранова С.В.², Жданова П.В.², Чернонос А.А.², Коваль В.В.^{1,2}

¹*Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;*

²*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия;
zakabluk@niboch.nsc.ru*

Организмы, у которых среда обитания находится в зоне пониженных температур, выживают благодаря свойствам лед-связывающих белков (IBP). Это белки, которые обладают способностью связываться с кристаллами льда и влиять на их рост разными способами: ингибировать формирование кристаллов льда, снижать температуру замерзания, препятствовать рекристаллизации и способствовать зародышеобразованию (1). Таким образом, лед-связывающие белки позволяют гармонично существовать организмам при низких температурах, предотвращая повреждение клеток, и как следствие их гибель.

Данные белки могут применяться в различных сферах деятельности людей. Они помогают решать, как повседневные потребительские задачи, так и более сложные – медицинские. Например, применяются для сохранения качества продуктов при замораживании. В медицине IBP могут применяться в криохирургии, а также в качестве криопротекторов при транспортировке органов. В литературе описаны работы, в которых практически показано положительное влияние лед-связывающих белков на длительное гипотермическое хранение эмбрионов крупного рогатого скота (2).

Таким образом, польза этих белков очевидна, поэтому для оптимального применения нужно понимать механизмы связывания, знать их структуру. Для большинства лед-связывающих белков известны только теоретические модели, построенные по гомологии. С установлением структуры на практике возникают сложности, поскольку не все белки кристаллизуются. Это то необходимое качество для определения структуры белка рентгеноструктурным анализом. Объектом исследования данной работы был представитель IV класса лед-связывающих белков. Это белок, найденный у рыб вида *Myoxocephalus octodecemspinosus* (Длиннорогий бычок) (P809061).

Целью данной работы стало определение вторичной структуры белка P809061 методом кругового дихроизма. Получен электрофоретически гомогенный препарат белка, полученный IBP IV класса охарактеризован масс-спектрометрическим методом. Проведено три независимых эксперимента, получены спектры кругового дихроизма. Данные настоящей работы дают представление о вторичной структуре белка IV класса из рыб вида *Myoxocephalus octodecemspinosus*.

Исследование было поддержано проектом базового бюджетного финансирования ИХБФМ СО РАН № 0245-2021-0002 и грантом Минобрнауки России № 075-15-2022-263.

1. Adar C., Sirotinskaya V., Bar Dolev M., Friehmann T., Braslavsky I. Falling water ice affinity purification of ice-binding proteins // Scientific reports. 2018. 8. № 1. С. 11046

2. Ideta A., Aoyagi Y., Tsuchiya K., Nakamura Y., Hayama K., Shirasawa A. et al. Prolonging hypothermic storage (4 C) of bovine embryos with fish antifreeze protein // The Journal of reproduction and development. 2015. 61 (1), pp. 1–6.

Структура человеческого сывороточного альбумина при взаимодействии с двухвалентными ионами металлов

Пастон С.В.^{1*}, Горох А.Д.¹, Федотова Е.В.¹
¹СПбГУ;
svpaston@list.ru

Взаимодействие белков с ионами металлов играет важнейшую роль в их функционировании в организме. Активные центры многих белков содержат ион металла. Кроме того, ионы металлов могут нарушать структуру белков, провоцируя их агрегацию, что влечёт за собой патологические процессы вплоть до амилоидоза. Целый ряд нейродегенеративных патологий (например, болезни Альцгеймера, Паркинсона, прионные болезни) относятся к конформационным болезням, их причиной является нарушение процессинга ряда нейрональных белков, приводящее к нарушению их конформации, необратимому комплексообразованию и накоплению в клетке в виде токсичных нерастворимых амилоидных фибрилл и более крупных агрегатов (бляшек) [1]. Патогенные комплексы самоорганизуются за счет гидрофобных взаимодействий, образуя характерную кросс- β -структуру, состоящую из β -слоев, направленных перпендикулярно оси фибриллы [2]. Существуют данные о том, что ионы переходных металлов, которые обладают высоким сродством к пептидам и белкам, могут при связывании с ними индуцировать образование межмолекулярных бета-слоев [1]. В этой связи изучение структуры белка при комплексообразовании с ионами металлов может послужить толчком для разработки методов профилактики и лечения конформационных болезней.

Сывороточный альбумин (СА) – наиболее распространенный водорастворимый белок в организме млекопитающих, составляющий около 60% белков плазмы крови. Он является главным транспортировщиком множества низкомолекулярных лигандов и регулятором осмотического давления крови. Он широко используется как модельный глобулярный белок благодаря своей доступности. В данной работе проведено исследование влияния ряда двухвалентных ионов металлов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}) на структуру СА человека. Изучение вторичной структуры проводили методом ИК Фурье спектроскопии на приставке НПВО с анализом полосы Амид I. О состоянии третичной структуры белковой глобулы судили по спектрам УФ поглощения, собственной флуоресценции СА, а также определяли дзета-потенциал молекул белка в растворе.

Обнаружено, что взаимодействие ЧСА с ионами Mg^{2+} происходит под действием электростатических сил и достигает насыщения при соотношении $[Mg^{2+}]:[ЧСА] = 1000$, при этом структура белка не нарушается. Взаимодействие HSA с ионами марганца и кобальта не вызывает нарушений третичной структуры белка, однако Mn^{2+} способен образовывать координационные связи, и, вероятно, провоцировать образование бета-слоев.

Наиболее существенные изменения структуры белка наблюдаются в растворах, содержащих ионы меди. При малом содержании Cu^{2+} вторичная структура HSA не отличается от нативной. При соотношении $[Cu^{2+}]:[ЧСА]=1:1$ наблюдается частично обратимая агрегация белка в растворе, при этом вторичная структура ЧСА не нарушается как для белка, обнаруженного в осадке, так и для белка в растворе. Дальнейшее повышение концентрации меди $[Cu^{2+}]:[ЧСА]=2:1$ приводит к резкому нарушению вторичной структуры белка: содержание альфа-спиралей снижается, причём белок, находящийся в растворе, показывает большее содержание альфа-спиралей, чем белок, находящийся в осадке.

Потенциал диффузного слоя молекул ЧСА весьма чувствителен к ионному окружению белка. В водном растворе при нейтральном pH дзета-потенциал HSA равен приблизительно -40 мВ [3]. При добавлении соли в раствор преимущественно происходит взаимодействие HSA с катионами, в результате чего отрицательный дзета-потенциал белка уменьшается по модулю. При взаимодействии с двухвалентными ионами магния заряд альбумина приближается к нулю при соотношении концентраций $[Mg^{2+}]:[ЧСА]=1000$, и при этом не происходит нарушения структуры белка. Исследование систем, содержащих ионы марганца, в данной работе проведено до соотношения концентраций $[Mn^{2+}]:[ЧСА] = 50$ и при этих соотношениях изменение плотности заряда на молекуле ЧСА в присутствии ионов марганца происходит аналогично наблюдаемому в присутствии ионов магния, но менее ярко выражено. Взаимодействие ЧСА с Cu^{2+} приводит к изменению знака заряда белка. Дзета-потенциал равный нулю достигается при соотношении 1:1. Это соотношение соответствует росту поглощения и рассеяния и уменьшению интенсивности флуоресценции ЧСА. Дальнейший рост концентрации ионов меди приводит к появлению положительного заряда на поверхности ЧСА, а в спектрах поглощения наблюдается уменьшение рассеяния, то есть растворимость белка снова повышается. Перезарядка молекул альбумина свидетельствует об образовании прочного комплекса с катионами меди. Таким образом, ионы меди образуют сильную координационную связь с сывороточным альбумином.

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования вещества».

1. С.Н. Иллариошкин. Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К, 2003. 248 с.

2. R.Tycko, R. B. Wickner. Molecular structures of amyloid and prion fibrils: consensus versus controversy. Acc. Chem. Res. 2013. V. 46. P. 1487–1496.

3. S.A. Tankovskaia, K.V. Abrosimova, S.V. Paston, Spectral demonstration of structural transitions in albumins, *Journal of Molecular Structure*, 2018, V. 1171, P. 243-252.

Структура, динамика и мембранотропные свойства антимикробных пептидов. Спектроскопия и компьютерное моделирование

Зуев Ю.Ф.^{1*}, Хайрутдинов Б.И.¹, Курбанов Р.Х.¹, Скворцова П.В.¹, Ермакова Е.А.¹

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН;

yufzuev@mail.ru

Антимикробные пептиды (АМП) - важные компоненты иммунных систем млекопитающих, холоднокровных рептилий, насекомых и растений.

В данной работе для изучения структуры, конформационной динамики и мембранотропных свойств ряда катионных, цистеинсодержащих АМП применен комплекс спектроскопических методов (ЯМР, ИК, КД, УФ) и компьютерного моделирования (молекулярный докинг и крупнозернистая молекулярная динамика (CGMD)). В докладе приводятся сведения о структуре нескольких АМП, полученные комплексом спектроскопических методов и механизмах их действия на модельные мембранные структуры, оцененных с помощью вычислительных методов. В некоторых случаях мы попытались дополнить общую картину данными по функциональной активности АМП. В совокупности наши данные дают представление о структуре, динамике и механизмах действия АМП на структуру мембран [1-5].

Механизм действия АМП – сложный многоступенчатый процесс, одной из основных стадий является взаимодействие АМП с клеточными мембранами. Методом молекулярной динамики показано, что АМП образуют поры в исследованных модельных мембранах или локализуются на поверхности мембран по принципу “ковровой” модели, образуя устойчивые комплексы с мембранами различного состава. Связывание АМП на поверхности мембраны приводит к изменению распределения липидов в мембране и изменению электростатического потенциала мембраны. Деформация электростатического потенциала мембраны может быть причиной образования дефектов в структуре мембраны, способствовать встраиванию АМП в ее структуру и служить причиной гибели клетки.

Конструирование модельных пептидов на основе природных АМП – перспективное направление как в исследовании механизмов действия АМП, так и разработке новых лекарственных средств. Например, в качестве модельного аналога АМП на основе аминокислотной последовательности защитного белка – дефензина сосны PsDef1 был построен катионный β -пептид с последовательностью RMCKTPCGKFYCYKPCP и изучено его взаимодействие с многокомпонентными мембранами. Методом CGMD показано, что, в отличие от самого дефензина, модельный пептид может встраиваться в мембрану и образовывать в ней стабильные поры. Наблюдаемые поры не имеют центрального водного канала, а молекулы воды проникают через мембрану через узкие щели между пептидами или между пептидами и заряженными головными группами анионных липидов. Показано, что олигомеризация пептидов является необходимым условием для образования и стабилизации пор.

В качестве другого примера использован катионный пептид мегин, полученный из кожного секрета австралийских амфибий. Трехмерную структуру двух форм данного пептида определяли с помощью ЯМР-спектроскопии в растворе и уточняли методами оптической спектроскопии. Получены термодинамические характеристики процесса превращения пептида из линейной в циклическую форму. Проанализированы антибактериальные и антимикотические свойства пептида, его ингибирующая активность в отношении сериновых протеаз.

References:

1. E. Ermakova, Yu. Zuev // Interaction of Scots Pine Defensin with Model Mem-brane by Coarse Grained Molecular Dynamics // *Journal of Membrane Biology*, 2017. V. 250. P. 205-216. DOI 10.1007/s00232-017-9950-5.

2. 198. B.I. Khairutdinov, E.A. Ermakova, Yu.M. Yusypovich; E. Bessolicina; N.B Tarasova, Ya.Yu. Toporkova, V. Kovaleva, Yu.F. Zuev, I. Nesmelova // NMR Structure, Conformational Dynamics, and Biological Activity of PsDef1 Defen-sin from Pinus Sylvestris // *BBA. Proteins and Proteomics*, 2017. V.1865, N8, P. 1085-1094. DOI: 10.1016/j.bbapap.2017.05.012.

3. Ermakova E., Kurbanov R., Zuev Yu. Coarse-grained molecular dynamics of membrane semitoroidal pore formation in model lipid-peptide systems // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2019. V. 87. P. 1-10. doi:10.1016/j.jmgm.2018.11.003.

4. P. Skvortsova, Yu. Valiullina, N. Baranova, D. Faizullin, Yu. Zuev, E. Ermakova // Spectroscopic study of antimicrobial peptides: Structure and functional activity // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2022, V. 264, 120273. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120273>.

5. Skvortsova P., Shurpik D., Stoikov I., Khairutdinov B., Zuev Y., Ermakova E. Structure and membranotropic properties of peptides and synthetic macrocycles // Magnetic resonance and its applications Proceedings. – 2022. – P. 244-246.

Структурная организация белков хроматина HMGB1, H1 и их комплексов

Чихиржина Е.В.², Поляничко А.М.^{1,2*}

¹СПбГУ;

²Институт цитологии РАН;

a.polyanichko@spbu.ru

ДНК в ядре эукариотической клетки входит в состав сложного ДНК-белкового комплекса, способного обеспечивать не только его функционирование, но и при необходимости высокую степень компактизации. ДНК-связывающие белки в ядре клетки можно условно разделить на две большие группы: гистоновые и негистоновые белки хроматина. К первым относятся коровые гистоны (H2A, H2B, H3 и H4), составляющие белковую частицу, вокруг которой закручена двойная спираль ДНК, и линкерный гистон H1, взаимодействующий с ДНК на межнуклеосомных (линкерных) участках. Среди остальных (т. е. негистоновых) белков хроматина наиболее многочисленны представители обширной группы белков с высокой электрофоретической подвижностью (High Mobility Group, или HMG), некоторые из которых, так называемые белки HMGB, также функционируют в межнуклеосомных областях хроматина. Эти белки активно участвуют не только в регуляции структуры хроматина, но и принимают непосредственное участие во многих клеточных процессах, таких как транскрипция, репарация, рекомбинация и др.

Функции линкерных белков тесно связаны с их конформационным состоянием. В настоящее время активно изучается строение белков, играющих ключевую роль в формировании высших уровней структурной организации хроматина. В данной работе проведен сравнительный анализ вторичной структуры линкерного гистона H1 и негистонового белка HMGB1. Методами кругового дихроизма в УФ-области и ИК-Фурье-спектроскопии показано, что положительно заряженный гистон H1 связывается с С-концевым фрагментом HMGB1, стабилизируя образующийся комплекс и индуцируя формирование дополнительных α -спиральных участков в обоих белках. Показано, что взаимодействие белков HMGB1 и H1 очень быстро приводит к образованию в растворе достаточно крупных рассеивающих комплексов, что затрудняет анализ спектров КД в ультрафиолетовой области спектра. Вместе, даже такие относительно крупные белковые комплексы не рассеивают свет в инфракрасной области спектра, что позволяет анализировать вторичную структуру белков в комплексе по их спектрам ИК поглощения.

На основании анализа данных ИК-спектроскопии мы предположили, что первичное образование комплекса происходит за счет электростатического взаимодействия между отрицательно заряженным С-концевым участком HMGB1 и положительно заряженными группами гистона H1. Последующее изменение вторичной структуры белков в комплексе приводит к образованию дополнительных α -спиральных участков в обоих белках.

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ («Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Центр диагностики функциональных материалов для медицины фармакологии и нанoeлектроники», «Криогенный отдел»).

Структурная организация молекулы рубисколина-6

Ахмедов Н.А.^{1*}, Агаева Л.Н.¹, Аббаслы Р.М.¹, Исмаилова Л.И.¹

¹Бакинский Государственный Университет, Институт физических проблем;

Namiq.49@bk.ru

Опиоидные пептиды бывают животного и растительного происхождения. Ряд экзогенных пептидов, получаемых с пищей, обладают опиоподобными свойствами. Такие пептиды были названы экзорфинами. Экзорфины выделены из различных видов растений. Впервые рубисколины были выделены из листьев шпината. Однако степень гомологии большой субъединицы РУБИСКО у разных видов высших растений чрезвычайно высока (более 90%), а содержание РУБИСКО в зеленых листьях составляет до 50% от общего белка. Следовательно, рубисколины в значительных количествах могут попадать в организм при употреблении не только шпината, но и салата, щавеля, петрушки и др. Зеленые листья этих растений являются важным

компонентом сбалансированного рациона, поэтому исследования структурной организации рубисколинов имеют практическую ценность.

Нами были исследованы структурно-функциональные организации опиоидных пептидов, а в настоящее время исследуется пространственная структура экзорфинов. Эта работа является продолжением наших предыдущих исследований.

Расчет молекулы выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда-Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монопольном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности молекулы рубисколина изучены в условиях водного окружения, в связи с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей оценивалась с помощью потенциала Морзе.

Трехмерная структура молекулы рубисколина-6 (Tyr1-Pro2-Leu3-Asp4-Leu5-Phe6-NH₂) была исследована фрагментарно. Сначала, на основе низкоэнергетических конформаций соответствующих аминокислотных остатков изучена пространственная структура пентапептидной молекулы рубисколина-5 (Tyr1-Pro2-Leu3-Asp4-Leu5-NH₂) и определены ее стабильные конформации. На втором этапе на основе низкоэнергетических конформаций молекулы рубисколина-5 и аминокислотного остатка Phe6 была рассчитана пространственная структура рубисколина-6. Результаты расчета показали, что возникает энергетическая дифференциация между конформациями, формами основных цепей и шейпами. В широкий энергетический интервал 0-60.0 кДж/моль попадают конформации восьми шейпов. Энергия невалентных взаимодействий в низкоэнергетических конформациях изменяется в энергетическом интервале (-139.9)–(-103.7) кДж/моль, электростатических взаимодействий (-13.9)–9.7 кДж/моль, торсионных взаимодействий 13.9-23.1 кДж/моль. Глобальной конформацией молекулы рубисколина-6 является конформация B3RR12R1R21R3 шейпа effff. Конформация является выгодной одновременно по невалентным и электростатическим взаимодействиям. Здесь только первый аминокислотный остаток Tyr1 находится в В форме основной цепи, остальные аминокислотные остатки участка Pro2-Leu3-Asp4-Leu5-Phe6 свернуты в виде спирали. Поэтому, здесь возникают эффективные взаимодействия между атомами основной цепи и между атомами боковых цепей. Возникают водородные связи между N-H атомом основной цепи Tyr1 и C=O атомом боковой цепи Asp4; между атомом C=O основной цепи Tyr1 и N-H атомом основной цепи Leu5; между атомом C=O основной цепи Pro2 и атомом N-H основной цепи Phe6, которые также в свою очередь стабилизируют глобальную структуру. В этой конформации боковые цепи всех аминокислотных остатков направлены от молекулы к растворителю и легко могут взаимодействовать с другими молекулами и рецепторами.

Конформация B2RB31R3R21R3 шейпа efeff с относительной энергией 13.0 кДж/моль образует такую структуру, что атомы N-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr1-Asp4 эффективно взаимодействуют между собой, а атомы C-концевого дипептидного фрагмента Leu5-Phe6 эффективно взаимодействуют между собой. Между атомами N-H Tyr1 и C=O боковой цепи Asp4 образуется водородная связь.

В конформации B3RR21B3B32B3 образуется такая структура, в которой Tyr1 и Leu3 эффективно взаимодействуют с атомами других аминокислотных остатков. Аминокислотные остатки Pro2, Asp4 и Leu5 эффективно взаимодействуют с соседними аминокислотными остатками.

Конформация B2RB21B3B32B3 шейпа efеее имеет относительную энергию 26.0 кДж/моль. Эта конформация, в основном, стабилизируется за счет ди- и трипептидных взаимодействий. Относительная энергия остальных низкоэнергетических конформаций молекулы рубисколина-6, изменяется в энергетическом интервале 38.6-52.5 кДж/моль. Во всех конформациях вклад невалентных взаимодействий меньше чем в предыдущих конформациях. В них возникают электростатические отталкивания. Вклад электростатических взаимодействий у них положительный.

Таким образом, пространственную структуру молекулы рубисколина-6 можно представить четырьмя структурными типами и можно предположить, что молекула свои физиологические функции осуществляет именно в этих структурах. На основе полученных трехмерных структур, можно предположить для данной молекулы ее синтетические аналоги. Теоретический конформационный анализ гексапептидной молекулы рубисколина-6 привел к такой структурной организации молекулы, которая не исключает реализацию молекулой целого ряда функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

Структурные изменения в хроматине отражаются на особенностях поверхности механически деформированных ядер, наблюдаемых атомно-силовой микроскопией

Байрамуков В.Ю.¹, Ковалев Р.А.¹, Федорова Н.Д.¹, Пантина Р.А.¹, Яшина Е.Г.¹, Григорьев С.В.¹,
Варфоломеева Е.Ю.^{1*}

¹ПИЯФ;
e_varf@mail.ru

Хроматин внутри ядер высокоорганизован. Так, гетерохроматин часто отделяется от транскрипционно активного эухроматина, что приводит к образованию компартов. Сам эухроматин организован в транскрипционно неактивные домены, перемежающиеся очагами транскрипционной активности [1]. При этом считается, что активно транскрибируемая ДНК менее плотно упакована.

В настоящее время подходы к прямым измерениям жесткости транскрипционно активного хроматина весьма ограничены. Использование дополнительных методов прямого наблюдения, даже связанных с необходимостью специфической обработки ядер, могло бы расширить наши возможности понимания принципов организации клеточных ядер. Для выделенных клеточных ядер, фиксированных в суспензии и помещенных на подложку, зачастую характерна относительно гладкая форма без отличительных особенностей морфологии. Очевидно, что в таком виде невозможно использовать АСМ для исследования внутренней структуры ядра. Но естественная эластичность ядер позволила нам реализовать новый подход к исследованию организации ядерной структуры посредством АСМ. Механическое воздействие (центробежное ускорение) преобразует особенности внутриядерной организации в изменение рельефа поверхности ядра.

Ядра нормальных клеток фибробластов были полностью сплюснуты при механическом воздействии, тогда как ядра раковых клеток HeLa были чрезвычайно устойчивыми. В деформированных ядрах HeLa АСМ выявила сильно разветвленный ландшафт, собранный из ~ 400 нм глобул с закрытой упаковкой, и их структура менялась в ответ на внешнее воздействие. Изолированные ядра нормальных и раковых клеток разительно отличались по устойчивости ДНК к механическому воздействию. Как ни парадоксально, более транскрипционно активный и менее оптически плотный хроматин ядер раковых клеток продемонстрировал более высокую физическую жесткость. Высокая концентрация ингибитора транскрипции актиномицина D привела к полному уплощению ядер HeLa, что может быть связано с расслаблением сверхскрученной ДНК, склонной к деформации [2]. Действие ингибиторов топоизомераз I и II приводило к снятию суперскрученности и значительному уплощению ядра, тогда как действие ДНК-интеркалятора, наоборот, приводило к увеличению суперскрученности и, как следствие, устойчивости хроматина к механическому воздействию [3].

Мы показали, что рельеф поверхности является следствием структурных особенностей ядра. Природа высокой устойчивости хроматина к деформации обусловлена суперскрученностью ДНК. А устойчивость к деформации ядерного хроматина коррелирует с фундаментальными биологическими процессами в ядре клетки, такими как транскрипция.

1. Transcription organizes euchromatin via microphase separation Lennart Hilbert, Yuko Sato, Ksenia Kuznetsova, Tommaso Bianucci, Hiroshi Kimura, Frank Jülicher, Alf Honigsmann, Vasily Zaburdaev & Nadine L. Vastenhouw NATURE COMMUNICATIONS | (2021) 12:1360 | <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21589-3>

2. AFM imaging of the transcriptionally active chromatin in mammalian cells' nuclei V.Yu. Bairamukov, M.V. Filatov, R.A. Kovalev, N.D. Fedorova, R.A. Pantina, A.V. Ankudinov, E.G. Iashina, S.V. Grigoriev, E.Yu. Varfolomeeva, BBA - General Subjects 1866 (2022) 130234

3. Структурные особенности механически деформированных ядер HeLa, наблюдаемые методом атомно-силовой микроскопии. В. Ю. Байрамуков, М. В. Филатов, Р. А. Ковалев, Р. А. Пантина, С. В. Григорьев, Е. Ю. Варфоломеева. Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, 2022, № 10, с. 42–47 DOI: 10.31857/S1028096022100041

Структурные основы передачи сигнала посредством трансмембранного домена битопных рецепторов методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения

Бочаров Э.В.^{1,2*}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет);
edvbon@mail.ru

Передача сигнала с помощью битопных рецепторов типа I, таких как рецепторные тирозинкиназы (РТК) и рецепторы цитокинов (использующие Янус-киназу), привлекает внимание исследователей из-за центральной

роли этих мембранных рецепторов в регуляции развития, подвижности, пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток в организме человека. Представители семейств рецепторов эпидермальных факторов роста (ErbB) и рецепторов инсулина (InsR), а также рецептора гормона роста (GHR) служат удобными моделями битопных рецепторов, иллюстрирующих, как лиганд-индуцированные конформационные перестройки и специфическая димеризация внеклеточных доменов приводят к аллостерической активации цитоплазматических доменов, что в конечном итоге приводит к передаче сигнала через мембрану клетки. Показано, что нарушение регуляции передачи сигналов данными рецепторами играет важную роль в развитии ряда заболеваний человека, а ингибиторы этих рецепторов на сегодняшний день являются одними из наиболее успешных примеров таргетной терапии. За последние годы были выяснены многие важные аспекты передачи сигналов рецепторами ErbB, InsR и GHR на молекулярном уровне. Тем не менее, есть несколько нерешенных вопросов, включая особую роль одиночного спирального трансмембранного домена (ТМД) и гибких примембранных участков в переключении активности рецептора с точки зрения слабой связи между структурными перестройками внеклеточных и цитоплазматических доменов.

В работе были экспериментально определены альтернативные димерные конформации ТМД рецепторов ErbB, InsR и GHR в различных средах, имитирующих мембрану, с использованием ЯМР-спектроскопии высокого разрешения в сочетании с МД-релаксацией в явно заданном липидном бислое. На основе данных мутагенеза было определено, что наблюдаемые конформации соответствуют спящему и активному состояниям рецепторов. Из структурно-динамических исследований следует, что адаптация межмолекулярных (белок-белок и белок-липид) полярных и гидрофобных контактов сопровождается переключения между альтернативными модами димеризации ТМД рецепторов ErbB, наблюдаемыми в мицеллах детергентов и липидных бицеллах. Это предполагает, что определенные физико-химические свойства липидного бислоя могут управлять упаковкой ТМД спиралей и, таким образом, их изменение может переключать функциональное состояние рецептора. Было также обнаружено, что конформационная изменчивость ТМД рецепторов InsR семейства и их взаимодействие с окружающими липидами значительно различаются между тремя представителями семейства, что свидетельствует об уникальном молекулярном механизме активации инсулиновых рецепторов, отличным в ряде деталей от других РТК. В то же время, две различные моды димеризации ТМД рецептора GHR, наблюдаемые одновременно в мицеллах, указывают на функциональную роль конформационных перестроек примембранных участков с переключением белок-белковых и белок-липидных взаимодействий, которые могут быть инициированы связыванием лиганда. Таким образом, из совокупности биофизических и биохимических данных следует, что функционирование рецепторов ErbB, InsR и GHR обуславливается не только белок-белковыми взаимодействиями, но и состоянием локального липидного окружения как одного из главных компонентов самосогласованной сигнальной системы. Предложенный липид-опосредованный механизм передачи межклеточного сигнала через мембрану дополняет существующие молекулярные схемы функционирования битопных рецепторов и объясняет ряд парадоксов, наблюдаемых при активации рецепторов дикого типа и рецепторов с патогенными мутациями.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект № 23-74-00024).

Структурный анализ фибриллообразующих пептидов SEM1(86-107) и SEM1(68-107), участвующих в увеличении инфекционной активности ВИЧ

Осетрина Д.А.^{1*}, Юльметов А.Р.¹, Бикмуллин А.Г.¹, Клочков В.В.¹, Блохин Д.С.¹

¹*Казанский Федеральный Университет;
d.sanchugova@yandex.ru*

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) одно из самых опасных заболеваний, которое поражает клетки иммунной системы человека. Со временем ВИЧ вызывает синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), который может привести к восприимчивости к различным инфекциям и опухолям и в конечном итоге к смерти. Поскольку основным путем передачи вируса является незащищенный половой акт, то семенная жидкость рассматривается как основной фактор увеличения активности ВИЧ.

Основным компонентом семенной жидкости является сгусток спермы, который в основном состоит из сперматозоидов и различных белков, в том числе белка семеногелина1 (SEM1). Он секретируется в семенных пузырьках, а во время эякуляции SEM1 расщепляется на небольшие пептидные фрагменты с помощью внутренних протеаз. Было показано, что некоторые из этих пептидных фрагментов семеногелина1 (SEM1(86-107), SEM1(68-107), SEM1(49-107) и SEM1(45-107)) образуют амилоидные фибриллы, которые увеличивают инфекционную активность ВИЧ. Для понимания процесса фибриллообразования и строения фибрилл необходима информация о пространственной структуре образующих их пептидов.

В данной работе были исследованы пептидные фрагменты семеногелина1 SEM1(86-107) и SEM1(68-107) методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения, спектроскопии кругового дихроизма (КД), а также SEM1(68-107) был исследован методом молекулярной динамики (МД). Анализируя 1D, 2D, 3D ЯМР-спектры, были получены значения химических сдвигов ядер ^1H , ^{13}C , ^{15}N , а также геометрические ограничения, которые использовались в качестве входных данных для расчета пространственных структур пептидов SEM1(86-107) и SEM1(68-107) с помощью молекулярного моделирования методом нелинейного отжига, а также для SEM1(68-107) было выполнено полноатомное МД моделирование. По результатам исследования установленные пространственные структуры пептидов были внесены в международные базы данных.

Полученная информация поможет идентифицировать участки пептидов SEM1(86-107) и SEM1(68-107), которые непосредственно задействованы в образовании амилоидных фибрилл.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект № 20-73-10034).

Терагерцовые спектры молекул ДНК

Галанов Е.К.^{1*}

¹*Петербургский государственный университет путей сообщения ;
galanov-evgenijj@rambler.ru*

Проведен анализ спектров инфракрасного поглощения и комбинационного рассеяния молекул ДНК в области $\lambda = 2\text{—}1000\text{ мкм}$ ($h\nu = 5000\text{—}10\text{ см}^{-1}$). В терагерцовом диапазоне $h\nu = 80\text{—}10\text{ см}^{-1}$ проявляются полосы деформационных колебаний сахарного кольца, вращательные колебания иона - PO-4 вокруг оси C3 —C5 сахаро-фосфатной цепи, крутильные колебания оснований, твист колебания комплементарной пары оснований и другие. Показано, что дискретный характер конформационных состояний (В, В', В'', ..., А, А', А'', ...) молекул ДНК определяется дискретностью метастабильных электронных состояний, подчиняющихся статистике Ферми. Заполнение квантовых колебательных уровней осцилляторов молекул ДНК определяется статистикой Бозе.

Показано, что при поглощении электромагнитного терагерцового излучения плавно меняются структурные параметры конформаций В, В', В'', ..., А, А', А'', ... и в случае поглощения излучения высокой плотности вероятны переходы между электронными состояниями. Показано, что домены из элементарных ячеек ДНК, содержащие 50—200 пар нуклеотидов можно рассматривать как элементы долговременной памяти однонаправленной во времени.

Трансляционная диффузия белков как маркер белок-белковых взаимодействий

Кусова А.М.^{1*}, Ситницкий А.Э.¹, Зуев Ю.Ф.¹

¹*ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук»;
alexakusova@mail.ru*

Трансляционная диффузия — основной способ молекулярного транспорта в организмах, который характеризует многочисленные процессы жизнедеятельности в живых системах. В случае простой геометрии молекул в разбавленных растворах диффузия хорошо описывается классической моделью Стокса–Эйнштейна. В реальных живых системах трансляционная диффузия макромолекул существенно отличается от классического представления. Живые системы содержат различные типы макромолекул, такие как ДНК, РНК, белки, которые проявляют множество неспецифических «мягких» межмолекулярных взаимодействий. «Мягкие» взаимодействия состоят из водородных, электростатических, Ван-дер-Ваальсовых и гидрофобных взаимодействий. Оценка влияния внутриклеточной среды, модулирующей белок-белковые взаимодействия (ББВ), необходима, поскольку совокупность «мягких» взаимодействий в клетках формирует клеточное пространство.

Одним из общепринятых подходов к оценке ББВ в водных растворах является анализ их поступательной диффузии. ББВ сфероидальных белков были оценены с помощью концентрационных зависимостей коэффициентов само- и коллективной диффузии с помощью ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП) и динамического рассеяния света (ДРС) [1,2]. Метод ЯМР ИГМП работает во временных масштабах, превышающих временные масштабы межмолекулярных столкновений. Коэффициент самодиффузии D_s является усредненным значением за большой временной диапазон движения частиц. В разбавленных растворах молекулы движутся, не взаимодействуя друг с другом, в то время как в полуразбавленных и концентрированных растворах межмолекулярные взаимодействия приводят к возникновению коллективных мод

движения, описываемых коэффициентом коллективной диффузии D_c (ДРС) [3,4]. D_c зависит от микроскопических флуктуаций локальной концентрации частиц и соответствующих локальных неоднородностей показателя преломления среды [5]. Коэффициенты само- и коллективной диффузии идентичны коэффициенту диффузии в разбавленном растворе, где взаимодействия между диффундирующими частицами отсутствуют. При повышении концентрации частиц D_c и D_s сильно зависят от межмолекулярных взаимодействий.

Концентрационная зависимость коэффициента молекулярной диффузии содержит информацию о вкладе различных типов ББВ. Сочетание концентрационных зависимостей коэффициентов само- и коллективной диффузии с феноменологическим подходом, основанным на фрикционном формализме неравновесной термодинамики, позволяет получить наборы фрикционных и вириальных коэффициентов. Вириальные коэффициенты второго и более высоких порядков используются для оценки парных и многочастичных межмолекулярных взаимодействий в растворах химотрипсина (ChTr), сывороточного альбумина человека (САЧ), α -казеина (α -CN) и β -лактоглобулина (β -Lg). Теория Макмиллана-Майера была применена для количественной оценки неспецифических ББВ [6]. Баланс потенциалов притяжения и отталкивания между белковыми молекулами рассматривался в рамках теории ДЛФО. Положительное значение второго вириального коэффициента ChTr, САЧ, α -СТ и β -Lg при низких значениях ионной силы (0,003–0,01 М) указывает на преобладание межмолекулярного отталкивания. Повышение ионной силы (0,1–1,0М) привело к экранированию поверхностного заряда белковых молекул, в результате чего наблюдалось значительное снижение электростатического потенциала. При этом наблюдаемое увеличение потенциала Ван-дер-Ваальса ChTr и α -CN можно объяснить склонностью этих белков к проявлению слабых неустойчивых взаимодействий притяжения. Уменьшение потенциала Ван-дер-Ваальса β -Lg в растворе с повышенной ионной силой связано с процессом ассоциации [7].

Было установлено, что коэффициенты само- и коллективной диффузии отличаются чувствительностью к короткоживущим молекулярным формам САЧ. С помощью кратковременной коллективной диффузии был обнаружен один тип диффундирующих частиц для раствора САЧ и две молекулярные формы САЧ в присутствии ионов металлов во всем изучаемом концентрационном диапазоне. В то время как наблюдался усредненный коэффициент самодиффузии между быстро обменивающимися мономерными и олигомерными состояниями САЧ.

References:

1. Kusova AM, Sitnitsky AE, Faizullin DA, Zuev YF. Protein Translational Diffusion and Intermolecular Interactions of Globular and Intrinsically Unstructured Proteins. *J Phys Chem A*. 2019;123(46):10190–6.
2. Kusova AM, Sitnitsky AE, Zuev YF. The Role of pH and Ionic Strength in the Attraction–Repulsion Balance of Fibrinogen Interactions. *Langmuir* [Internet]. 2021 Aug 17; Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c01803>
3. Sobac B, Dehaeck S, Bouchaudy A, Salmon J-B. Collective diffusion coefficient of a charged colloidal dispersion: interferometric measurements in a drying drop. *Soft Matter*. 2020;16(35):8213–25.
4. Bowen WR, Mongruel A. Calculation of the collective diffusion coefficient of electrostatically stabilised colloidal particles. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 1998;138(2–3):161–72.
5. Dallari F, Jain A, Sikorski M, Möller J, Bean R, Boesenberg U, et al. Microsecond hydrodynamic interactions in dense colloidal dispersions probed at the European XFEL. *IUCrJ*. 2021;8(5).
6. Haynes CA, Tamura K, Korfer HR, Blanch HW, Prausnitz JM. Thermodynamic properties of aqueous. α -chymotrypsin solution from membrane osmometry measurements. *J Phys Chem*. 1992;96(2):905–12.
7. Verheul M, Pedersen JS, Roefs SPFM, de Kruif KG. Association behavior of native β -lactoglobulin. *Biopolym Orig Res Biomol*. 1999;49(1):11–20.

Физико-химические механизмы самоорганизации оболочечных вирусов

Дениева З.Г.², Попова М.М.², Штыкова Э.В.¹, Батищев О.В.^{2*}

¹*Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук;*

²*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук;
olegbati@mail.ru*

Оболочечные вирусы представляют собой широкий класс патогенов, представителями которых являются возбудители наиболее опасных вирусных заболеваний, такие как SARS-CoV-2, вирус гриппа, вирус иммунодефицита человека, и многие другие. Общей особенностью всех данных вирусов является наличие липопротеиновой оболочки, в которой расположены основные структурные белки вириона. Эти белки

обеспечивают реализацию большинства процессов вирусного инфицирования и мультипликации инфекции, такие как рецепция на поверхности клетки, слияние с ее плазматической мембраной или мембранами клеточных органелл, выход вирусного генома и, в конечном счете – сборка и выход вновь синтезированных вирионов из инфицированной клетки. При этом важную роль практически на всех описанных этапах играют капсидные, или матриксные белки оболочечных вирусов. Эти белки представленные наибольшим числом копий внутри вирусной частицы, являются наиболее консервативными среди вирусных белков, но, тем не менее, их функциональная роль на различных стадиях жизненного цикла оболочечных вирусов все еще остается не до конца понятной. По этой причине данные белки до сих пор не являются мишенями для каких-либо противовирусных лекарственных препаратов. В нашей работе мы использовали различные биофизические и структурные методы, чтобы продемонстрировать, что капсидные или матриксные белки многих оболочечных вирусов используют общие физико-химические механизмы самосборки вирусного каркаса и организации выхода дочерних вирионов из инфицированной клетки. Эти механизмы включают различные варианты мембранной активности структурных белков вирусов, включая поверхностную активность, электростатические взаимодействия, влияние на структуру липидных и липид-белковых доменов, а также встраивание в липидную мембрану. Таким образом, несмотря на различия в структуре данных белков, их функциональная роль может быть сведена к ограниченному набору физико-химических механизмов, общих для всех оболочечных вирусов. На основе полученных моделей таких физико-химических процессов мы предлагаем новые пути для поиска возможных противовирусных препаратов, нацеленных на самоорганизацию вирусных белков и липид-белковые взаимодействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-13-00435).

Физические основы связи структурной организации и молекулярной подвижности полимерных систем медицинского назначения с их химическим строением

Смыслов Р.Ю.¹, Горшкова Ю.Е.^{2,3*}, Некрасова Т.Н.¹

¹*Институт высокомолекулярных соединений РАН;*

²*Объединенный институт ядерных исследований;*

³*Институт физики, Казанский федеральный университет;*

Yulia.Gorshkova@jinr.ru

Поли-2-алкил-2-оксазолины (ПАОЗ) являются перспективным в медицинских приложениях классом полимеров. В значительной степени это обусловлено их биосовместимостью, нетоксичностью и устойчивостью к действию ферментов. В настоящее время они используются при синтезе носителей лекарственных веществ, для создания противоожоговых покрытий с контролируемой скоростью выделения лекарств, для получения термолабильных гелей для остановки кровотечений, материалов, обладающих антитромбогенными свойствами и т.д. Формирование ИПК позволяют расширить возможности их применения в различных направлениях.

Интерполимерные комплексы (ИПК), образующиеся в растворе при взаимодействии двух макромолекул различного химического строения за счет образования водородных связей или электростатических взаимодействий представляют интерес для создания новых высоко функциональных полимерных материалов в качестве молекулярных наноконтейнеров для транспортировки лекарственных препаратов, суперсорбентов, мембранных материалов, заменителей живых тканей. Свойства ИПК существенно отличаются от свойств образующих его индивидуальных макромолекул.

Методом поляризованной люминесценции исследовано формирование ИПК полиметакриловой кислоты (ПМАК) с линейными поли-2-алкил-2-оксазолинами —метил, этил, н-пропил. Наносекундные времена релаксации твмп, характеризующие внутримолекулярную подвижность (ВМП) участков цепей макромолекул тВМП определяли из измерения поляризации люминесценции (Р) раствора по формуле: $tВМП = (1/P \cdot \sigma + 1/3) \times 3\tau_{фл} / (1/P - 1/P \cdot \sigma)$, где $\tau_{фл}$ — длительность свечения люминесцирующей метки, $1/P \cdot \sigma$ — параметр, учитывающий вклад высокочастотных движений метки.

Методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей исследована надмолекулярная структура полученных ИПК при взаимодействии ПМАК с линейными и разветвленными полимерами. Изучено влияние топологии полимерных цепей на комплексообразование на примере взаимодействия ПМАК с цепями поли-2-этил-2-оксазолина, привитыми по верхнему или нижнему ободу каликс-8-арена. Целью исследования является установление факторов, определяющих структуру и функционирование новых полимерных систем сложной архитектуры и состава в растворах.

Люминесцентно меченая ПМАК* была получена свободно радикальной сополимеризацией метакриловой кислоты и 9-антриметакриламида в растворе. Содержание люминесцирующих меток составляло 0,15 мол. %. Линейные полимеры синтезированы на Редингском фармацевтическом факультете, Университет Рединга,

Великобритания (проф. В. Хуторянский). Звездообразные сополимеры получены в ИВС РАН (проф. А.В.Теньковцев). Степень полимеризации n исследованных образцов ПМАК* составляла 3100 ± 264 кД, поли-2-алкил-2-оксазолинов ~ 505 кД, в звездообразных сополимерах степень полимеризации лучей поли-2-эти-2-оксазолинов 30 кД.

Получены зависимости наносекундных времен релаксации твмп, макромолекул ПМАК* в воде при добавлении раствора поли-2-алкил-2-оксазолина при различных соотношениях взаимодействующих компонентов поли-2-метил-2-оксазолина, поли-2-этил-2-оксазолина с $n = 500$.

Добавление 2-алкилоксазолина к раствору поликислоты приводит к резкому возрастанию значений твмп и соответственно уменьшению подвижности участков цепей поликислоты. Это указывает на взаимодействие с макромолекулами поли-2-алкилоксазолина и формирование ИПК. Ключевым фактором в образовании ИПК между ПМАК* и ПАОЗ являются Н-связи между неионизованной протоно-донорной СООН группой и карбонильным кислородом ПАОЗ. Поскольку изменение твмп с ростом соотношения $[\text{ПАОЗ}]/[\text{СООН}]$ практически не зависит от природы заместителя в ПАОЗ, то роль гидрофобных взаимодействий в формировании ИПК ПАОЗ/ПМАК можно признать несущественной. При соотношении взаимодействующих компонентов $\beta = [\text{звено ПАОЗ}]/[\text{СООН}] = 0,7$ в растворе появляется опалесценция, что указывает на агрегацию образующихся ИПК. При взаимодействии поликислоты с ПАОЗ образуется не протяженная кооперативная система водородных связей между индивидуальными макромолекулами, как например, это наблюдается для комплексов поли-N-виниламидов с карбоновыми кислотами, а многочисленные сшивки (Н-связи) между удаленными вдоль цепи протонодонорными и протоноакцепторными группами, что приводит к образованию сетчатой структуры. Формирование такой структуры, по-видимому, обусловлено геометрическим фактором — расстоянием между взаимодействующими группами и наличием массивных гидрофобных заместителей. препятствует образованию протяженной системы Н-связей.

Влияние степени ионизации СООН групп на формирование ИПК обнаружено по изменению обратной величины поляризации люминесценции $1/P$, пропорциональной ВМП, от степени ионизации ПМАК. ПМАК* представляет собой слабый полиэлектролит, в водном растворе степень ионизации СООН групп макромолекулы, α , не превышает 0,03%. В неионизованном и слабо ионизованном состоянии в ПМАК находится в компактной конформации, стабилизированной дополнительно к Н-связям, гидрофобными взаимодействиями α -метильных групп. В результате ВМП цепей ПМАК существенно заторможена по сравнению, например, с ВМП полиакриловой кислоты в тех же условиях. При ионизации ПМАК подвижность участков цепей возрастает с ростом α вследствие разрушения компактной структуры за счет электростатического отталкивания. В данном случае, в ИПК ионизация СООН групп затруднена, за счет образования более стабильных Н-связей с макромолекулами ПАОЗ. Однако, если сравнивать ИПК ПАОЗ/ПМАК/их с «классическими» ИПК поли-N-винилпирролидон/ПМАК, то прочность их заметно слабее и они стабильны относительно узким интервале рН., что указывает на существенное различие в структурной организации ИПК.

Перспективность применения ИПК в качестве наноконтейнеров для доставки трудно растворимых веществ демонстрирует люминесценция водных растворов куркумина в присутствии каликс-8-арена с лучами (поли-2-этил-2-оксазолин) (1, 2) и водных растворов куркумина в присутствии его комплекса с полиметакриловой кислотой (3).

Физические принципы укладки хроматина хромосом типа ламповых щёток

Лагунов Т.А.^{1,2*}, Нурисламов А.Р.^{1,2}, Гридина М.М.¹, Куликова Т.В.³, Красикова А.В.³, Фишман В.С.^{1,2}

¹ИЦиГ СО РАН;

²Новосибирский государственный университет;

³Санкт-Петербургский государственный университет;

t.lagunov@g.nsu.ru

Появление новых методов изучения хроматина (цитологических — на основе метода FISH; молекулярных — таких как 3C, Hi-C) продемонстрировало закономерности пространственной укладки ДНК в ядре клетки. Результаты использования этих методов позволяют полагать, что в регуляции работы генов весомую роль играет трёхмерная организация хроматина, а также связать нарушения пространственной организации хроматина с определёнными заболеваниями. Физическое моделирование хроматина как полимера продемонстрировало, что в основе укладки генома лежат физические закономерности и процессы (энтропийная упругость, механическое расталкивание ДНК, механизм «протягивания петли» когезинами и конденсинами и другие). Хромосомы типа ламповых щёток представляют собой очень интересный объект для исследований и моделирований благодаря тому, что каждую такую хромосому в отдельности можно достаточно полно описать при помощи прямых методов визуализации (световая микроскопия и FISH), а после сопоставить с косвенным методом получения пространственной организации (Hi-C). Так как хромосомы - ламповые щётки образуются только на

определённой стадии развития ооцитов птиц и земноводных, то для изучения пространственной организации хроматина в хромосомах типа ламповых щёток нами был оптимизирован метод Hi-C для получения качественных данных для одиночных клеток. Дополнительно, нашими коллегами был поставлен RNA-seq эксперимент на одиночных ооцитах для сопоставления паттернов экспрессии с контактными доменами хроматина и латеральными петлями. На основании результатов Hi-C и RNA-seq экспериментов можно предположить, что выпетливанию участков ДНК способствует активная транскрипция геномного локуса, а также предложить два основных физических механизма формирования доменов хроматина (аналогов топологически-ассоциированных доменов), не связанных с механизмом «протягивания петли»: путём сталкивания когезинов РНК-полимеразой и путём суперспирализации цепи ДНК.

Фотодимеризация тиминовых хромофоров в водных растворах poly-T при комнатной температуре

Малкин В.М.^{1*}, Рапопорт В.Л.¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет;
vlmalkin@yandex.ru

Наш интерес к исследованию фотофизических и фотохимических процессов в водных растворах poly-T был связан как с тем, что аналогичные процессы происходят в живых организмах, так и с попыткой приблизиться к осуществлению фотохимической записи информации на тимине либо его производных [1, 2].

Методами люминесцентной и абсорбционной спектроскопии мы установили гетерогенность водных растворов политимидиловой кислоты (poly-T, 5·10⁻⁵ моль/литр, pH≈7.0) при комнатной температуре: их спектры возбуждения люминесценции отличались от спектров поглощения, а спектры люминесценции зависели от длин волн возбуждения [3]. Отметим, что ещё в работе [4] были приведены отличающиеся по максимуму спектры поглощения и действия фотодимеризации в водных растворах poly-T. Мы предположили, что в водных растворах poly-T тиминовые хромофоры могут находиться как в относительной изоляции, так и в составе стэкинг-агрегатов, благоприятных для фотодимеризации [5, 6].

Наблюдение за обратимым изменением спектров поглощения растворов под действием ультрафиолетового облучения (297 nm) показало не только падение поглощения, но и изменение формы спектра поглощения. Исследование разностей между спектрами поглощения растворов, получивших разные дозы облучения, позволило обнаружить два типа фотохимически активных стэкинг-агрегатов тиминовых хромофоров, первому из которых соответствуют полосы поглощения – 250 и 280 nm (экситонное расщепление 4300 см⁻¹), а второму – 260 и 290 nm (экситонное расщепление 4000 см⁻¹). Также наблюдалась фотохимически инертная фракция имеет спектр поглощения с максимумом у 270 nm, без экситонного расщепления. Последняя фракция состоит из хромофоров, взаимное положение которых препятствует вступлению в реакцию циклобутановой фотодимеризации. Вероятно, что входящие в неё хромофоры либо удалены от других хромофоров, либо имеют неблагоприятную для вступления в фотохимические реакции ориентацию [3, 5, 6].

Ключевые слова: политимидиловая кислота, спектры поглощения, люминесценция, фотодимеризация, фотоаддукт, фототример, фототетрамер.

Литература:

- [1] В.Л. Рапопорт . В: Тезисы докладов Всесоюзной школы-семинара по биомолекулярному компьютерингу. 27–31 Мая 1991, Москва, с.40
- [2] Ei Yano, S. Tatsuura. Thin Solid Films. 196, 1, p. 147–151 (1991)
- [3] В.М. Малкин, В.Л. Рапопорт. Химическая физика. 22 (4) 3 (2003) с.3–7
- [4] R.A.Deering, R.B.Setlow. Biochimica et Biophysica Acta. 68 (1963) pp. 526-534
- [5] V.M.Malkin, V.L.Rapoport. Biophysics. 50, 6 (2005) p. 874-878
- [6] V.M.Malkin, V.L.Rapoport. Optics and Spectroscopy. 130, 5 (2022) p. 1-9

Фотоэлектронные свойства пептидных нанотрубок на основе различных аминокислот

Быстров В.С.^{1*}, Парамонова Е.В.¹, Юркова Д.О.², Леденёва О.Р.², Белова Е.В.²

¹ИМПБ РАН - филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН;

² Физический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова;
vsbys@mail.ru

Исследования структурной самоорганизации и физико-химических свойств пептидных нанотрубок на основе различных аминокислот и их дипептидов представляет значительный интерес для фундаментальной молекулярной биологии, так и для практических приложений.

Пептидные нанотрубки на основе дифенилаланина (FF PNT) являются примером уже довольно хорошо изученных и широко применяемых наноструктур в различных областях [1-5], включая биомедицину. Однако, сравнительно недавно было установлено, что они проявляют и выраженные фотоэлектронные свойства [6,7], имеющие различия для случаев структур разной хиральности исходных аминокислот и дипептидов L-FF / D-FF [1,2,8].

В данной работе мы сообщаем об аналогичных свойствах нанотрубок и на основе других аминокислот и дипептидов: дилейцина (Leu-Leu/LL PNT) и диизолейцина (Ile-Ile/II PNT). Первоначально построенные модельные структуры нанотрубок для FF PNT на основе собранных стеков параллельных колец (кольцевых структур) [1,2,6,8] были отличны и имели другие характеристики (в т. ч. и большие значения ширины запрещенной зоны $E_g = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$), по сравнению с их экспериментально самособранными структурами, имеющими вид витков спиралей по рентгеновским данным [1,3,8].

Аналогичный характер проявляют также и нанотрубки на основе лейцина и их дипептида — дилейцина LL: L-LL PNT [2]. И в этом случае расчеты для спиральных структур, построенных на основе рентгеновских данных, также дают значения E_g значительно меньше, чем для модельных структур из слоев кольцевых структур. В настоящее время, кроме FF PNT, все экспериментально известные структуры дипептидов основаны на аминокислотах левой хиральности L [4,5,8]. Они имеют наборы довольно сложно организованных молекулярных кристаллов, из которых не всегда удается извлечь ясную структуру спиральной нанотрубки [5]. В этом случае, аналогично другим тубулярным структурам дипептидов, можно построить модельную нанотрубку из молекул дипептидов в кольцевом слое, имеющей все свойства (высокую поляризацию, пьезоэлектрический эффект [1,2,8] и фотоэлектронные свойства [6,7] с уровнями энергии, дающими большие значения E_g), характерные для кольцевых PNT структур. И провести искусственную «спирализацию» данной структуры - построить спиральные структуры с шагом равным периоду данной молекулярно-кристаллической структуры по оси нанотрубки. Так устроены все спиральные FF PNT, имеющие по 6 дипептидов FF в слое, для PNT на основе лейцина по 4 дипептида LL. Как пример здесь также рассмотрена и PNT на основе изолейцина L-II PNT из 4 дипептидов в слое.

Проведенные расчеты на основе квантово-химических полуэмпирических методов PM3 в приближении ограниченного Хартри-Фока (RHF), показали, что в этом случае ширина запрещенной зоны E_g такой искусственно созданной спиральной PNT оказывается также заметно меньше E_g для модельной кольцевой нанотрубки L-II (Табл. 1). Аналогично здесь были построены кольцевые и спиральные PNT правой хиральности D для D-LL на базе дилейцина.

Таким образом, можно заключить, что спиральные структуры на основе дипептидов различных аминокислот будут иметь значения E_g меньше, чем их аналогичные кольцевые структуры. Можно предположить, что этот эффект имеет важное эволюционное значение для биомолекулярных структур, т. к. все они имеют спиралеобразные последовательности аминокислот/дипептидов. В процессах их самосборки энергетически выгоднее перейти от кольцевых структур к спиральным: это своеобразный топологический переход, к более устойчивой организации биомакромолекул [8]. Кроме того, важно отметить, что значения E_g оказываются по своим значениям в диапазоне спектральных характеристик, близких к солнечному ультрафиолету. Вероятно, это имеет и свое биологическое значение.

С практической точки зрения, этот диапазон оказывается в области солнечно-слепого ультрафиолета, связанного с поглощением солнечного света озоновыми слоями атмосферы. При отсутствии такого поглощения, в случае «озоновых дыр», излучение проходит сквозь атмосферу и его можно регистрировать с применением фотодетекторов на основе таких PNT [8]. Важно, что ширина E_g изменяется под влиянием электрического поля, что позволяет настраивать регистрируемый диапазон. Тут подходят полимерные сегнетоэлектрики и слои графена/дихалькогенодов [7,9]. Такие работы сейчас активно разворачиваются в мире.

1. Bystrov V., Coutinho J., Zelenovskiy P., et al. *Nanomaterials* 2020, 10 (10), 1999.

2. Bystrov V. *Computer Simulation Nanostructures: Bioferroelectric Amino Acids. Bioferroelectricity: Peptide nanotubes and thymine nucleobase.* LAP LAMBERT Academic Publishing, 2020. 137 pages.

3. Zelenovskiy P.S., Nuraeva A.S., et al. *Crystal Growth & Design* 2019, 19 (11), 6414–6421.

4. Gorbitz C.H. *Nanotube formation by hydrophobic dipeptides.* Chem. Eur. J., 2001, 7, 5153.

5. Gorbitz C.H. Hydrophobic dipeptides: The final piece in the puzzle. *Acta Cryst.* 2018, B74, 311–318.
6. Bystrov V. S. Photo-Ferroelectricity in di-phenylalanine peptide nanotube. *Comput. Cond. Matter* 2018, 14, 94-100.
7. Быстров В.С., Парамонова Е.В., и др. Доклады Межд. конф. “Матем. Биол. Биоинф.”. Под ред. В.Д. Лахно. Том 9. Пушино: ИМПБ РАН, 2022. Статья № e18. Doi:10.17537/icmbb22.24.
8. V. S. Bystrov, P. S. Zelenovskiy, et al. *Math. Biol. & Bioinf.*, 2019, 14 (1), 94-124. doi: 10.17537/2019.14
9. Xudong Wang, et al. *Adv. Mater.* 2015. 27, 6575–6581.

Характеристика комплекса Na,K-АТФазы и Src-киназы и его роль в патогенезе болезни Альцгеймера

Стрелкова М.А.^{1*}, Толстова А.П.¹, Аджубей А.А.^{1,2}, Барыкин Е.П.¹, Тверской А.М.¹, Петровская А.В.¹,
Леонова О.Г.¹, Анашкина А.А.¹, Богданова А.Ю.³, Макаров А.А.¹, Митькевич В.А.¹, Петрушанко И.Ю.¹

¹Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН;

²Медицинская школа Вашингтонского университета;

³Цюрихский университет;

maria7873878@gmail.com

Болезнь Альцгеймера (БА) на данный момент является самым распространенным нейродегенеративным заболеванием в мире, приводящим к постепенной потере памяти и полной утрате когнитивных функций пациентов. Существует несколько гипотез развития этого заболевания. Наиболее распространенной является амилоидная гипотеза, согласно которой нейродегенерация при БА вызвана накоплением в тканях мозга β -амилоида болезни Альцгеймера (А β). В организме здорового человека А β образуется в небольших количествах путем расщепления белка-предшественника амилоида (APP). Длина А β варьирует от 37 до 43 аминокислот и, предположительно, он необходим для регуляции синаптической активности, активации ряда сигнальных каскадов, защиты и восстановления мозга после инфекций и травм. Наблюдаемые в патогенезе БА нарушения метаболизма А β , в частности, наиболее нейротоксичного А β (1-42), могут быть вызваны такими факторами, как мутация в белке APP или дисрегуляция активности β -секретазы, участвующей в процессинге APP по амилоидогенному пути. При этом происходит накопление А β (1-42) и образование токсических олигомеров, а также агрегация амилоида во внеклеточной среде с образованием характерных для более поздних стадий БА сенильных бляшек.

Мономеры и олигомеры А β могут влиять на функционирование целого ряда ферментов в клетках. Одной из мишеней амилоида является фермент Na,K-АТФаза, создающий трансмембранный градиент Na⁺ и K⁺, необходимый для нормального функционирования нейронов [1]. Ингибирование Na,K-АТФазы β -амилоидом является одной из причин нарушения электрогенных свойств нейронов при БА. Кроме транспортной функции, известна рецепторная функция Na,K-АТФазы, включающая в себя ее участие в ряде сигнальных каскадов и, в частности, активацию Src-киназы.

Активность внутриклеточной Src-киназы преимущественно регулируется за счет двух ее модификаций: ингибирующего фосфорилирования по Y527 и активирующего аутофосфорилирования по Y416. Однако помимо этого Src способна образовывать комплекс с Na,K-АТФазой. В этом взаимодействии задействованы два домена Src-киназы: регуляторный SH2- и киназный домены [2]. Связывание киназного домена Src с Na,K-АТФазой препятствует ее аутофосфорилированию, однако при взаимодействии Na,K-АТФазы с лигандом, например, кардиотоническим стероидом убаином, киназный домен Src-киназы высвобождается, происходит ее аутофосфорилирование по Y416 и, следовательно, активация.

Нами было обнаружено, что в *in vitro* системе связывание А β (1-42) с Na,K-АТФазой вызывает аналогичный эффект активации Src-киназы [3]. Обратный пептид А β (42-1) таким действием не обладает, что свидетельствует о специфичности взаимодействия. Важно, что в отсутствие Na,K-АТФазы добавление А β (1-42) не влияет на уровень фосфорилирования Src-киназы по Y416. Эти данные, в совокупности с данными, полученными на клетках, свидетельствуют о том, что Na,K-АТФаза является рецептором к β -амилоиду, и вследствие их взаимодействия активируется Src [3]. Так как Src-киназа играет важную роль во множестве клеточных процессов, нарушенных в патогенезе БА и включающих в себя нейрогенез, регуляцию экспрессии и чувствительности ряда рецепторов, то ее патологическая активация вследствие повышенного уровня А β при БА может вносить вклад в патогенез болезни. Таким образом, нарушение взаимодействия Src-киназы и Na,K-АТФазы является перспективной мишенью для терапии БА. Для понимания функционирования комплекса Na,K-АТФазы с Src-киназой и создания подходов для поиска ингибиторов их взаимодействия необходимо охарактеризовать интерфейс взаимодействия Na,K-АТФазы и Src-киназы в различных состояниях.

С помощью метода микротермофореза нами была получена константа диссоциации нефосфорилированной Src-киназы с Na,K-АТФазой, составляющая $0.21 \pm 0.04 \mu\text{M}$ [3]. Также были оценены константы диссоциации для Src-киназы, фосфорилированной по Y416 и Y527, с Na,K-АТФазой.

Для того чтобы установить, с какими формами Src-киназы связана Na,K-АТФаза в клетке, нами была получена фракция Src-киназы из лизатов клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, коиммунопреципитированной с $\alpha 1$ -субъединицей Na,K-АТФазы, и проведено сравнение уровня фосфорилирования по Y416 и Y527 относительно общей фракции Src-киназы из лизатов клеток. Было установлено, что Src-киназа с ингибирующим фосфорилированием по Y527 в комплексе с Na,K-АТФазой не детектируется, в то время как Src-киназа с активирующим фосфорилированием детектируется, что особенно выражено при добавлении убаина.

Интерфейсы взаимодействия Na,K-АТФазы с Src-киназой были предсказаны с помощью докинга. В ходе моделирования данных комплексов были использованы существующие структуры нефосфорилированной и фосфорилированной по Y527 Src-киназ, которые не включают в себя неупорядоченный N-концевой домен SH4UD, до сих пор не поддающийся кристаллизации ввиду непостоянства его структуры. Однако существуют данные, свидетельствующие о том, что данный домен может играть роль в регуляции активности Src-киназы [4]. Поэтому нами были получены равновесные конформации полноразмерной структуры Src-киназы с N-концевым доменом SH4UD методом RENT MD и установлены интерфейсы взаимодействия полноразмерной Src с Na,K-АТФазой. Сравнение комплексов полноразмерной Src-киназы и Src-киназы без домена SH4UD с Na,K-АТФазой позволит оценить роль N-концевого домена SH4UD во взаимодействии Src с Na,K-АТФазой.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-30007).

Список литературы:

1. Irina Yu Petrushanko et al. Direct interaction of beta-amyloid with Na,K-ATPase as a putative regulator of the enzyme function // Scientific Reports. 2016. №6.
2. Boczek et al. Autophosphorylation activates c-Src kinase through global structural rearrangements // Journal of Biological Chemistry. 2019. №35.
3. Irina Yu Petrushanko et al. Na,K-ATPase Acts as a Beta-Amyloid Receptor Triggering Src Kinase Activation // Cells. 2022. №11.
4. Pérez et al. Lipid binding by the Unique and SH3 domains of c-Src suggests a new regulatory mechanism // Scientific Reports. 2013. №3.

Характеристика свойств гемоглобина при глутатионилировании и образовании нековалентного комплекса с глутатионом

Кулешова Ю.Д.^{1*}, Полуэктов Ю.М.¹, Калюжный Д.Н.¹, Зарипов П.И.¹, Макаров А.А.¹, Петрушанко И.Ю.¹

¹ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук;
julia_kul2000@mail.ru

Гемоглобин является мажорным белком эритроцитов, основная функция которого заключается в снабжении тканей кислородом. В зависимости от условий гемоглобин может подвергаться различным посттрансляционным модификациям. Одной из таких модификаций является глутатионилирование – присоединение трипептида глутатиона к тиоловой группе белка с образованием дисульфидной связи. Молекула гемоглобина содержит шесть остатков цистеина (β -Cys 112, β -Cys 93 и α -Cys 102). β -Cys 93 является основной мишенью для глутатионилирования. Глутатионилирование увеличивает сродство гемоглобина к кислороду [1], что может играть важную роль при адаптации эритроцитов к стрессовым условиям. Однако каким образом, глутатионилирование влияет на конформацию и свойства молекулы гемоглобина до настоящего времени не установлено. Кроме ковалентного связывания с гемоглобином внутриклеточный трипептид глутатион в восстановленной форме (GSH) способен образовывать нековалентный комплекс [2]. Как нами было показано, способность связывать GSH снижается при переходе от окси к дезоксиформе гемоглобина. Сродство оксиформы к GSH выше, и она способна связать четыре молекулы GSH, в то время как дезоксиформа только две [2]. Это приводит к росту уровня GSH в эритроцитах при значительной деоксигенации, что важно для адаптации клеток к гипоксии. Необходимо отметить, что образование нековалентного комплекса с GSH также приводит к возрастанию сродства к кислороду [2].

Для того, чтобы установить, как глутатионилирование и образование нековалентного комплекса с глутатионом влияют на свойства молекулы гемоглобина нами было охарактеризовано влияние данных факторов на изменение вторичной структуры гемоглобина, на гем и гемовое окружение, а также на окружение триптофанов. С этой целью были проанализированы спектры кругового дихроизма (КД) в ультрафиолетовой области и в полосе Core, а также спектры триптофановой флуоресценции.

Было установлено, что глутатионилирование гемоглобина не приводит к изменению КД в полосе Core, что свидетельствует об отсутствии изменений в геме и гемовом окружении белка. Спектр поглощения глутатионилированного гемоглобина также не изменяется. При этом методом кругового дихроизма при помощи программы CDNN [3] были выявлены изменения во вторичной структуре гемоглобина при глутатионилировании. В частности, глутатионилирование снижает процент альфа спиральности на 10 процентов. Это свидетельствует о том, что глутатионилирование делает вторичную структуру белка менее упорядоченной. Однако третичная структура белка не претерпевает значительных изменений. Так, температура плавления белка после глутатионилирования не меняется, то есть на термостабильность белка данная модификация не влияет. Глутатионилирование не влияет на спектр триптофановой флуоресценции, что демонстрирует отсутствие изменений в триптофановом окружении при глутатионилировании гемоглобина. Используя моделирование *in-silico*, мы обнаружили, что глутатионилирование β -Cys93 и β -112 пространственно не влияет на остатки Trp. Минимизация глутатионилированной структуры (по остаткам β -Cys93 и β -112) в силовом поле AMBER99 также не выявила каких-либо существенных изменений в позиционировании Trp.

При образовании нековалентного комплекса глутатиона с гемоглобином, напротив, во вторичной структуре белка не наблюдается значимых изменений, в то время как третичная структура меняется. Образование нековалентного комплекса приводит к сдвигу пика КД в полосе Core в более коротковолновую область, его амплитуда уменьшается и сам он уширяется. В спектре поглощения в полосе Core наблюдаются аналогичные изменения. Таким образом, мы можем говорить об изменениях в геме/гемовом окружении при образовании нековалентного комплекса.

Кроме того, образование нековалентного комплекса приводит к изменению спектра триптофановой флуоресценции – наблюдается увеличение амплитуды сигнала. Собственная флуоресценция гемоглобина обусловлена в основном присутствием остатков Trp в полипептидной цепи. Тетрамер гемоглобина содержит шесть остатков Trp, причем остаток β -Trp 37, расположенный на поверхности $\alpha 1\beta 2$, считается основным аминокислотным остатком, вносящим вклад в собственную флуоресценцию Hb [4]. Моделирование *in-silico* показало, что β -Trp37 расположен на поверхности внутренней полости молекулы гемоглобина и участвует во взаимодействии с GSH, два других остатка Trp расположены над поверхностью и не взаимодействуют с молекулами GSH. Полученные данные свидетельствуют о том, что при образовании нековалентного комплекса Hb с GSH происходят изменения в триптофановом окружении вблизи участка связывания GSH. Кроме того, об изменении третичной структуры белка свидетельствует также снижение температуры плавления гемоглобина. То есть термостабильность гемоглобина в комплексе с GSH стала ниже. Молекулярное моделирование (минимизация структуры в силовом поле AMBER99 после докинга GSH с гемоглобином) показало некоторые структурные изменения β -Trp37 и ближайших остатков, которые участвуют во взаимодействии с GSH. Также мы показали, что расположение остатков Trp не имеет существенных отличий для разных конформаций гемоглобина.

Таким образом, глутатионилирование несколько снижает альфа-спиральность гемоглобина, но практически не влияет на его третичную структуру, в то время как образование нековалентного комплекса не влияет на вторичную структуру белка, но изменяет окружение гема и окружение триптофанов, а также снижает термостабильность белка.

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

[1] Metere A. et al. Carbon monoxide signaling in human red blood cells: evidence for pentose phosphate pathway activation and protein deglutathionylation //Antioxidants & redox signaling. – 2014. – Т. 20. – №. 3. – С. 403-416.

[2] Fenk S. et al. Hemoglobin is an oxygen-dependent glutathione buffer adapting the intracellular reduced glutathione levels to oxygen availability //Redox Biology. – 2022. – Т. 58. – С. 102535.

[3] Böhm G., Muhr R., Jaenicke R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks //Protein Engineering, Design and Selection. – 1992. – Т. 5. – №. 3. – С. 191-195.

[4] Quds R. et al. Interaction of mancozeb with human hemoglobin: Spectroscopic, molecular docking and molecular dynamic simulation studies //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2022. – Т. 280. – С. 121503.

Характеристики гидратных оболочек ДНК в растворах, полученные на основе анализа их комплексной диэлектрической проницаемости в терагерцовой области

Пеньков Н.В.^{1*}

¹ИБК РАН - ФИЦ ПНЦБИ РАН;

nvpenkov@rambler.ru

Исследование гидратации ДНК ведётся давно с использованием множества экспериментальных и теоретических подходов. Их абсолютное большинство направлено на изучение гидратных структур, включающих 10-20 молекул воды (на нуклеотид) с сильно изменённой энергией. В этом диапазоне гидратных чисел реализуются фундаментальные переходы ДНК между конформациями В $\leftrightarrow$ А, В $\leftrightarrow$ З [1]. Даже если молекулы ДНК пребывают в нативном состоянии, при столь небольшой гидратации нельзя быть уверенным в «нативном» состоянии их гидратных оболочек, какими они являются в живой природе. Поэтому необходимо также изучать гидратацию ДНК в системах с большим содержанием воды, то есть в разбавленных водных растворах.

Одним из информативных методов исследования гидратации в растворах является диэлектрическая спектроскопия, позволяющая определять спектры комплексной диэлектрической проницаемости (КДП). Особой разновидностью диэлектрической спектроскопии является терагерцовая спектроскопия временного разрешения (THz-TDS). Терагерцовый диапазон лежит между гигагерцовой областью, где проявляется коллективная динамика молекул вещества, и инфракрасной областью, отражающей внутримолекулярные колебания небольших молекулярных групп. Терагерцовый диапазон по энергиям и частотам как раз соответствует межмолекулярной структуре и динамике воды, поэтому несёт богатую информацию о гидратации.

В настоящей работе предложен подход на основе THz-TDS для исследования гидратации ДНК, суть которого заключается в следующем. Измеряются спектры КДП раствора ДНК, чистого растворителя (аналогичный водный раствор без ДНК) и сухого образца ДНК в диапазоне 10-110 [см]⁻¹. Из спектров КДП раствора ДНК исключается диэлектрический вклад молекул ДНК с помощью разработанной нами модели эффективной среды для двухфазных диэлектриков с нитевидными включениями [2]. Это позволяет получить спектры КДП водной фазы раствора ДНК. Спектры КДП водной фазы раствора ДНК и растворителя подвергаются процедуре фитинга, согласно модельной КДП, учитывающей три основные, хорошо известные, области дисперсии воды в терагерцовом диапазоне:

$$\epsilon^* = (\Delta\epsilon_1 / (1 - i\omega\tau_1)) + (\Delta\epsilon_2 / (1 - i\omega\tau_2)) + A / (\omega_0^2 - \omega^2 - i\omega\gamma) + \epsilon_\infty + i\sigma_0 / (\epsilon_0 \omega), \quad (1)$$

где τ_1 и $\Delta\epsilon_1$ – время и амплитуда релаксации связанных молекул воды (Дебаевской релаксации); τ_2 и $\Delta\epsilon_2$ – время и амплитуда ориентационной релаксации свободных молекул воды; A , ω_0 , γ – амплитуда, резонансная частота и параметр затухания межмолекулярных продольных колебаний молекул воды, связанных водородными связями; ϵ_∞ – высокочастотная диэлектрическая проницаемость, σ_0 – проводимость в постоянном поле, ϵ_0 – диэлектрическая постоянная, ω – циклическая частота, i – мнимая единица. Рассчитанные на основе фитинга параметры водной фазы раствора ДНК и растворителя сравнивались друг с другом на предмет выявления отличий. Поскольку водная фаза раствора ДНК отличается от водной фазы растворителя наличием гидратных оболочек ДНК, то из сравнения значений их параметров можно извлекать информацию о гидратных оболочках. При этом все параметры обладают определённым физическим смыслом в терминах межмолекулярной структуры и динамики воды, установленным в теории диэлектрической спектроскопии.

Описанным способом анализировалась гидратация ДНК в трёх растворителях: вода, водные растворы 40 мМ MgCl₂ и 150 мМ KCl. Использовались растворы плазмидной ДНК pET-11с в кольцевой форме с концентрацией 25 мг/мл. Кольцевая форма предпочтительна (по сравнению с суперскрученной), поскольку у неё достигается максимальная площадь контакта поверхности ДНК с водой, что максимизирует наблюдаемые эффекты гидратации.

Для всех рассмотренных растворов ДНК обнаружены следующие статистически значимые отличия: уменьшение $\Delta\epsilon_1$, увеличение $\Delta\epsilon_2$ и A/ω_0^2 по сравнению с соответствующими растворителями. Уменьшение $\Delta\epsilon_1$ свидетельствует о наличии более сильно связанных молекул воды в гидратной оболочке. Как известно, такие молекулы расположены в первичной гидратной оболочке ДНК, главным образом, у фосфатов. Увеличение $\Delta\epsilon_2$ говорит об увеличении количества свободных молекул воды, по-видимому, в переходном слое между первичной гидратацией и невозмущённой водой. Увеличение A/ω_0^2 при отсутствии изменения ω_0 говорит о наличии области гидратации с увеличенным количеством водородных связей. Это, скорее всего, реализуется в желобках ДНК, поскольку там образуется значительное количество водородных связей с молекулами воды. В итоге, сделан вывод о наличии трёх различных по строению областей гидратации ДНК с указанными особенностями.

Наличие 40 мМ MgCl₂ в растворе практически не влияет на гидратацию, тогда как наличие 150 мМ KCl существенно её ослабляет, судя по всем обсуждаемым параметрам. Указанные эффекты не коррелируют с

ионной силой растворов, значит, являются ион-специфичными. Ионы Mg^{2+} , как известно, сильно связываются с фосфатными группами ДНК, что приводит к смене знака заряда этих групп с -1 на $+1$. Поэтому влияние Mg^{2+} на гидратацию ДНК по существу сводится к изменению ориентации молекул воды в слое первичной гидратации фосфатов и никак не должно влиять на остальную часть гидратной оболочки, что мы и видим по полученным результатам. Ионы K^{+} , напротив, не имеют сайтов сильного связывания с ДНК, значит, распределяются по всей гидратной оболочке. При этом K^{+} – ион с отрицательной гидратацией, то есть оказывает разрушающее действие на структуру воды. Это объясняет обнаруженное ослабление гидратации ДНК в растворе KCl. Описанное влияние ионов K^{+} с внутриклеточной концентрацией на гидратацию ДНК может иметь биологический смысл: это может быть одним из факторов влияния на функционирование ДНК через её гидратную оболочку.

Список литературы

1. Principles of nucleic acid structure: By W. Saenger. Springer-Verlag, New York. 1984.
2. N. Penkov, N. Penkova. Effective Medium Model Applied to Biopolymer Solutions. Appl. Spectrosc. (2021), 75(12): 1510-1515.

Экспериментальное детектирование конформационных переходов между формами ДНК: проблемы и перспективы

Зубова Е.А.¹, Ковалева Н.А.^{1*}, Стрельников И.А.¹

¹ФИЦ ХФ РАН;
natykov@gmail.com

Двойная спираль ДНК, в зависимости от условий, может иметь разную геометрическую форму. Из большого количества её конформаций, кроме В-формы, обычно наблюдаемой в физиологическом растворе, широко известны её А, С и Z формы, и менее известны D, Хугстинговская и Х формы. Однако неканонические формы ДНК играют важную биологическую роль. ДНК принимает эти формы (локально или целиком) в клетке, в критически важных комплексах с белками (например, с транскрипционными факторами или в нуклеосоме), и в лаборатории, в условиях низкой диэлектрической проницаемости, присутствия соли, низкой влажности или малого доступного объёма. В кристалле ДНК форму спирали (а также кристаллографическую ячейку) можно определить рентгеновскими методами. Сравнение Рамановских и ИК спектров от волокон разных форм ДНК позволило выделить линии-маркеры форм, отвечающие модам колебаний ДНК, изменяющим частоту при конформационном переходе. Эти маркеры позволяют отдельно оценить геометрию спирали и число дезоксирибоз и фосфатов в неканонических конформациях. Спектральные маркеры форм уже могут использоваться для определения конформации ДНК в растворе, в неупорядоченном геле и в клетке, в комплексе с белками. В упорядоченном геле формы ДНК можно различить методом линейного, а в неупорядоченном геле или растворе – кругового дихроизма. Спектроскопия магнитного резонанса ядер изотопа фосфора-31 позволяет определить количество фосфатов в неканонической ВП конформации с учётом зависимости от соседних оснований. Мы проводим обзор существующих экспериментальных методов различения форм молекулы ДНК и обсуждаем трудности и перспективы достоверного определения геометрии спирали, конформаций дезоксирибоз и фосфатов.

Работа была выполнена за счёт субсидии, выделенной ФИЦ ХФ РАН на выполнение государственного задания, тема FFZE-2022-0009 (регистрационный номер 122040500069-7). Расчеты проведены в Межведомственном Суперкомпьютерном Центре Российской Академии Наук.

Электрическая активность кардиомиоцитов крысы при стимуляции $\alpha 2$ - адренорецепторов на фоне блокады I_f токов

Кушцова А.М.^{1*}, Фасхутдинов Л.И.¹, Вахитов Л.И.¹, Зиятдинова Н.И.¹, Зефиоров Т.Л.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;
anuta0285@mail.ru

$\alpha 2$ -адренорецепторы ($\alpha 2$ -АР) в сердце млекопитающих выполняют функции модуляции регуляторных влияний. Активация $\alpha 2$ -АР ингибирует синтез циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) аденилатциклазой. I_f токи мембраны сердечной клетки модулируются уровнем цАМФ, симпатическим и парасимпатическим

отделами вегетативной нервной системы. Модуляция деятельности If токов через цАМФ имеет существенное значение в увеличении или уменьшении частоты сердцебиений отделами вегетативного отдела нервной системы. Показано, что активизация адренергических рецепторов приводит в действие If и этим увеличивает хронотропную функцию сердца с помощью β -адренорецепторного зависимого повышения уровня цАМФ. Поскольку HCN-каналы и α_2 -АР присутствуют в кардиомиоцитах, возможно If токи являются эффектором адренергической регуляции сердца и через данный тип рецепторов. Цель данного исследования изучение влияния стимуляции α_2 -адренорецепторов на фоне предварительной блокады If на электрическую активность кардиомиоцитов крыс.

Объект исследования - белые беспородные крысы 6-недельного возраста, на этапе начала пубертатного периода развития. Препарат правого предсердия готовили, сохраняя синусно-предсердный узел, затем размещали в ванночку эндокардиальным слоем вверх и закрепляли. Через ванночку проходил физиологический раствор Тироде. Регистрация потенциала действия проводилась с использованием стандартного метода внутриклеточной регистрации потенциала действия. Микроэлектроды, заполненные 3М раствором KCl и сопротивлением 30 МОм, закреплялись в холдер, и погружались в препарат. В качестве фармакологического препарата использовали блокатор токов, активируемых при гиперполяризации, ZD7288 в концентрациях 10^{-9} М и агонист альфа2-адренорецепторов клонидин гидрохлорид в концентрации 10^{-9} М. Исследовались такие параметры потенциала действия как длительность потенциала действия на уровне 20%, 50% и 90% реполяризации, амплитуда потенциала действия, длина цикла.

При перфузии клонидина гидрохлорида в концентрации 10^{-9} М на фоне действия ZD7288 (10^{-9} М) длительность потенциала действия на уровне 20% у 6-недельных крыс увеличивалось с $6,34 \pm 2,86$ до $8,2 \pm 3,14$ мс ($p \leq 0,05$). Исходное значение длительности потенциала действия на уровне 50% составляло $14 \pm 4,25$ мс. На 7 минуте после введения блокатора If наблюдалось увеличение данного параметра до $19,85 \pm 3,57$ мс ($p \leq 0,05$). После введения клонидина гидрохлорида на фоне блокады If наблюдалось достоверное увеличение длительности потенциала действия на уровне 50% до $22,13 \pm 4,6$ мс ($p \leq 0,05$). Клонидин гидрохлорид на фоне действия ZD7288 способствовал возрастанию длительности потенциала действия на уровне 90% с $30,45 \pm 6,54$ до $32,78 \pm 4,16$ мс ($p \leq 0,05$) к 7-й минуте эксперимента, до $32,54 \pm 4,66$ мс ($p \leq 0,05$) к 15-й минуте наблюдения. Общая длина цикла возрастала с $115,1 \pm 8,56$ до $128,51 \pm 8,19$ мс ($p \leq 0,01$), а частота генерации потенциала действия снижалась с $326,8 \pm 43,22$ до $319,16 \pm 54,33$ ед/мин ($p \leq 0,05$) к 7-ой минуте эксперимента.

Таким образом, стимуляция альфа2-адренорецепторов на фоне предварительной блокады токов, активируемых гиперполяризацией вызывала увеличение длительности потенциала действия предсердного миокарда за счет удлинения фазы реполяризации предсердных миоцитов крыс 6-ти недельного возраста.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00121, <https://rscf.ru/project/21-15-00121/>).

Биофизика клетки. Мембранные и транспортные процессы

Pulsing-активность митохондрий *Triticum aestivum* зависит от их подвижности: влияние холодовой акклимации

Абдрахимова Й.Р.^{1*}, Абдрахимов Ф.А.²

¹Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

²Казанский институт биохимии и биофизики РАН, Казань, Россия;
yoldez.abdrahimoa@kpfu.ru

Ключевые слова: *T. aestivum*, конфокальная лазерная микроскопия, митохондрии, пульсации трансмембранного потенциала ($\Delta\psi_m$), 'митофлеш' АФК, подвижность, холодовая адаптация

Митохондрии, как известно, осуществляют свою мультифункциональную роль в поддержании и регуляции клеточных процессов во многом благодаря уникальным свойствам внутренней мембраны, в первую очередь способностью генерировать высокий трансмембранный потенциал ($\Delta\psi_m$). Наряду с энергообеспечением, модуляция $\Delta\psi_m$ может быть задействована в системе клеточного сигналинга и проявляться в высокоамплитудных флуктуациях интенсивности флуоресценции специфических красителей, позволяющих детектировать изменения $\Delta\psi_m$ и генерации активных форм кислорода (АФК) на уровне индивидуальных органелл в режиме реального времени, как правило, в секундных диапазонах. Динамические феномены, названные пульсациями $\Delta\psi_m$ ('pulsing'), были обнаружены с помощью производных тетраметилпродамина (TMRM) еще в конце XX века [1], тогда как часто ассоциированные с ними «вспышки» ('mitoflashes') флуоресценции АФК-детектирующих систем - относительно недавно [2]. На данный момент природа динамических феноменов, в том числе триггерные механизмы, остаются во многом непонятыми.

В данной работе исследовали зависимость динамических событий от мобильности митохондрий; в качестве контрольных объектов исследований были использованы колеоптили этиолированных проростков озимой пшеницы (*T. aestivum* L., сорт Мироновская 808), выращенных при 23-25°C (3 сут)(контроль), часть которых подвергались холодовой акклимации (0-4°C, 5 сут)(опыт). Образцы срезов тканей окрашивали 0.5 μ M TMRM или совместно с 10 μ M DCFH2DA, просматривали в Zeiss LSM META 510 с последующим мультитрековым анализом в ImageJ (Fiji) с помощью программы TrackMate v6.0.1 [3]. Для количественной оценки параметров мобильности митохондрий (скорость, направление и топография транслокации, трансформация морфологии) использовали time-lapse серии фреймов (3 мин) области интересов (ROI) площадью 2000-3000 μ m² с временным разрешением 0.8 мс/пиксель (500 мс/фрейм).

Исходя из данных трекинг-анализа индивидуальных митохондрий контроля, органеллы были условно отнесены к 3 субпопуляциям по скорости и характеру движения - «бегущие», «бродячие» и «сидячие». Перемещение органелл за 3 мин мониторинга составило более 10 μ m у «бегущих», 1-10 μ m и менее 1 μ m - у «бродячих» и «сидячих», соответственно. «Сидячие» органеллы с минимальной подвижностью составляли практически половину от общего числа митохондрий в ROI и характеризовались более высокой pulsing-активностью (80% от общего числа событий) по сравнению с мобильными. Интересно отметить, что в момент пульсации скорости движения мобильных органелл резко снижались до уровня таковых «сидячей» субпопуляции. «Обездвиживание» митохондрий антицитоскелетным агентом латранкулин В (300 нм) также увеличивало pulsing-активность образцов. Факты усиления пульсирующей активности в момент остановки органелл позволяют предположить, что в субкортексе клеток могут существовать сайты реорганизации и/или модификации мембранных компонентов оболочки митохондрий, которые ведут к образованию временных поровых каналов, детектируемых по быстрому и обратимому характеру выброса из органелл TMRM вследствие транзитного падения $\Delta\psi_m$. Последнее часто, но не всегда, сопровождалось «вспышками» внутримитохондриального окисления DCFH2, связанного с генерацией АФК.

После длительной холодовой адаптации отмечали увеличение интенсивности флуоресценции TMRM почти в 2 раза, обусловленное $\Delta\psi_m$ -зависимым накоплением данного красителя на фоне снижения pulsing-активности и возрастания степени плеоморфности митохондрий. При этом сложные нерегулярные формы органелл характеризовались преимущественно амебоидным типом двигательного поведения, параметры динамичности которого пока трудно количественно оценить.

Заключили, что подавление pulsing-активности митохондрий при холодовой адаптации отражает уменьшение реактивности систем жизнеобеспечения клеток на действие возмущающих факторов, что может быть критичным для их выживаемости. Обнаруженная индукция пульсаций при остановке движения органелл при оптимальных температурных условиях, а также общее снижение количества событий при гипотермии

указывают скорее всего на системную, а не строго стохастическую, как постулируется в литературе, природу изучаемых динамических феноменов.

Список литературы

1. Loew L.M., Tuft R.A., Carrington W., et al.//Biophysical journal.1993.65(6),2396-2407.
2. Wang W., Fang H., Groom L., et al.//Cell.2008.134,279–290.
3. Tinevez J.-Y., Perry N., Schindelin J., et al.//Methods.2017.115,80–90.

α 1-адренорецепторы играют роль в электрической активности сердца крыс

Мансур Н.^{1*}, Зиятдинова Н.И.¹, Мосолов Л.Т.¹, Зефилов Т.Л.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;
nourm94@mail.ru

Адренорецепторы сыграли решающую роль в истории фармакологии. Они были важной частью работы, которая привела к присуждению Нобелевской премии по физиологии и медицине в 1988 и 1994 годах, и Нобелевской премии по химии в 2012 году. Эти премии подчеркнули роль адренорецепторов в нашем понимании того, как работают GPCR, и в эволюции рационального открытия лекарств. Почти повсеместная экспрессия адренорецепторов и их плеiotропные реакции привели к созданию успешных лекарств от множества болезней. Целью нашего исследования было изучение влияния агониста α 1-адренорецепторов метоксамина (10-7 М) на электрическую активность миокарда взрослых крыс.

Исследование проведено на взрослых крысах (n=7). Исследования проводились на микроэлектродной установке. Готовили препарат предсердного миокарда с сохраненным синусным узлом и спонтанной активностью. Препарат погружали в специальный резервуар «Тироде». Обработка результатов проводилась программой Elph 3.0. Проводили проверку выборки на нормальное распределение. Статистическая обработка проводилась с помощью парного t критерия Стьюдента. Влияние агониста α 1-адренорецепторов метоксамина исследовалось в концентрации 10-7М.

Метоксамин в концентрации 10-7М уменьшает площадь кривой пика, а также длительность потенциала действия на уровне 20% (дпд 20%), 50% (дпд 50%) и 90% (дпд 90%) реполяризации (p < 0,05), при этом длительность фазы деполяризации не изменяется. Так же не изменились значения амплитуды потенциала действия, мембранного потенциала и овершута. Метоксамин в концентрации 10-7 М у взрослых крыс вызывал увеличение частоты генерации потенциала действия.

Таким образом, установлено, что стимуляция α 1-адренорецепторов влияет на электрическую активность сердца взрослых крыс, изменяя продолжительность реполяризации. «Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030)».

Анализ участия протонов, ионов кальция и пероксида водорода в изменении содержания фитогормонов при распространении электрических сигналов

Кузнецова Д.В.^{1*}, Ладейнова М.М.¹, Печёрина А.А.¹, Воденев В.А.¹

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского;
kuznetsova.dar0@gmail.com

Для эффективного ответа на изменяющиеся факторы внешней среды у растений существует сложная система генерации и передачи стрессовых сигналов. Известно, что при действии повреждающего стимула происходит распространение такого электрического сигнала как переменный потенциал (ВП) и изменение содержания стрессовых фитогормонов. По данным литературы, генерация ВП связана со значительным изменением концентраций различных ионов, что может являться возможным индуктором изменения концентраций гормонов. Вероятное участие пероксида водорода (H₂O₂) в распространении ВП дает основу для предположения, что изменение концентрации H₂O₂ также играет роль в изменении содержания фитогормонов. Таким образом, целью работы явился анализ участия протонов, ионов кальция и пероксида водорода в изменении содержания фитогормонов при распространении электрических сигналов.

Исследования были выполнены на растениях пшеницы (*Triticum aestivum* L.) возрастом 15-19 дней. В качестве локального раздражителя для генерации ВП использовали постепенный нагрев кончика листа. Многоканальную макроэлектродную установку использовали для регистрации ВП. Исследование динамики

концентраций протонов, ионов кальция и пероксида водорода при распространении ВП проводили на установке поверхностного оптического имиджинга с использованием флуоресцентных зондов BCECF, AM, Fluo-4, AM, Ampliflu Red, соответственно. Для загрузки зондов в растения был применен метод вакуумной инфльтрации. Определение содержания фитогормонов производили в удаленном от зоны воздействия фрагменте листа с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии. При пробоподготовке фрагмент листа растирали в жидком азоте, затем проводили процедуру гомогенизации в экстрагирующем растворе (80% раствор метанола + 1% муравьиной кислоты, содержащий внутренние стандарты исследуемых веществ). Экстракцию проводили в два этапа по 15 минут, затем центрифугировали при 20040 g, надосадочную жидкость с помощью испарителя-концентратора упаривали в 2 раза. Ингибиторный анализ проводили с помощью метода вакуумной инфльтрации растений пшеницы раствором 5мМ Na₃VO₄ (ингибитор протонной помпы) или 5 мМ LaCl₃ (блокатор кальциевых каналов), для контрольной группы проводили вакуумную инфльтрацию раствором без добавления ингибиторов.

При действии постепенного нагрева наблюдается генерация и распространение ВП, а также изменение содержания фитогормонов в растениях пшеницы. Показано, что максимальная амплитуда изменения концентрации стрессовых фитогормонов, а именно жасмоновой кислоты (ЖК) наблюдается спустя 15 мин после действия стимула, а для абсцизовой кислоты (АБК) и салициловой кислоты (СК) характерны максимумы концентраций через 60 и 40 мин соответственно. При генерации ВП наблюдается временное закисление цитоплазмы. Ингибиторный анализ показал снижение амплитуды волны рН и амплитуды ВП при действии Na₃VO₄. Ингибирование протонного насоса оказывает влияние и на концентрации исследуемых фитогормонов: при действии Na₃VO₄ увеличивается содержание АБК и жасмонатов как при раздражении, так и в покое. Внутриклеточная концентрация Ca²⁺ временно повышается при генерации ВП. При проведении ингибиторного анализа также было показано, что при ингибировании кальциевых каналов происходит снижение амплитуды ВП, а также наблюдаются изменения в сдвигах концентраций фитогормонов, индуцированных действием на растение повреждающего стимула. При действии LaCl₃ происходит блокировка увеличения содержания жасмонатов во временной точке 15 мин и СК во временной точке 60 мин после действия повреждающего стимула.

При генерации ВП также наблюдается временное повышение концентрации H₂O₂. При искусственном добавлении H₂O₂ происходят изменения содержания фитогормонов: концентрация СК статистически значимо увеличивается при действии 5мМ H₂O₂, при увеличении концентрации H₂O₂ до 20 мМ эффект оказывается еще более выраженным по сравнению с контрольной группой. Изменение содержания производного ЖК, жасмонил-изолейцина, происходит при действии 10 мМ H₂O₂. Динамика концентрации фитогормонов при действии локального раздражителя сопоставима с динамикой содержания гормонов при искусственном добавлении 10 мМ H₂O₂: показано, что концентрации АБК и СК увеличиваются во временной точке 45 мин после добавления H₂O₂, а для жасмонатов характерен значительный рост концентрации в точке 15 мин.

Таким образом, ингибиторный анализ показал участие протонов и ионов кальция в изменении параметров ВП, а также в вызываемом ВП сдвиге концентраций исследуемых стрессовых фитогормонов при действии локального раздражителя, показано участие изменения концентрации пероксида водорода в изменении содержания фитогормонов, что свидетельствует о возможном наличии связи между электрическими сигналами, изменением концентрации пероксида водорода, и гормональными сигналами.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-14-00388).

Антиагрегационная и антиоксидантная эффективность наноконструкций с липоевой кислотой

Щелконогов В.А.^{1,2,3*}, Иншакова А.М.¹, Дарнотук Е.С.¹, Шипелова А.В.¹, Баранова О.А.^{2,3}, Чеканов А.В.^{2,3}, Казаринов К.Д.³, Шастина Н.С.¹, Соловьева Э.Ю.², Федин А.И.²

¹МИРЭА-Российский технологический университет (ИТХТ имени М.В. Ломоносова);

²ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И.

Пирогова Минздрава России. ;

³ФИРЭ им. В.А. Котельникова РАН;

vasiliy9999@yandex.ru

Абстракт

Были получены различные наноконструкции с липоевой кислотой (ЛК), с размером частиц от 20 до 300 нм, характеризующиеся её медленным высвобождением из наночастиц (НЧ) и высокой дисперсионной стабильностью при длительном хранении при комнатной температуре и при T + 4 °С. Было установлено, что

нанодисперсии (НД) с ЛК уменьшают в 1.5-2 раза активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) тромбоцитах (Тц), что свидетельствует об отсутствии их цитотоксичности. Было обнаружено, что наночастицы с ЛК снижают степень агрегации Тц на 45-75%, обусловленную арахидоновой кислотой и уменьшают концентрации активных форм кислорода (АФК) и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Ключевые слова: наноконструкции, липовая кислота, тромбоциты, арахидоновая кислота, перекисное окисление липидов, активные формы кислорода.

Цереброваскулярные заболевания являются наиболее распространенными формами патологии ЦНС с высоким показателем летальных исходов [1]. К основным патогенетическим механизмам развития инсульта относят: возникновение и прогрессирование окислительного стресса, нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостазов и др. [2]. Поэтому при комплексной терапии данной патологии необходимо применять препараты, проявляющие антиоксидантное и антиагрегантное действие. Одним из наиболее перспективных антиоксидантов является липовая кислота. Однако, она малорастворима в воде и, попадая в организм, быстро связывается с белками, биodeградирует, быстро выводится из организма что приводит к уменьшению терапевтического действия.

Целью работы является получение различных наноконструкций с ЛК для её солюбилизации в водных растворах, пролонгированного высвобождения, а также исследование их влияния на функциональную активность тромбоцитов.

В ходе работы были получены нанодисперсии с ЛК на основе фосфатидилхолина (ФХ), олигоглицерина (ОГ) и плурионика Ф68, в фосфатном буферном растворе (ФБР, pH 7.4, 0.15 мМ) с размером частиц от 20 до 350 нм. НЧ с ЛК на основе Ф68 и ОГ были гетерогенными и состояли из двух фракций НЧ: 20-70 нм (25±5%) и 110-310 нм (75±5%). Было показано, что НЧ с ЛК были дисперсионно стабильными при длительном хранении (>20 мес) при комнатной температуре и при T +4°C. Полученные наноконструкции были электронеутральными.

Методом крио-ПЭМ было обнаружено, что нанодисперсии с ЛК представляют неоднородную систему, состоящую из однослойных и мультислойных наноструктур в основном сферической формы частиц разного размера.

Затем изучали кинетику высвобождения ЛК из наноконструкций. Было показано, что из нанодисперсий за 24 ч высвободилось не более 50±5% ЛК. Данный процесс высвобождения ЛК из НЧ может обеспечить пролонгированное действие ЛК и длительное поддержание её терапевтической концентрации в крови.

На следующем этапе работы оценивали влияние наноконструкций с ЛК на активность ЛДГ в тромбоцитах, активированных с помощью арахидоновой кислоты (АК). В результате проведенных исследований было обнаружено, что нанодисперсии с липовой кислотой (1-4 мМ) в 1.5-2 раза снижают активность данного фермента, что свидетельствует об отсутствии их цитотоксичности.

Далее исследовали влияние наноконструкций с ЛК на агрегацию Тц, в плазме крови, выделенной из крови здоровых доноров. Агрегацию Тц индуцировали арахидоновой кислотой (АК) поскольку в результате её действия образуются различные метаболиты в т.ч. продукты ПОЛ и АФК. Было показано, что НД ЛК (1-4 мМ) на 45-85% уменьшают агрегацию Тц, обусловленную АК. Водорастворимые формы и НЧ без ЛК практически не оказывали влияния на агрегацию Тц. По-видимому, ЛК в наноконструкциях способна лучше проникать внутрь клеток за счет взаимодействия липидов с мембраной клеток или в результате рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Антиоксидантное действие НЧ ЛК оценивали по концентрации активных форм кислорода (АФК) и тиобарбитурат активных продуктов (ТБК-АП) в образцах обогащенной Тц плазмы инкубированных с АК. Добавление всех типов НЧ с ЛК к образцам плазмы крови приводило к значительному уменьшению количества АФК (в 2-5 раз) и ТБК-АП (5-20 раз). Наиболее эффективным антиоксидантным действием обладали все типы НД с ЛК при использовании максимальной концентрации ЛК. Предполагаемым механизмом антиагрегационного действия наноконструкций с ЛК можно считать ингибирование ею процесса иницирования продуктов перекисидации липидов и АФК с помощью АК.

Таким образом все типы нанодисперсий с липовой кислотой являются перспективными кандидатами для дальнейших исследований молекулярно-биологических механизмов *in vivo*.

Работа выполнена в рамках государственного задания № гос. Регистрации: 122051600109-5 (РНИМУ им. Н.И. Пирогова) и при поддержке Фонда развития теоретической физики и математики "Базис" (№ гранта 22-1-1-28-1).

Литература

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. // М.: "Медицина", 2001, 328 с.
2. Щелконогов В.А., Дарнотук Е.С., Чеканов А.В., Баранова О.А. и др. Липосомальный препарат с карнозином и липовой кислотой: получение, антиоксидантные и антиагрегантные свойства. // Биофизика, 2021, Т. 66, № 39, С. 329-337.

Антиоксидантная активность экстрактов растительных материалов, используемых в традиционной китайской медицине

Паршина Е.Ю.^{1*}, Юсипович А.И.¹, Байжуманов А.А.¹

¹МГУ, биологический факультет;

parshinae@gmail.com

Основой большинства методов лечения, применяемых в традиционной китайской медицине (ТКМ), является фитотерапия — лечение травами. Известно, что многие лекарственные растения, используемые в ТКМ, проявляют антиоксидантную активность [1]. Их обычно используют в виде супов, настоев или чаев. Ранее нами были изучены водные экстракты некоторых препаратов ТКМ [2] и было установлено, что экстракты *E. ulmoides*, *C. deserticola* и *C. officinalis* имеют самые высокие суммарные значения общей антиоксидантной активности среди других исследованных экстрактов. Препараты ТКМ также используются в виде спиртовых настоев и экстрактов, и терапевтическая эффективность водных и спиртовых экстрактов одних и тех же трав может различаться [3]. Кроме того, антиоксидантное действие компонентов экстрактов может проявляться по-разному в различных клеточных компартментах.

В связи с этим, в данной работе нами была изучена антиоксидантная активность в водной и липидной фазах спиртовых экстрактов девяти видов растительного сырья, используемого в традиционной китайской медицине: *Dendrobium officinale*, *Ganoderma lucidum*, *Gastrodia elata*, *Cornus officinalis*, *Eucommia ulmoides*, *Cistanche deserticola*, *Astragalus membranaceus*, *Panax quinquefolius* и *Codonopsis pilosula*.

Для идентификации активных веществ и функциональных групп в экстрактах использовали инфракрасную Фурье-спектроскопию с ослабленным полным отражением (ATR-FTIR). Общую антиоксидантную активность (ОАА) экстрактов в водной фазе определяли по образованию окрашенного комплекса восстановленного железа с 2,4,6-трипиридилтриазином. Для оценки способности экстрактов ингибировать перекисное окисление липидов в липосомах, индуцированное реакцией Фентона, определяли количество ТБК-активных продуктов. Суммарное содержание фенолов (ССФ) определяли по методике с использованием реактива Фолина-Чокальтеу.

По данным ATR-FTIR полисахариды и терпеноиды были обнаружены во всех исследованных образцах, фенольные соединения были идентифицированы во всех экстрактах, за исключением *G. lucidum*.

Экстракты *E. ulmoides*, *C. officinalis* и *C. deserticola* демонстрировали самые высокие значения ОАА. ОАА экстрактов хорошо коррелировала с ССФ ($r=0,817$, $p=0,011$), но не с количеством ТБК-активных продуктов. Максимальное влияние на перекисное окисление липидов оказывали экстракты *E. ulmoides*, *C. officinalis* и *G. lucidum*, несмотря на то, что экстракт *G. lucidum* имел самое низкое значение ОАА. Мы предполагаем, что в защите от перекисного окисления липидов основную роль играли вещества нефенольной природы, например терпеноиды, которые также присутствуют в исследованных экстрактах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Инновационного комитета науки и технологии города Шэньчжэнь, КНР (грант No 20200828172651001).

1. F. He, J. Chen, K. Dong, et al. "Multi-technical analysis on the antioxidative capacity and total phenol contents of 94 traditional Chinese dietary medicinal herbs," *Food Science & Nutrition*, vol. 6, no. 6, pp. 1358-1369, 2018.

2. A.A. Bayzhumanov, L. Mai, A.I. Yusipovich, and G.V. Maksimov. "Antioxidant Activity of Certain Aquatic Extracts Used in Traditional Chinese Medicine," *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, vol. 77, no. 1, pp. 13-17, 2022.

3. B. Ji-Yeong, L. Yoon Seok, H. Sun Young, et al. "A Comparison between Water and Ethanol Extracts of *Rumex acetosa* for Protective Effects on Gastric Ulcers in Mice," *Biomolecules & Therapeutics*, vol. 20, no. 4, pp. 425-430, 2012.

Астаксантин может принимать участие в процессах контроля качества митохондрий

Крестинина О.В.^{1*}, Крестинин Р.Р.¹, Бабурина Ю.Л.¹, Одиноква И.В.¹, Сотникова Л.Д.¹

¹ИТЭБ РАН;

ovkres@mail.ru

Одной из причин, из-за которой возникает нарушение мозгового кровообращения является заболевания сердца, в результате чего нарушается кровоток в артериях и уменьшается кровоснабжение мозга. Митохондриальные дисфункции участвуют в этиологии различных заболеваний, таких как нейродегенеративные и сердечно-сосудистые, диабет, различные формы заболеваний печени и скелетно-мышечной системы, сепсиса и психиатрических расстройств. Кроме того, митохондрии являются важными органеллами клетки, потому как они

являются основным источником АТФ, которая необходима для выживания клеток и для поддержания многих жизненно важных клеточных функций. Поскольку митохондрии участвуют в клеточной гибели, качество митохондрий должно хорошо контролироваться. Предполагается, что деление и слияние митохондрий могут служить важными механизмами контроля качества для сохранения митохондрий.

Астаксантин (АСТ) – кетокаротиноид подкласса ксантафилов, обладает сильной антиоксидантной способностью и может поглощать синглетный кислород и свободные радикалы. Известно, что АСТ значительно ослабляет митохондриальную дисфункцию, связанную с ишемическим повреждением миокарда, может снижать окислительный стресс и предотвращать развитие сердечно-сосудистых заболеваний.

В настоящем исследовании изучено влияние АСТ на функциональное состояние митохондрий мозга у крыс с сердечной недостаточностью и проанализировано участвует ли АСТ в контроле качества митохондрий. Для экспериментов крыс разделили на четыре группы (по четыре крысы в каждой группе). Первая группы крыс была контрольная, крысам второй группы вводили перорально АСТ (150 мг/кг, в оливковом масле) в течение 2 недель. Крысам 3 группы делали инъекцию изопротеренола (100 мг/кг, в 0.9% NaCl) дважды с интервалом 24 часа для индукции сердечной недостаточности. Изопротеренол (ИЗО) — неселективный агонист бета-адренорецепторов. Введение ИЗО представляет собой модель, имитирующую стресс-индуцированные повреждения в различных сердечных патологиях. Животные 1 и 3 групп получали равное количество оливкового масла. Крысам четвертой группы вводили АСТ (150 мг/кг) в течении двух недель. Через две недели крысам четвертой группы делали инъекцию ИЗО дважды с интервалом в 24 часа. С целью выявления нарушений работы сердца в присутствии ИЗО исследовали изменение содержания таких белков, как миоглобин, тропонин I и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Содержание всех исследуемых белков снижалось в митохондриях сердца, изолированных из 3 группы крыс, тогда как АСТ повышал уровень этих белков (группа 4). Гистологический анализ образцов левого желудочка сердца свидетельствует о том, что как в 3-й, так и в 4-й группе имеются признаки гипертрофии миокарда. Однако в образцах 4-й группы процесс был менее выражен и ограничивался субэпикардальной и срединной зоной, по сравнению с образцами из 3-й группы, где повреждения носили тотальный характер. Эти результаты показывают, что сердечная недостаточность была достигнута. АСТ отменял эффект ИЗО и уменьшал повреждение сердца.

Мы показали, что в условиях сердечной недостаточности (группа 3) дыхательный контроль митохондрий мозга крыс снижался по сравнению с контролем, тогда как АСТ (группа 4) увеличивал этот параметр до контрольного значения и функциональное состояние митохондрий улучшалось. Известно, что при разобщении окислительного фосфорилирования наблюдается изменение проницаемости митохондриальной мембраны. Поэтому на следующем этапе нашего исследования мы измерили набухание митохондрий в наших экспериментальных условиях. Инъекция ИЗО приводила к тому, что скорость набухания повышалась. При введении АСТ крысам с последующей инъекцией ИЗО скорость набухания снижалась.

Для оценки влияния АСТ на процессы контроля качества мы исследовали содержание маркерных белков, принимающих участие в слиянии и делении митохондрий. При введении ИЗО уровень Drp1, указывающего на деление митохондрий, снижался, тогда как уровень OPA1, отвечающего за слияние митохондрий, повышался. В митохондриях мозга, изолированных из крыс с сердечной недостаточностью, введение АСТ приводило к увеличению экспрессии Drp1 и снижению OPA1.

Митофагия относится к процессу селективного удаления клетками избыточных или поврежденных митохондрий посредством аутофагии, что играет важную роль в контроле качества митохондрий и выживании клеток. Если митохондрии повреждены, инициируются аутофагический клиренс. В настоящем исследовании мы заметили, что содержание маркеров аутофагии LC3A/B-I, II повышалось во фракции митохондрий мозга у крыс с сердечной недостаточностью, тогда как АСТ снижал уровень маркеров.

Недавно, в митохондриях сердца крыс нами был идентифицирован белок с молекулярной массой 30 кДа как прохибитин (РНВ). Существуют две изоформы РНВ, РНВ1 и РНВ2, которые представляют собой две высокоомологичные субъединицы эукариотического митохондриального комплекса прохибитинов. Было показано, что РНВ1 обладает кардиозащитным и противовоспалительным действием, которое частично связано с участием в поддержании окислительного фосфорилирования и контролем метаболизма. Аблиция РНВ2 приводит к сердечной митохондриальной дисфункции и играет важную роль в гомеостазе метаболизма жирных кислот в сердце. Следовательно, можно предположить, что прохибитины являются важными белками для нормальной работы сердца. Одной из функций РНВ в митохондриях является контроль качества митохондриальных белков. В настоящем исследовании мы показали, что содержание РНВ снижалось в митохондриях мозга, изолированных из 3 группы крыс (ИЗО инъекция), тогда как АСТ повышал уровень РНВ (группа 4).

Исходя из вышеизложенного можно предположить, что астаксантин улучшает функциональное состояние митохондрий мозга крыс с сердечной недостаточностью и может участвовать в контроле качества митохондрий.

Работа выполнена при поддержке Государственного задания № 075-01025-23-00

Атомно-силовая микроскопия эритроцитов при экспериментальном сахарном диабете и его коррекции 2,5-замещенными 6Н-1,3,4-тиадиазинами

Емельянов В.В.^{1*}, Леонтьев Д.В.¹, Ищенко А.В.¹, Сидорова Л.П.¹, Цейтлер Т.А.¹, Шадрин И.А.¹, Гетте И.Ф.², Данилова И.Г.^{2,1}

¹Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина;

²Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН;

v.v.emelianov@urfu.ru

Исследование морфологии эритроцитов при сахарном диабете (СД) в эксперименте и клинике выявляет изменение диаметра и появление клеток аномальной формы в кровотоке. Преимущество метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) заключается в том, что он позволяет получить сведения не только о морфологии клетки, но и о рельефе клеточной поверхности и ее механических свойствах [1, 2]. Выраженность морфологических изменений определяется накоплением структурных повреждений эритроцита в результате метаболических нарушений (гиперосмолярности, активации неферментативного гликирования белков мембраны и цитоскелета, накопления в мембране продуктов перекисного окисления липидов), связанных с гипергликемией [1,2,3]. Наши предыдущие исследования показали возможность коррекции метаболических нарушений при экспериментальном сахарном диабете синтетическими органическими соединениями ряда замещенных 6Н-1,3,4-тиадиазинов, сочетающих антигликирующую и антиоксидантную активность [4]. При поиске новых противодиабетических соединений следует учитывать не только их метаболические эффекты, но и способность корректировать биофизические параметры эритроцита, от которых зависит состояние микроциркуляции и эффективность оксигенации тканей, нарушенных при СД.

Цель работы: оценить морфологические и биофизические параметры эритроцитов периферической крови крыс при экспериментальном СД в условиях его коррекции замещенными 6Н-1,3,4-тиадиазинами.

Сахарный диабет у крыс моделировали путем внутрибрюшинного введения аллоксана в суммарной дозе 300 мг/кг массы тела, разделенной на 3 фракции. Животным опытных групп внутримышечно в дозе 40 мг/кг вводили разведенные в воде для инъекций синтетические соединения L-17 и LT-27 из класса замещенных 6Н-1,3,4-тиадиазинов, отличающихся природой заместителя в положениях 2- и 5- гетероцикла. Спустя 4 недели из периферической крови животных готовили мазки на подложке из свежесколотой слюды без применения фиксирующих реагентов. АСМ высушенных препаратов проводилась полуконтактным методом в воздушной среде на микроскопе «Интегра Максимус» (НТ-МДТ), кантилевером марки NSG03 при частоте колебаний 90 кГц. Оценивали морфологию эритроцитов (диаметр, высоту), количественное соотношение нормальных (дискоцитов) и аномальных (сфероцитов, стоматоцитов, эхиноцитов и др.) форм клеток, а также величину адгезии клеточной поверхности.

Эритроциты крыс с аллоксановым СД характеризовались, по сравнению с интактными животными, большими значениями среднего диаметра, соответственно, $9,75 \pm 0,20$ и $8,8 \pm 0,32$ мкм, $pSt < 0,05$, и высоты ($448,6 \pm 19,57$ и $377,5 \pm 26,33$ нм, $pSt < 0,05$), адгезия клеточной поверхности не претерпела статистически значимых изменений ($104,5 \pm 6,73$ и $90,6 \pm 19,01$ нН). Введение соединения L-17 приводило к уменьшению среднего диаметра эритроцитов статистически значимо ниже значений контрольных и интактных животных ($7,9 \pm 0,18$ мкм, $pSt < 0,05$), средняя высота клеток значимо не изменилась ($407,3 \pm 21,69$ нм), а адгезия возросла до $133,1 \pm 18,45$ нН, $pSt < 0,05$. На фоне применения соединения LT-27 средний диаметр эритроцитов также был статистически значимо ниже значений контрольных и интактных животных ($7,2 \pm 0,27$ мкм, $pSt < 0,05$), однако произошло увеличение средней высоты эритроцита до $472,4 \pm 35,27$ нм, $pSt < 0,05$, и снижение адгезии до $58,2 \pm 6,13$, $pSt < 0,05$, что свидетельствует об увеличении жесткости поверхности мембраны.

Развитие СД привело к снижению доли эритроцитов нормальной формы (дискоцитов) с 57% до 17%, $p\chi^2 < 0,001$, преобладающей формой клетки был сфероцит (42% против 20% у интактных животных, $p\chi^2 < 0,001$). Введение соединения L-17 приводило к увеличению пойкилоцитоза: дискоциты составили 13%, эхиноциты 29%, сфероциты 23%, стоматоциты 20%, прочие формы 15%, $p\chi^2 < 0,01$. При коррекции СД соединением LT-27 96% эритроцитов составили эхиноциты, $p\chi^2 < 0,001$.

Таким образом, проведенное исследование показало способность соединений ряда 2,5-замещенных 6Н-1,3,4-тиадиазинов изменять морфологические и биофизические параметры эритроцитов крыс при экспериментальном СД. Лучшей корректирующей способностью обладало соединение L-17.

Литература:

1. Loyola-Leyva A., Loyola-Rodríguez J.P., Terán-Figueroa Y., Camacho-Lopez S., González F.J., Barquera S. Application of atomic force microscopy to assess erythrocytes morphology in early stages of diabetes. A pilot study // Micron. 2021 Feb;141:102982. doi: 10.1016/j.micron.2020.102982.

2. S AlSalhi M., Devanesan S., E AlZahrani K., AlShebly M., Al-Qahtani F., Farhat K., Masilamani V. Impact of Diabetes Mellitus on Human Erythrocytes: Atomic Force Microscopy and Spectral Investigations // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2018 Oct 26;15(11):2368. doi: 10.3390/ijerph15112368.

3. Емельянов В.В., Леонтьев Д.В., Ищенко А.В., Булавинцева Т.С., Саватеева Е.А., Данилова И.Г. Атомно-силовая микроскопия эритроцитов и метаболические нарушения при экспериментальном сахарном диабете и его коррекции липоевой кислотой // Биофизика. – 2016. – Т.61, вып. 5. – С. 922 - 926.

4. Данилова И.Г., Емельянов В.В., Гетте И.Ф., Медведева С.Ю., Булавинцева Т.С., Сидорова Л.П., Черешнев В.А., Соколова К.В., Черешнева М.В. Цитокиновая регуляция регенераторных процессов в поджелудочной железе при аллоксановом сахарном диабете у крыс и его коррекции соединением ряда 1,3,4-тиадиазина и липоевой кислотой // Медицинская иммунология. - 2018. - Т. 20, № 1. - С. 35-44.

Бактериолитическое и анти-адгезивное действие *Limosilactobacillus fermentum* 3872 на метициллин-резистентные штаммы *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Мачулин А.М.^{1*}, Абрамов В.М.^{2,3}, Косарев И.В.^{2,3}, Карлышев А.К.⁴

¹*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН г. Пущино;*

²*Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор), Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ ВГНКИ);*

³*Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени Кулакова Минздрава России;*

⁴*Кингстонский университет;*

and.machul@gmail.com

Метициллин-резистентные штаммы *Staphylococcus aureus* (MRSA) являются патогенами с множественной лекарственной устойчивостью и одной из основных инфекций, циркулирующих внутри больниц и сельскохозяйственных ферм во всем мире. Некоторые клоны *S. aureus* способны приобретать устойчивость практически ко всем классам антимикробных агентов, которым они подвергаются. Эксперты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) включили MRSA в список патогенов, требующих срочного создания новых антибиотиков для лечения заболеваний, вызываемых этими патогенами. У людей и животных *S. aureus* является частью нормальной микробиоты, присутствующей в верхних дыхательных путях, а также на коже и слизистой оболочке кишечника. Согласно статистическим данным, 20% населения мира являются стойкими носителями *S. aureus*. Лечение антибиотиками нарушает нормальную микробиоту кишечника, что в свою очередь создает серьезные осложнения в усвоении макроорганизмом питательных веществ из рациона питания. Пробиотические бактерии эффективны для профилактики и терапии желудочно-кишечных инфекций как у человека, так и у животных. Создание новых пробиотиков для профилактики и лечения стафилококковых инфекций у человека и сельскохозяйственных животных является актуальным.

Целью работы явилось изучение бактериолитического и анти-адгезивного действия *Limosilactobacillus fermentum* 3872 (LF3872) на MRSA полирезистентные штаммы, выделенные у человека и животных. Ранее нами было проведено полногеномное секвенирование LF3872. В геноме LF3872 был обнаружен ген, кодирующий белок бактериоцин (BLF3872), который обладает бактериолитическими свойствами. Структура BLF3872 была смоделирована с помощью сервера AlphaFold. Полученная модель выявила двухдоменную структурную организацию BLF3872, аналогичную структуре белка морфогенеза 1 из фага *Bacillus phi29*. Было установлено, что N-концевой домен BLF3872 гомологичен лизоциму, гидролизующему β -1.4 гликозидную связь между N-ацетилмуравовой кислотой и N-ацетилглюкозамином гликозидной цепи пептидогликана *S. aureus*. С-концевой домен BLF3872 гомологичен металлоэндопептидазе, гидролизующей амидные связи между аминокислотными остатками коротких пептидов, соединяющих гликозидные цепи пептидогликана клеточной стенки *S. aureus*. Для экспериментальной проверки бактериолитических и анти-адгезивных действий LF3872 на метициллин-резистентные штаммы MRSA были использованы два полирезистентных штамма: штамм, выделенный из носоглотки человека и из ротоглотки поросят, которые резистентны к метициллину, оксациллину, амоксицилину, ампициллину, цефалоспину, цефамидину, ципрофлоксацину и налидиксовой кислоте. По данным электронной микроскопии клетки LF3872, продуцируемые BLF3872, разрушают пептидогликан клеточной стенки *S. aureus* и вызывает гибель патогена. Кроме того, совместное культивирование LF3872, снижает жизнеспособность полирезистентных штаммов MRSA на 6 порядков. Также выявлено, что LF3872 ингибируют адгезию полирезистентных штаммов MRSA на Caco-2 энтероцитах человека.

Полученные результаты исследований важны для создания новых эффективных препаратов против полирезистентных MRSA штаммов, циркулирующих у людей и животных.

Работа выполнена в рамках мегагранта «Создание средств профилактики социально-значимых инфекций продуктивных животных на основе современных методов нутригеномики» (Соглашение №075-15-2022-1124) по Пост. Правительства РФ от 09 апреля 2010 г. № 220.

Введение метильных групп в фенильные кольца предшественников стабилизированных трифенилфосфониевых илидов увеличивает индуцированный ими протонный транспорт через плоские бислойные липидные мембраны

Рокицкая Т.И.^{1*}, Кирсанов Р.С.¹, Котова Е.А.¹, Антоненко Ю.Н.¹

¹*НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова;*
rokitskaya@genebee.msu.ru

Недавно нами было показано, что предшественники стабилизированных фосфониевых илидов такие, как (децилоксикарбонилметил)трифенилфосфоний бромид (СМТРР-С10) и его аналоги с разной длиной алкила, переносят ионы водорода через искусственные липидные мембраны, а также мембраны митохондрий и хлоропластов [1]. Протонный транспорт осуществляется в результате циклического движения катионной и нейтральной (фосфорного илида) форм фосфониевого производного в липидных мембранах.

Известно, что константа скорости флип-флопа через липидные мембраны алкилтрифенилфосфония, являющегося катионом, значительно увеличивается при введении метильных групп в фенильные кольца [2]. Механизм действия протонофоров, являющихся слабыми кислотами, предполагает, что протонный транспорт линейно растёт с увеличением их коэффициента адсорбции [3]. Мы предположили, что введение метильных групп в фенильные кольца трифенилфосфония увеличит скорость проникновения катионной формы соединений, а уменьшение длины алкила на такое же количество метиленовых групп позволит сохранить липофильность соединений и коэффициент их адсорбции на поверхности мембраны. Нами были синтезированы и изучены на плоских бислойных липидных мембранах предшественники стабилизированных илидов трифенилфосфония с одной или двумя метильными группами в фенильных кольцах: (гептилоксикарбонилметил)три(п-толил)фосфоний бромид (СМТРР-С7) и (бутилоксикарбонилметил)три(3,5-диметилфенил)фосфоний бромид (СМТРР-diMe-C4).

При низком pH (pH=2.2) добавление фосфониевых солей к плоской бислойной липидной мембране (БЛМ), сформированной из дифитанилфосфатидилхолина, приводило к появлению релаксации тока через мембрану после скачкообразного прикладывания напряжения. Кинетика релаксации ускорялась с увеличением напряжения. Значения характерного времени релаксации при снятии напряжения были равны 2.3 ± 0.1 с, 8.2 ± 1.0 с и 31.4 ± 9.0 с для СМТРР-diMe-C4, СМТРР-С7 и СМТРР-С10, соответственно. При увеличении pH водного раствора кинетики релаксации тока ускорялись, стационарный ток через БЛМ увеличивался для всех соединений. Зависимость стационарного тока от pH имела колоколообразную форму с максимумом при pH=5.0 для СМТРР-С10, pH=7.0 для СМТРР-С7 и pH=8.0 для СМТРР-diMe-C4. Значения стационарного тока БЛМ при pH=8.0 значительно увеличивались с ростом числа метильных групп в фенильных кольцах. Для всех соединений ток через мембрану был обусловлен транспортом протонов, так как сдвиг вольт-амперной характеристики БЛМ при создании градиента концентрации протонов был близок к теоретическим значениям.

При формировании БЛМ из липида со сложнэфирными связями (дифитаноилфосфатидилхолина) стационарная проводимость мембраны, вызванная добавлением производных карбоксиметилтриарилфосфония, уменьшалась в десятки раз по сравнению с БЛМ из липида с простыми эфирными связями. Это объясняется замедлением транслокации через БЛМ липофильных катионов вследствие увеличения скачка дипольного потенциала мембраны. Последующее добавление липофильного аниона тетрафенилбората к БЛМ из дифитаноилфосфатидилхолина в концентрациях на два порядка ниже концентрации фосфониевых катионов приводило к значительному возрастанию стационарного протонного тока.

Наши данные подтверждают предположение о том, что стадия транслокации катионной формы соединений является лимитирующей в транспорте протонов через бислойные липидные мембраны. Увеличение константы скорости транслокации заряженной формы протонофоров приводит к увеличению потока протонов через мембраны.

[1] Kirsanov, R.S. et al. Ester-stabilized phosphorus ylides as protonophores on bilayer lipid membranes, mitochondria and chloroplasts. Bioelectrochemistry 2023, 150, 108369.

[2] Rokitskaya, T.I. et al. Effect of Methyl and Halogen Substituents on the Transmembrane Movement of Lipophilic Ions. Phys. Chem. Chem. Phys. 2019, 21, 23355-23363.

[3] McLaughlin, S. The Mechanism of Action of DNP on Phospholipid Bilayer Membranes. J. Membr. Biol. 1972, 9, 361-372.

Взаимодействие глицирризиновой кислоты и Е-белка коронавируса с модельными мембранами

Кононова П.А.^{1,2*}, Селютина О.Ю.¹, Поляков Н.Э.¹

¹*Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН;*

²*Новосибирский государственный университет;*

kononova_polina@bk.ru

Глицирризиновая кислота (ГК) является основным активным компонентом корня солодки (*Glycyrrhiza glabra*). Имеется много данных о противовирусной активности глицирризиновой кислоты, в том числе об активности в отношении SARS-коронавируса. Одним из возможных механизмов противовирусного действия считается предотвращение слияния оболочки вируса с плазматической мембраной клетки-хозяина. Ингибирование Е-белка снижает вирусную патогенность, что позволяет предположить, что Е-белок является потенциальной противовирусной мишенью. Роль Е-белка в функционировании и патогенезе коронавирусов в целом и SARS-CoV-2 в частности неясна. Проверялась гипотеза о направленном воздействии глицирризиновой кислоты на Е-белок коронавируса.

Взаимодействие ГК с липидными мембранами изучалось на модели липосом (DOPC, POPC, DPPC) и бицелл DMPC/DHPC. Используя разные методы ЯМР-спектроскопии (измерение времени T1 и T2 релаксации, NOESY), были получены доказательства того, что ГК встраивается в липидный бислой. Методом NOESY получено подтверждение наличия взаимодействия между ГК и трансмембранным доменом Е-белка SARS-CoV-2 (ETM) в водной среде. Встраивание ETM в бислой оценивали по изменению времен релаксации T1, которые связаны с изменением подвижности. Времена релаксации протонов и фосфора липидов уменьшались для бицелл с ETM, добавление ГК влияло на время релаксации фосфора и протонов терминальных CH₃-групп, но не затрагивало N⁺(CH₃)₃-группы. Для определения локализации ETM и молекул глицирризиновой кислоты в липидном бислое использовали ЯМР-спектроскопию с эффектом Оверхаузера (NOESY). Было получено прямое подтверждение, что и глицирризиновая кислота, и трансмембранный домен Е-белка встраиваются в липидный бислой. При этом времена релаксации для пептида существенно изменялись в присутствии ГК, что свидетельствует об опосредованном влиянии ГК на ETM.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № МК-1580.2021.1.3.

Взаимосвязь между структурно-механическими свойствами внеклеточного матрикса и его способностью к репопуляции опухолевыми клетками на примере децеллюляризованных органов

Поспелов А.Д.^{1*}, Кутова О.М.¹, Ефремов Ю.М.⁴, Некрасова А.А.⁴, Трушина Д.Б.³, Гефтер С.Д.¹, Черкасова Е.И.¹, Тимофеева Л.Б.^{1,2}, Звягин А.В.^{1,4,5}, Тимашёв П.С.⁴, Балалаева И.В.¹

¹*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия;*

²*Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия;*

³*Федеральный исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия;*

⁴*Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;*

⁵*Университет Маккуори, Сидней, Австралия;*

esol03163@gmail.com

Децеллюляризованные (ДЦЛ) органные матриксы являются перспективной платформой для создания моделей опухолей, альтернативной монослойным клеточным культурам и искусственным трехмерным скаффолдам. Способность нативного матрикса имитировать клеточное микроокружение позволяет изучать влияние физико-химических свойств матрикса на процессы инвазии, метастазирования и развития устойчивости опухоли к лекарственным препаратам, а также выявлять механизмы тканевой специфичности различных видов опухолей и взаимодействия опухоль-организм. Целью работы являлось изучение влияния биомеханических

параметров внеклеточного матрикса на морфологию и инвазивный потенциал различных клеточных линий рака молочной железы.

Нами разработан оригинальный протокол децеллюляризации органов мыши на основе дезоксихолата натрия, додецилсульфата натрия и Triton X-100. Чтобы проверить предположение о взаимосвязи между жесткостью/пористостью матрикса и его способностью к заселению опухолевыми клетками, была проведена рецеллюляризация ДЦЛ матриксов клетками рака молочной железы человека линий MDA-MB-231 и SKBR-3, которые распределялись внутри матрикса методом прямого вкола. Выбор этих линий обусловлен такими факторами, как разница в степени дифференцировки и инвазивном потенциале. Линия MDA-MB-231 относится к трижды-отрицательному типу рака молочной железы, характеризуется крайне низкой степенью дифференцировки, высоким инвазивным потенциалом и высокой пролиферативной активностью. Линия SKBR-3, в свою очередь, представляет собой высокодифференцированный рак, морфологически мало отличающийся от плоского эпителия, с низкой скоростью роста и низким инвазивным потенциалом.

Для анализа микроструктуры матрикса была использована сканирующая электронная микроскопия (Hitachi TM 4000Plus). При определении биомеханических свойств применяли макроиндентацию (Mach-1 TM v500csst) и наноиндентацию (Bioscope Resolve microscope). Для определения степени репопуляции был проведен стандартный гистоморфологический анализ и определение содержания ДНК.

Показано эффективное удаление клеток из органов мыши с использованием разработанного протокола с сохранением микроструктуры матриксов. Было определено, что матриксы значительно различаются по форме и размеру пор, толщине волокон и жесткости, что делает каждый орган уникальным с точки зрения возможностей взаимодействия клетки и матрикса. Значительная отрицательная корреляция и такая же сильная тенденция была обнаружена между плотностью матрикса, измеренной наноиндентированием, и степенью его репопуляции клетками MDA-MB-231 и SKBR-3 соответственно. В то же время не наблюдалось связи между степенью репопуляции и плотностью матрикса, измеренной макроиндентированием или пористостью. Это убедительно свидетельствует о том, что характеристики жесткости матрикса, проявляющиеся на уровне взаимодействия с отдельными клетками, являются критическими для адаптации клеток, в то время как жесткость и другие биомеханические свойства ткани в целом не имеют существенного значения. На основе этого можно предположить, что клеткам требуется определённый жёсткостный диапазон для оптимального роста, что приводит к возможности детерминирования потенциальных ниш для метастазирования. Исходя из вышесказанного, полученные данные в достаточной степени согласуются с опубликованной в литературе информацией и подтверждают возможную взаимосвязь между биомеханическими особенностями внеклеточного матрикса, и его влиянием на морфотип и инвазивный потенциал опухолевых клеток.

Работа выполнена в ходе выполнения проекта НЦМУ «Центр фотоники» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, договор № 075-15-2020-927, а также с использованием уникального научного оборудования Transgenebank.

Влияние γ -излучения на биохимический состав ядерных фракций

Минасбекян М.Л.^{1*}

¹Ереванский гос. университет;
minlia@ysu.am

Исследовано влияние различных доз γ -облучения на радиочувствительность семян мягкой пшеницы. Определены изменения биохимического состава ядерных фракций проростков облученных семян пшеницы под влиянием γ -излучения. Результаты исследований указывают на прямую зависимость изменений ядерных оболочек и растворимой ядерной фракции от дозы ионизирующего излучения. Обнаружены изменения содержания ДНК, РНК и белка в ядерной оболочке и растворимой ядерной фракции проростков облученных семян. Также было получено падение электроотрицательности изолированных ядер из проростков облученных семян в градиенте электростатического поля (дзетта-потенциал). Таким образом, под действием ионизирующего излучения получено изменение содержания ядерных фракций: изменение общего содержания белка и нуклеиновых кислот. Таким образом под воздействием ионизирующей радиации происходит разрушение ионогенных групп молекул, в результате чего изменяется электроподвижность ядер, а это в свою очередь влечет за собой нарушение функциональной активности ядра.

Влияние белков острой фазы воспаления, С-реактивного белка, сывороточного амилоида А, альфа-1-кислого гликопротеина, фибриногена и церулоплазмينا, на активность нейтрофилов периферической крови

Федорова Н.Д.^{1*}, Сумбатян Д.А.¹, Соколов А.В.², Филатов М.В.¹, Трашков А.П.¹, Варфоломеева Е.Ю.¹

¹НИЦ "Курчатовский институт" - ПИЯФ, Гатчина, Россия;

²ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины", Санкт-Петербург, Россия;

fedorova_nd@npfi.nrcki.ru

Нейтрофилы являются ведущими клетками системы врожденного иммунитета и основной популяцией лейкоцитов, отвечающих за первичную реакцию организма на различные инфекционные частицы. Последние уничтожаются нейтрофилами благодаря процессам фагоцитоза и каскада реакций, включающих реакцию респираторного взрыва (РРВ). В результате РРВ нейтрофилы продуцируют активные формы кислорода (АФК) и галогенов, мощные цитотоксические агенты, разрушающие частицы в фаголизосоме. Все перечисленные процессы требуют регуляции, поскольку чрезмерная активация нейтрофилов может привести к АФК-опосредованному повреждению тканей, окружающих очаг воспаления, а белки острой фазы воспаления (БОФ) претендуют на роль регуляторов воспаления. Ранее нами было показано участие церулоплазмينا в ингибировании РРВ нейтрофилов в образцах крови [1], а фибриноген, напротив увеличивал интенсивность РРВ [2]. Не для всех БОФ и особенно их комбинаций детально изучено влияние на функции нейтрофилов. В данной работе впервые исследовано влияние ряда БОФ, С-реактивного белка (СРБ), сывороточного амилоида А (САА), альфа-1-кислого гликопротеина (α1AGP) и фибриногена, на способность нейтрофилов периферической крови к РРВ с помощью проточной цитометрии с регистрацией продукции АФК в клетках в составе проб периферической крови [3]. Обнаружены достоверные изменения способности нейтрофилов к выработке АФК для ряда комбинаций изученных БОФ. Исследование взаимодействия церулоплазмينا и фибриногена с нейтрофилами периферической крови на конфокальном микроскопе выявило их мембранную локализацию. Представляется перспективным идентифицировать рецепторы для БОФ на мембране нейтрофилов, а также изучить влияние БОФ на биомеханические характеристики нейтрофилов периферической крови.

1. Varfolomeeva EY et al. Ceruloplasmin decreases respiratory burst reaction during pregnancy. 2016. Free Radic Res. Vol. 50(8), pp. 909-19.

2. Федорова Н.Д. и др. Вирусные инфекции влияют на функциональную активность нейтрофилов периферической крови. Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2021. 6(1). с. 115-123.

3. Filatov M., Varfolomeeva E., Ivanov E. Flow cytofluorometric detection of inflammatory processes by measuring respiratory burst reaction of peripheral blood neutrophils. Biochem. Mol. Med. 1995. 55(2):116-121.

Влияние гипоксии на сократительную активность гладких мышц легочной артерии крысы

Гусакова С.В.^{1*}, Гусакова В.С.¹, Смаглий Л.В.¹, Зайцева Т.Н.¹, Гушин Е.И.¹, Голованов Е.А.¹,

Тотумачева Э.В.¹

¹Сибирский государственный медицинский университет;

gusacova@yandex.ru

Изучали влияние гипоксии на сократительную активность гладкомышечных сегментов легочной артерии крысы в моделях изменения объема клеток. Измерение механического напряжения сосудистых сегментов проводили с использованием четырехканальной механографической установки Myobath II и аппаратно-программного обеспечения LAB-TRAX-4/16 (Германия). Изменение объема клеток получали помещением гладкомышечных сегментов в растворы с различной осмолярностью. Установлено, что сократительная активность гладкомышечных клеток легочной артерии, индуцированная действием гиперкалиевого раствора или фенилэфрином, угнетается при гипоксии в зависимости от времени инкубации в гипоксическом растворе. Рецептор-зависимая сократительная активность более чувствительна к гипоксическому воздействию, что подтверждается более сильным снижением амплитуды фенилэфрин-индуцированного сокращения при увеличении времени воздействия гипоксии, в отличие от сокращения, индуцированного гиперкалиевой деполяризацией мембраны. В условиях гипоксии происходит снижение сократительной активности гладкомышечных сегментов легочной артерии, индуцированной гипо- и изоосмотическими растворами, тогда как гиперосмотически-индуцированная сократительная активность гладкомышечных сегментов легочной

артерии не изменяется. Это может указывать на то, что более чувствительными к гипоксическому воздействию являются процессы, связанные с регуляцией процессов набухания гладкомышечных клеток и механизмами восстановления объема клеток после набухания. Тогда как сократительная активность, индуцированная сморщиванием клеток в гиперосмотической среде не чувствительна к снижению кислорода в растворе.

Влияние комбинированных магнитных полей на рост клеток линии NCTC clone L929

Трубицына Т.А.^{1*}

¹ИТЭБ РАН;

TTA-pro@yandex.ru

Целью данной работы является исследование комбинированных магнитных полей, настроенных на параметрический резонанс для ионов Ca^{2+} (Ca^{2+} -КМП), K^{+} (K^{+} -КМП) и Mg^{2+} (Mg^{2+} -КМП) на рост клеток линии фибробластов NCTC clone L929.

Было проведено несколько серий экспериментов по подбору оптимальных условий культивирования выбранных клеток. В течение экспериментов клетки линии NCTC clone L929 находились в термостатируемых камерах либо без поддержания 5% CO_2 , либо при его поддержании. Одна камера находилась в магнитном поле Земли (контрольная), вторая помещалась в катушечную пару Гельмгольца (в которой генерировалось, либо не генерировалось комбинированное магнитное поле).

Параметры полей: Ca^{2+} -КМП: BDC = 48,7 мкТл, BAC = 89,6 мкТл, $f = 37,2$ Гц; K^{+} -КМП: BDC = 48,7 мкТл, BAC = 89,6 мкТл, $f = 57,2$ Гц; Mg^{2+} -КМП: BDC = 48,7 мкТл, BAC = 89,6 мкТл, $f = 61,2$ Гц. Оценку динамики роста, морфологии и жизнеспособности клеток проводили каждые сутки методом флуоресцентного окрашивания и дальнейшей микроскопии.

Результаты первых серий экспериментов, по оценке условий культивирования клеток, показали, что кратковременное (2 часа) культивирование, без воздействия КМП, может проводиться без поддержания 5% CO_2 . В таких условиях динамика роста клеток совпадала в обеих камерах и не показывала значимых изменений в сравнении с контрольной группой, которая культивировалась в стандартных условиях CO_2 -инкубатора. Аналогичные результаты показало длительное (3 суток) культивирование без воздействия КМП и при поддержании 5% CO_2 . Оптимальной культуральной средой, для культивирования клеток в таких условиях, была определена ДМЕМ/F-12. Полученные результаты позволяют дальнейшее использование описанной установки для оценки влияния КМП на различные «физические» мишени субстратзависимых клеток.

Было показано, что длительное воздействие Ca^{2+} -КМП не изменяет нормальную морфологию и хорошую жизнеспособность, а также меняет скорость роста клеток линии NCTC clone L929, в сравнении с контрольной камерой находящейся в поле Земли и контрольной группой в CO_2 -инкубаторе.

Длительное воздействие K^{+} -КМП показало замедление роста, сохранение нормальной морфологии и хорошей жизнеспособности клеток линии NCTC clone L929, в сравнении с контрольной камерой находящейся в поле Земли и контрольной группой в CO_2 -инкубаторе.

При длительном воздействии Mg^{2+} -КМП сохранилась нормальная морфология, хорошая жизнеспособность и наблюдалось изменение скорости роста клеток линии NCTC clone L929, в сравнении с контрольной камерой находящейся в поле Земли и контрольной группой в CO_2 -инкубаторе. Однако эффект был ниже, чем при воздействии КМП, настроенного на параметрический резонанс для ионов Ca^{2+} либо K^{+} .

Полученные нами результаты показывают возможность влияния описанными полями на клетки человека, что будет использовано для дальнейшей разработки методов магнитотерапии.

Влияние липидного состава липидных капель на эффективность их безбелкового слияния

Сенчихин И.Н.¹, Уродкова Е.К.¹, Минкевич М.М.¹, Дениева З.Г.¹, Молотковский Р.Ю.^{1*}

¹ИФХЭ РАН;

rodion.molotkovskiy@gmail.com

Работа посвящена изучению слияния липидных капель (ЛК) — органелл, состоящих из ядра жирных кислот, таких как триолеин, окруженного монослоем фосфолипидов. Ввиду сравнительно простой реализации и универсальности воздействия липидного состава оболочек ЛК на эффективность их слияния направленное изменение липидного состава представляется удобным инструментом для перспективной терапии заболеваний, связанных с нарушением метаболизма.

В рамках работы изучалось безбелковое слияние липидных капель, приводящее к объединению их монослойных оболочек. Этот процесс требует преодоления энергетического барьера E , связанного с топологической перестройкой сливающихся липидных монослоев. Нами была произведена оценка энергетического барьера и исследовано влияние липидного состава на высоту этого барьера.

Изменение липидного состава моделировали как добавление диолеилфосфатидилэтаноламина (ДОФЭ) к мембране, состоящей из диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ). Высоту E вычисляли с помощью теории упругости липидных мембран и методов молекулярной динамики. Для этого нами было сделано обобщение теории бислойного слияния [1] на случай монослойного слияния. Кроме того, высоту E определяли экспериментально по данным динамического светорассеяния (ДРС) об эволюции среднего размера частиц ЛК при различных температурах. Системы для экспериментов готовили по методике [2,3], а E оценивали в рамках модели коагуляции, описанной в [4–6].

Сравнение теоретических и экспериментальных результатов указывает на общую тенденцию, соответствующую бислойному слиянию: увеличение доли ДОФЭ в составе мембраны приводит к понижению высоты барьера на слияние, что регистрируется как увеличение среднего размера липидных капель в эксперименте. Барьер на слияние липидных капель с оболочкой из чистого ДОФХ оказывается достаточно высоким (больше 30 kBT), чтобы обеспечить стабильность капель в системе. При этом данные молекулярной динамики свидетельствуют о том, что конечное состояние системы энергетически более устойчиво, чем в случае бислойного слияния.

Полученные результаты могут лечь в основу создания эффективных методик терапии и профилактики различных патологий, связанных с нарушением метаболизма, которые будут основаны на специфических диетах со строго определенным липидным составом липидных капель.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант №22-23-00551.

Литература

1. Leikin, S. L., Kozlov, M. M., Chernomordik, L. V., Markin, V. S., & Chizmadzhev, Y. A. (1987). Membrane fusion: overcoming of the hydration barrier and local restructuring. *Journal of theoretical biology*, 129(4), 411-425.
2. Wang, Y., Zhou, X. M., Ma, X., Du, Y., Zheng, L., & Liu, P. Construction of nanodroplet/adiposome and artificial lipid droplets. *ACS nano*. 2016. 10(3), 3312-3322.
3. Zhi, Z., Ma, X., Zhou, C., Mechler, A., Zhang, S., & Liu, P. Protocol for using artificial lipid droplets to study the binding affinity of lipid droplet-associated proteins. *STAR protocols*. 2022. 3(1), 101214.
4. Borwankar, R. P., Lobo, L. A., & Wasan, D. T. (1992). Emulsion stability—kinetics of flocculation and coalescence. *Colloids and surfaces*, 69(2-3), 135-146.
5. Pays, K., Giermanska-Kahn, J., Pouligny, B., Bibette, J., & Leal-Calderon, F. (2001). Coalescence in surfactant-stabilized double emulsions. *Langmuir*, 17(25), 7758-7769.
6. Simovic, S., & Prestidge, C. A. (2004). Nanoparticles of varying hydrophobicity at the emulsion droplet– water interface: adsorption and coalescence stability. *Langmuir*, 20(19), 8357-8365.

Влияние метоксамина на потенциал действия кардиомиоцитов новорожденных крыс

Мансур Н.^{1*}, Зиятдинова Н.И.¹, Зефирова А.Л.², Крылова А.В.¹, Зефирова Т.Л.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия ;

nourm94@mail.ru

Актуальность: $\alpha 1$ -адренорецепторы представляют собой семь трансмембранных доменных GPCR, участвующих в многочисленных физиологических функциях, контролируемых эндогенными катехоламинами, норадреналином и адреналином, и нацеленных на лекарственные средства, полезные в терапии. Три отдельных гена, продукты которых называются $\alpha 1A$ -, $\alpha 1B$ - и $\alpha 1D$ -адренорецепторами, кодируют эти рецепторы. Хотя существование множества $\alpha 1$ -адренорецепторов признано уже почти 25 лет, специфические функции, регулируемые каждым подтипом, все еще в значительной степени неизвестны. Целью данной работы было изучение роли метоксамина в регуляции электрической активности миокарда правого предсердия крыс в раннем постнатальном онтогенезе.

Материалы и методы: Исследование проводилось на белых крысах ($n = 7$). Мембранный потенциал (МР) и потенциал действия (ПД) в навязанном ритме регистрировали с помощью стеклянных микроэлектродов. Длительность навязываемого стимула (1 мс) и частота повторения (3 Гц). Анализировали фазы ПД: длительность деполяризации, длительность реполяризации на уровне 20%, 50%, 90% (ДПД 20, ДПД 50, ДПД 90). Статистическую значимость оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты: Метоксамин в концентрации 10-8 М удлинял фазу реполяризации потенциала действия рабочих кардиомиоцитов предсердий, в то время как продолжительность фазы деполяризации не изменялась. Метоксамин увеличивал ДПД20 на 57%, ДПД 50 на 54%, ДПД 90 на 41% ($P < 0,05$). Метоксамин не вызывал существенных изменений мембранного потенциала (МП). Кроме того, значения амплитуды потенциала действия и овершута не изменялись.

Выводы: Метоксамин вызывает изменения в характере электрической активности рабочего миокарда предсердий у новорожденных крыс за счет увеличения фазы реполяризации потенциала действия. «Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030)».

Влияние ресвератрола на структуру мембран митохондрий проростков гороха в присутствии ТНКЖ-тио

Неврова О.^{1*}, Герасимов Н.Ю.¹, Жигачева И.В.¹, Генерозова И.П.², Голощапов А.Н.¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН;

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН;

neova@mail.ru

При определенных условиях антиоксиданты способны выступать в качестве прооксидантов и в больших количествах оказывать токсичное действие на организм. Негативные действия антиоксидантов на клетку могут вызывать антиоксидантный стресс. Явление антиоксидантного стресса слабо изучено, в особенности, что касается растений. Вопрос о том, какие условия могут привести к антиоксидантному стрессу, остается открытым. Предполагается, что использование нескольких антиоксидантов вместе позволит нейтрализовать реактивность антиоксидантных радикалов.

В работе проведено исследование взаимодействия антиоксидантов - растительного полифенола ресвератрола и донора оксида азота, серанитрозильного комплекса железа с тиосульфатом $Na_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4]_2 \cdot 4H_2O$ (ТНКЖ-тио), и их совместного действия на митохондрии эпикотилей проростков гороха *in vitro*. Митохондрии выделяли из эпикотилей гороха методом дифференциального центрифугирования в калий-фосфатном буфере. Микровязкость липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых зондов. В качестве зондов использовали стабильные нитроксильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксипиперидин-1-оксил и 5,6 бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро-у-карболин-3-оксил.

Показано, что антиоксидантная активность ресвератрола, 10^{-6} М, частично компенсировала токсичное действие ТНКЖ-тио в большой концентрации, что, вероятнее всего, связано с проявлением прооксидантных свойств высоких концентраций донора оксида азота. Наблюдалось однонаправленное изменение микровязкости липидной и приобластной областей при воздействии ресвератрола в концентрациях 10^{-6} М и 10^{-8} М на

мембраны митохондрий, обработанные ТНКЖ-тио 10^{-8} М. Таким образом, присутствие ресвератрола вызывало антиоксидантный стресс и нарушение связей в системе регуляции пероксидного окисления липидов мембран. Действие ресвератрола в дозе $2 \cdot 10^{-5}$ М, носило двойственный характер и практически не влияло на структурное состояние мембран митохондрий.

Влияние стимуляции $\alpha 1$ -адренорецепторов на частоту генерации ПД кардиомиоцитов крыс разного возраста

Мансур Н.^{1*}, Зиятдинова Н.И.¹, Зверев А.А.², Билалова Г.А.¹, Зефиоров Т.Л.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

²Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма, Казань, Россия ;

nourm94@mail.ru

Актуальность: $\alpha 1$ -адренорецепторы (АР) представляют собой активируемые катехоламинами рецепторы, связанные с G-белком, которые экспрессируются в миокарде и сосудистой сети крыс и человека и играют важную роль в регуляции физиологии сердечно-сосудистой системы. Хотя $\alpha 1$ -АР менее распространены в сердце, чем $\beta 1$ -АР, активация сердечных $\alpha 1$ -АР приводит к важным биологическим процессам, таким как гипертрофия, положительная инотропия, ишемическое preconditioning и защита от гибели клеток. Целью данной работы было изучение роли агониста $\alpha 1$ -адренорецепторов метоксамина (10^{-8} М) в регуляции частоты генерации потенциала действия в сердце крыс в разном возрасте.

Материалы и методы: Исследование проводилось на новорожденных, 3- и 20-недельных белых крысах. Исследования проводились на микроэлектродной установке. Готовили препарат предсердного миокарда с сохраненным синусным узлом и спонтанной активностью. Препарат погружали в специальный резервуар, куда подавался термостатируемый рабочий раствор «Тироде» (в состав которого входит 7,54 г/л NaCl; 0,3 г/л KCl; 0,134 г/л; CaCl₂; 0,06 г/л MgSO₄; 0,14 г/л NaH₂PO₄; 1,68 г/л NaHCO₃; 0,9 г/л глюкозы), который концентрировался газовой смесью, состоящей из 95% кислорода и 5% углекислого газа ($37 \pm 1^\circ\text{C}$). Обработка результатов проводилась программой Elph 3.0. Проводили проверку выборки на нормальное распределение. Статистическая обработка проводилась с помощью парного t критерия Стьюдента. Влияние агониста $\alpha 1$ -адренорецепторов метоксамина исследовалось в концентрации 10^{-8} М.

Результаты: Метоксамин в концентрации 10^{-8} М у новорожденных животных вызывал увеличение частоты возникновения потенциала действия на 42% ($p < 0.05$), а у 3-недельных животных вызывал увеличение частоты спонтанной активности на 24% ($p < 0.05$). У 20-недельных животных вызывал увеличение частоты спонтанной активности на 10% ($p < 0.05$).

Выводы: результаты показали, что стимуляция $\alpha 1$ -адренорецепторов у новорожденных, 3- и 20-недельных крыс приводила к увеличению частоты генерации потенциала действия. Однако максимальный эффект был выражен новорожденных крыс, а минимальный эффект наблюдался у взрослых животных.

«Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Влияние структурных особенностей децеллюляризованных органных матриксов на пролиферацию и морфологию клеток аденокарциномы яичника человека SKOV-3

Гефтер С.Д.^{1*}, Пospelов А.Д.¹, Трушина Д.Б.^{2,3}, Балалаева И.В.¹

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

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова;

³Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН;
sofia.gieftier.00@mail.ru

Способность опухолевых клеток к метастазированию является одним из ключевых критериев злокачественности неоплазий. Важную роль при миграции опухолевых клеток играет внеклеточный матрикс, являющийся основным компонентом опухолевого микроокружения. Разнообразие молекулярного состава матрикса обеспечивает специфические структурные и биомеханические характеристики различных биологических тканей. Активное взаимодействие опухолевых клеток с таким микроокружением может

приводить к соответствующим адаптивным морфологическим и фенотипическим модификациям. Модель роста раковых клеток во внеклеточном матриксе позволяет симитировать многие характеристики опухолевого микроокружения. Для получения такой модели из биологических тканей удаляются исходно заселяющие их нормальные клетки (метод децеллюляризации). В дальнейшем полученные данной методикой децеллюляризованные (ДЦЛ) матриксы подвергаются заселению опухолевыми клетками (рецеллюляризации).

Целью работы являлось определение влияния структурных особенностей ДЦЛ матриксов биологических тканей мыши (легкого, печени, селезенки, почки и яичника) на морфологию и скорость пролиферации репопуляризованных опухолевых клеток аденокарциномы яичника человека линии SKOV-3.

Для получения ДЦЛ матриксов фрагменты органов выдерживались в растворах детергентов на основе фосфатного буфера (PBS; pH = 7,4) в следующей последовательности: 0,5% Triton X-100, 0,5% додецилсульфат натрия (SDS), 1% дезоксихолат натрия (SDC) и 0,075% SDS. Насыщение матриксов питательными веществами перед репопуляцией обеспечивалось выдержкой образцов в среде DMEM с добавлением 30% телячьей сыворотки.

Исследование особенностей структуры ДЦЛ матриксов проводилось с помощью электронного сканирующего микроскопа Hitachi TM 4000 Plus.

Рецеллюляризация клеток SKOV-3 в ДЦЛ матриксы проводилась при помощи инъекций клеточной суспензии в количестве 3×10^5 клеток на матрикс. Заселенность матриксов клетками и их морфология анализировались на седьмой день рецеллюляризации путем гистологического исследования с окрашиванием гематоксилином и эозином.

По результатам данной работы были получены ДЦЛ матриксы с различными физическими свойствами. Выявленными отличительными параметрами в их архитектонике были компактизация матриксных волокон и размер матриксных пор. ДЦЛ матриксы были успешно рецеллюляризованы опухолевыми клетками SKOV-3, при этом плотность их заселения и морфологические характеристики клеток в разных матриксах отличались, а также наблюдалась их орган-специфическая локализация в сохранившихся структурах ткани. Анализ полученных данных позволил выявить следующую корреляцию: псевдоэпителиальный низкоинвазивный морфотип клеток наблюдался при росте в матриксах с высоким уровнем компактизации волокон и небольшим размером матриксных пор ($\leq 5 \text{ мкм}^2$), что характерно для ДЦЛ матриксов тканей селезенки и яичника. Изменение морфотипа на высокоинвазивный мезенхимальный наблюдался у клеток, растущих в ДЦЛ матриксах с невысокой плотностью упаковки матриксных волокон и крупными порами ($10\text{-}30 \text{ мкм}^2$), что характерно для матриксов легких, печени и почек. В этих же органах наблюдалось наибольшее количество опухолевых клеток через неделю после рецеллюляризации. Таким образом, опухолевые клетки исследуемой линии при росте в матриксах с менее плотной структурой демонстрируют более высокие пролиферацию и инвазивный потенциал. Мы предполагаем, что такие особенности архитектоники внеклеточного матрикса, как большой размер пор и рыхлая упаковка матриксных волокон, могут рассматриваться как факторы, способствующие формированию вторичных опухолевых очагов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-10058) и Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2022-293).

Влияние хронического воздействия нано- и микродисперсного оксида кальция на морфологические физические и химические параметры эритроцитов

Землянова М.А.¹, Игнатова А.М.^{1*}, Степанков М.С.¹, Кольдибекова Ю.В.¹, Зайцева Н.В.¹

¹ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»;
iampstu@yandex.ru

Существует высокая вероятность регулярной экспозиции населения нано- и микроразмерными частицами СаО при употреблении продуктов, напитков и питьевой воды. Такое хроническое воздействие с достаточно высокой вероятностью приводит к изменению химических и физических параметров эритроцитов, что влияет на реологические свойства крови.

Цель работы. Определить как хроническое воздействие нано- и микроразмерного оксида кальция, поступающего из окружающей среды, влияет на морфологические, физические и химические параметры эритроцитов крови.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования была кровь половозрелых самок белых крыс линии Wistar. Экспериментальные животные были разделены на три группы по 12 особей в каждой. Животным группы опыта вводили суспензию нанодисперсного оксида кальция (10-70 нм). Животным группы сравнения в аналогичной дозе и способом вводили суспензию микродисперсного оксида кальция (100-250 нм). Животным

группы контроля вводили основу суспензии (дис. вода) без веществ в эквивалентном объёме. Схема эксперимента соответствовала определению кумуляции методом Лимма. В первые 4 дня ежедневно вводится доза равная 1/10 ЛД₅₀ (ЛД₅₀ - 2000 мг/кг), затем дозу повышали в 1,5 раза и вводили последующие 4 дня, при таком последовательном повышении дозы каждые 4 дня эксперимент был завершён на 20 день.

Физические и химические параметры эритроцитов определяли стандартизированными методами лабораторной диагностики, учитывали следующие параметры: количество эритроцитов в литре крови, концентрация гемоглобина, гематокрит, средний объём эритроцита, среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците и средняя концентрация гемоглобина в эритроцитарной массе.

Морфологический анализ эритроцитов проводили на изображениях гематологических мазков, окрашенных по методу Романовского–Гимзы, полученных на поляризационном микроскопе (Carl Zeiss, Германия Nikon Eclipse LV100NPOL). Учитывали следующие параметры формы эритроцитов: приведенный диаметр Ферет, коэффициент сферичности, соотношение сторон и коэффициент выпуклости. Обработка изображений проводилась с помощью расчетного блока, встроенного в универсальное программное обеспечение ImageJ. Статистическая обработка результатов была проведена методом однофакторного дисперсионного анализа.

Результаты и их обсуждение. Общая тенденция такова, что количество эритроцитов при воздействии как микро-, так и нанодисперсного оксида кальция, возрастает на 6%, а содержание гемоглобина в отдельном эритроците снижается на 4%, концентрация гемоглобина в крови при этом снижается на 8-9%.

Средний объём эритроцита снизился относительно контрольного показателя в группе сравнения и опыта на 3,8 и 4,7 фл, соответственно. Аналогичное явление обнаружено при оценке среднего содержания гемоглобина в отдельном эритроците, величина которого статистически значимо снижается в группе сравнения на 1,2 пг и в группе опыта на 1,7 пг относительно контроля.

При исследовании морфологии выявлено, что морфологические изменения эритроцитов при воздействии микроразмерного оксида кальция проявляются в сокращении диаметра на 0,5 мкм и показателя соотношения сторон на 0,03. При воздействии наноразмерных частиц статистически значимо отличаются все морфологические показатели: диаметр уменьшается относительно контрольной группы в 1,2 раза, а относительно группы сравнения в 1,1 раз, коэффициент сферичности увеличивается относительно контрольного показателя на величину 0,1, соотношение сторон – на величину 0,1, коэффициент выпуклости – на 0,01.

В совокупности анализ изменений физических, химических и морфологических характеристик позволил установить, что воздействие оксида кальция при многократном пероральном поступлении приводит к уменьшению размера эритроцитов и снижению их насыщенности гемоглобином. Морфологические изменения свидетельствуют о том, что при воздействии наноразмерных частиц оксида кальция эритроциты приобретают более сферическую форму, это указывает на преждевременное старение эритроцитов, сферическая форма старых эритроцитов препятствует их прохождению через внутриэндотелиальные синусы селезенки.

Вывод. При хроническом воздействии нано- и микроразмерного оксида кальция, поступающего из окружающей среды, уменьшается диаметр и изменяется форма эритроцитов крови, при этом уменьшается содержание гемоглобина как в отдельных эритроцитах, так и в эритроцитарной массе крови в целом, снижается гематокрит. Выявленные изменения могут приводить к нарушению газового обмена крови и отклонению её реологических свойств от нормальных показателей, в совокупности воздействие характеризуется, как преждевременное старение эритроцитов.

Восстановление работы ионных каналов в кардиомиоцитах человека после операций с кардиоплегическими растворами Нормакор и Кустодиол

Коваленко С.Г.^{1,2*}, Фролова Ш.Р.^{1,2}, Березовский А.В.¹, Агладзе К.И.^{1,2}

¹лаборатория экспериментальной и клеточной медицины МФТИ;

²лаборатория молекулярной и клеточной диагностики МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского;
sandaara.romanova@phystech.edu

Исследование направлено на установление закономерностей возникновения аритмий, возникающих после операций по коронарному шунтированию с использованием кардиоплегических растворов Кустодиол и Нормакор, на уровне потенциалзависимых ионных каналов.

Нормакор имеет преимущество перед Кустодиолом в том, что его используют при нормотермии.

Сравнивались электрофизиологические свойства быстрых натриевых каналов, кальциевых каналов L-типа и медленных калиевых каналов в кардиомиоцитах пациентов до и после операции по коронарному шунтированию. Цель исследования - сравнить восстановление ионных токов кардиомиоцитов после кардиopleгии Нормакором и Кустодиолом.

Первичные кардиомиоциты человека были выделены из биоптата правого предсердия с использованием оптимизированного протокола в нашей лаборатории (патент RU 2749986). Средний возраст пациентов составил 63 года. Все эксперименты проводились методом пэтч-кламп при физиологической температуре 37°C. Были изучены: ток быстрых натриевых каналов (INav), кальциевых каналов L-типа (ICa, L) и медленных калиевых каналов (IKs).

В первой части работы сравнивались токи в кардиомиоцитах человека из биоптата, иссеченного в следующие моменты (на примере Кустодиола): 1) забор биоптата перед введением кардиоплегического раствора в сердце – контрольная группа "перед операцией"; 2) забор биоптата после отмыва от кардиоплегического раствора. Отмыв от кардиopleгии осуществлялся двумя способами: либо в лабораторных условиях внешним отмывом в безкальциевом буфере, либо в операционной до восстановления сердечного ритма. Оказалось, что для поставленной задачи, где исследуется восстановление ионных каналов после операции, корректнее использовать биоптат, иссеченный после отмыва в операционной, так как в зависимости от качества отмыва наблюдается разная степень инактивации каналов.

Во второй части исследования мы сравнили два кардиоплегических раствора Кустодиол и Нормакор с точки зрения их влияния на восстановление ионных каналов кардиомиоцитов предсердий человека (INav, ICaL, IKs) после операции. Контрольная группа состояла из кардиомиоцитов из биоптата, иссеченного "до операции", а эффект кардиоплегического раствора наблюдался в биоптатах "после операции" с отмывом в операционной. Было обнаружено, что после отмыва Кустодиола быстрые натриевые каналы быстро восстанавливаются, однако токи IKs сохраняют инактивированное состояние на 30%. Для ICa, L, наблюдается уменьшение амплитуды в одинаковой степени как после операции с Нормакором, так и после Кустодиола. После отмыва Нормакора Na-каналы восстанавливаются хуже, чем после кустодиола, в то время как Ks-каналы после Нормакора восстанавливаются полностью.

Известно, что послеоперационные аритмии в большинстве случаев возникают в первые 48 часов и могут возникать в течение двух недель после операции, вероятнее всего, это происходит из-за подавления калиевых токов.

Дейтерированные полиненасыщенные жирные кислоты защищают липидные мембраны от фотодинамического повреждения

Фирсов А.М.^{1*}, Котова Е.А.¹, Фомич М.А.², Бекиш А.В.², Шарко О.Л.², Шманай В.В.², Антоненко Ю.Н.¹, Щепинов М.С.³

¹НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь;

³Retrotope, Inc., Los Altos, CA, USA;

firsov@belozersky.msu.ru

Перекисное окисление липидов (ПОЛ), индуцированное активными формами кислорода, играет ключевую роль в патогенезе многих заболеваний, в том числе, нейродегенеративных и сердечнососудистых болезней. ПОЛ может вызывать повреждения клеточных мембран как нарушая барьерную функцию липидного бислоя, так и модифицируя мембранные белки. Для защиты от ПОЛ в системах *in vivo* был предложен подход, основанный на использовании полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), содержащих атомы дейтерия вместо протонов в бис-аллильных положениях (D-ПНЖК) [1]. Ранее мы продемонстрировали выраженное подавление ПОЛ, инициированного комбинацией железа и аскорбата в липосомах, при наличии в мембране около 20% липидов с D-ПНЖК [2].

В настоящей работе мы изучили защитное действие D-ПНЖК в отношении фотодинамически индуцированного ПОЛ в модельных липидных мембранах с использованием освещения в присутствии трижды сульфированного фталоцианина алюминия (AlPcS3) в качестве фотосенсибилизатора. Для оценки изменений фотодинамического эффекта на липосомы при включении D-ПНЖК в структуру липидов мы измеряли: 1) вытекание сульфородамина В из липосом, детектируемое с помощью флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCS) как показатель нарушения целостности мембраны, 2) образование диеновых конъюгатов при ПОЛ в липосомальных мембранах, измеряемое по поглощению при 234 нм и 3) степень фотоинактивации ионных каналов, формируемых в плоской бислойной липидной мембране (БЛМ) пептидом грамицидином А. Освещение липосом, сформированных из липидов, не содержащих D-ПНЖК, уже после первой минуты вызывало резкое падение амплитуды автокорреляционной функции флуоресценции сульфородамина В, свидетельствующее о вытекании красителя, тогда как при включении в состав липосом 50% липидов с остатками D-ПНЖК освещение в течение одной минуты не приводило к вытеканию красителя. Следовательно, присутствие

в структуре липидов D-ПНЖК предотвращает нарушение целостности мембраны при фотодинамическом воздействии. Интересно, что накопление диеновых конъюгатов в ходе фотодинамически индуцированного ПОЛ снижается при меньшем содержании дейтерированных липидов в мембранах липосом по сравнению с опытами по вытеканию красителя [3].

В опытах на плоской БЛМ, не содержащей D-ПНЖК, после включения белого света в присутствии фотосенсибилизатора наблюдалось немедленное падение тока, индуцированного образованием в мембране каналов грамицидина А, что связано с окислением его триптофановых остатков. Присутствие в мембране 20% липида с D-ПНЖК приводило к появлению лаг-фазы в процессе фотоинактивации грамицидина А, при наличии же в мембране 50% липида с дейтерированной линолевой кислотой было обнаружено практически полное ингибирование фотоинактивации грамицидиновых каналов.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 21-14-00062).

1. Shchepinov M.S. Polyunsaturated fatty acid deuteration against neurodegeneration. Trends Pharmacol. Sci. 41 (2020) 236-248.

2. Firsov A.M., Fomich M.A., Bekish A.V., Sharko O.L., Kotova E.A., Saal H.J., Vidovic D., Shmanai V.V., Pratt D.A., Antonenko Y.N., Shchepinov M.S. Threshold protective effect of deuterated polyunsaturated fatty acids on peroxidation of lipid bilayers. FEBS J. 286 (2019) 2099-2117.

3. Firsov A.M., Franco M.S.F., Chistyakov D.V., Goriainov S.V., Sergeeva M.G., Kotova E.A., Fomich M.A., Bekish A.V., Sharko O.L., Shmanai V.V., Itri R., Baptista M.S., Antonenko Y.N., Shchepinov M.S. Deuterated polyunsaturated fatty acids inhibit photoirradiation-induced lipid peroxidation in lipid bilayers. J. Photochem. Photobiol. B: Biology 229 (2022) 112425

Динамика I_{вр} изолированного сердца крыс при блокаде токов, активируемых гиперполяризацией в модели острого экспериментального инфаркта миокарда

Купцова А.М.^{1*}, Бугров Р.К.¹, Мосолов Л.Т.¹, Зиятдинова Н.И.¹, Зефилов Т.Л.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

anuta0285@mail.ru

Ток, активируемый гиперполяризацией, присутствуя на мембране атипичных кардиомиоцитов, является основным инициатором диастолической деполяризации потенциалов действия в синоатриальном и атриовентрикулярном узлах, регулируя частоту сердечных сокращений. Некоторые сердечные дисфункции, в основном дисфункция синусового узла, фибрилляция предсердий, желудочковая тахикардия и атриовентрикулярная блокада, были связаны с измененной функцией HCN каналов, присутствующих на мембране рабочих кардиомиоцитов. А увеличение желудочкового HCN тока наблюдается при гипертрофии, ишемической кардиомиопатии и сердечной недостаточности.

Изучение влияния блокады I_f в изолированном сердце с экспериментальной моделью острого инфаркта миокарда является актуальным, перспективным направлением.

Целью данного исследования является изучение влияния блокады I_f на силу сокращения изолированного по Лангендорфу сердца крыс с экспериментальной моделью острого инфаркта миокарда.

Модель острого инфаркта миокарда воспроизводили путем наложения на левую нисходящую коронарную артерию лигатуры. Через 24 часа после лигирования коронарной артерии развивалась острая стадия инфаркта миокарда, подтверждаемая на электрокардиограмме наличием патологического зубца ST. В контрольной группе представлены здоровые животные. Динамику LVP (left-ventricular pressure, давление, развиваемое левым желудочком) изучали в экспериментах на изолированных сердцах крыс по методу Лангендорфа. Токи, активируемые гиперполяризацией блокировали препаратом ZD7288 в концентрациях 10⁻⁹ и 10⁻⁵ Моль (Sigma).

При добавлении в перфузируемый раствор блокатора I_f (10⁻⁹ Моль) в контрольной группе здоровых животных наблюдали увеличение давления, развиваемого миокардом левого желудочка на 13% (p<0.001), в группе с экспериментальной моделью острого инфаркта миокарда LVP увеличивалась на 12% (p<0.05). При добавлении в перфузируемый раствор ZD7288 (10⁻⁵ М) в группе здоровых животных давление, развиваемое левым желудочком, уменьшилось на 13% (p<0.001), а в группе с моделью острого инфаркта миокарда изучаемый показатель уменьшился на 29% (p<0.05).

Таким образом, блокада токов, активируемых гиперполяризацией оказывает разнонаправленный эффект на давление, развиваемое левым желудочком изолированного сердца здоровых крыс и с экспериментальной моделью инфаркта миокарда. Возможно, через 24 после лигирования левой коронарной артерии плотность и количество HCN каналов изменяется, влияя на инотропную функцию изолированного сердца крыс с экспериментальной моделью инфаркта миокарда.

Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Изменение активности митохондрий в присутствии перспективных лекарственных средств

Загрядская Ю.А.³, Ломакина Г.Ю.^{1,2}, Охрименко И.С.^{3*}

¹*Химический факультет, Кафедра химической энзимологии, Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*

²*Факультет Фундаментальные науки, МГТУ им. Н.Э. Баумана, Москва, Россия;*

³*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), МФТИ, Долгопрудный, Россия;
ivan.okhrimenko@phystech.edu*

Количество АТФ и скорость продукции АТФ митохондриями человека снижаются в присутствии пептида Аβ(1-42), который, как известно, вовлечён в патогенез болезни Альцгеймера. 1-я экспериментальная группа клеток линии нейробластомы человека SH-SY5Y культивировалась в течение 24 ч в присутствии 200 нМ пептида Аβ мономеризованного по стандартной методике (Jao, 1997; Džinić, 2018), 2-я группа клеток (контрольная) не содержала каких-либо добавок, 3-я группа содержала 0,1% ДМСО (это количество ДМСО добавляли к 1-й группе с Аβ), а 4-ая и 5-ая кроме Аβ содержала и D-пептиды взаимодействующие с различными формами Аβ и его предшественниками (Bocharov et al., 2021; Van Groen et al., 2008) одно из которых прошло вторую фазу клинических испытаний (Mathew, 2023). После культивирования клеток митохондрии выделяли по стандартной методике (Martin, 1998; Daum, 1982). К изолированным митохондриям добавляли субстраты комплексов I, II и IV и соответствующие ингибиторы комплексов OxPhos - в отдельных экспериментах, чтобы сфокусироваться на изучении изменения активности каждого комплекса, индуцированных Аβ и другими веществами. Непосредственно перед измерениями люминесценции к митохондриям добавляли АДФ и люциферазу с люциферинном (Lomakina, 2022). Для каждой экспериментальной группы строили график люминесценции (RLU) в зависимости от времени. Сравнивали максимальные значения первых производных левых частей полученных колоколообразных кривых (скорость продукции АТФ). Также сравнивали высоты пиков (соответствовали количеству произведённого митохондриями АТФ). Присутствие ДМСО приводило к незначительному снижению количества и скорости продукции АТФ митохондриями человека по сравнению с контрольной группой. Культивирование клеток с Аβ приводит к уменьшению синтеза АТФ митохондриями и к падению скорости синтеза вдвое, когда как присутствие D-пептидов восстанавливает эти показатели до контрольных значений. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-03-2023-106 от 13.01.2023, номер темы FSMG-2021-0002).

Изменение параметров метаболизма в клетках с множественными мутациями мтДНК, ассоциированными с заболеваниями

Винокуров А.Ю.^{1*}, Попов Д.Ю.¹, Погонялова М.Ю.¹, Шитикова Е.Ю.¹, Казаков М.С.¹, Кузнецова Е.А.¹

¹*Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева;
tolmach_88@mail.ru*

Митохондрии (МХ) играют ключевую роль в развитии большинства внутриклеточных процессов. Генетическая регуляция функционирования МХ определяется как ядерной ДНК (ядДНК), так и митохондриальной ДНК (мтДНК), которая содержит гены 12S и 16S рРНК, тРНК, а также отдельных полипептидов электронтранспортной цепи (ЭТЦ) МХ. В сравнении с яДНК для мтДНК характерен существенно более высокий уровень возникновения мутаций [1,2]. По разным оценкам, частота поражений заболеваниями, которые связаны с мутациями мтДНК составляет около одного случая на 4000-5000 человек [3]. Ввиду наличия в клетке большого количества молекул мтДНК (может достигать нескольких тысяч), симптомы ассоциированных с мутациями патологий, проявляются при уровне гетероплазмы 60-90 % [4, 5]. Однако необходимо отметить, что эти данные получены в результате исследований с содержанием ограниченного (обычно, одна-две) числа мутаций мтДНК в клетке. В то время как ввиду высокой частоты повреждений мтДНК нередки случаи существенно более высокого уровня мутационной нагрузки. И в этом случае возможны различные эффекты взаимодействия, приводящие к изменению фенотипа клеток при существенно более низком уровне гетероплазмы. Молекулярные механизмы проявления мутаций мтДНК изучены в недостаточной степени. Характер изменения синтеза АТФ, митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\psi_m$), содержания и активности белков ЭТЦ, продукции АФК в различных работах отличается как качественно, так и количественно

(даже при рассмотрении одних и тех же мутаций), что, вероятно, обусловлено как значениями гетероплазмы, так и сочетанием мутаций [6-9]. Таким образом, развитие исследований, целью которых является анализ связи между сложными сочетаниями мутаций мтДНК и проявляющимися на различных уровнях фенотипическими изменениями, является весьма актуальным.

Для достижения этой цели нами используются линии созданных на базе клеток ТНР-1 цибридов и имеющих 5-8 мутаций мтДНК в генах МТ-RNR1, МТ-TL1, МТ-TL2, МТ-СУТВ, МТ-ND1, МТ-ND2, МТ-ND5 и МТ-ND6 с уровнем гетероплазмы от 1% до 68%. На данном этапе выполненные исследования включают анализ набора характеризующих биоэнергетику клеток параметров (уровень и механизм формирования $\Delta\Psi_m$; митохондриальное содержание, соотношение восстановленной и окисленной форм, а также скорость продукции НАДН и ФАДН₂; содержание и скорость потребления АТФ; дыхание клеток; образование АФК; уровень митофагии).

Полученные результаты позволяют сегодня говорить о значительном влиянии исследуемых мутаций на клеточный метаболизм даже несмотря на существенно более низкие в сравнении с указанными для случая присутствия единичных мутаций уровнями гетероплазмы. В частности, мутации генов тРНК_{Лей} оказываются значимыми уже при 20%-ном содержании при одновременном присутствии в клетке мутаций цитохрома b (m.14846G>A) или субъединиц комплекса I ЭТЦ (m.5178C>A, m.14459G>A). Для всех линий характерно значительное снижение уровня АТФ при отсутствии положительной корреляции данного параметра с временем полного истощения макроэрга при блокировании путей его биосинтеза. Это свидетельствует о различных причинах дефицита энергии – от нарушений образования АТФ до гиперактивации активно потребляющих его процессов. Представленные в цибридах сочетания мутаций ассоциированы со значительным уровнем разобщения окислительного фосфорилирования, которое может быть способ снижения негативных последствий гиперпродукции АФК как в матрикс МХ, так и межмембранное пространство при дисфункции участников ЭТЦ. Связанные с мутациями генов отдельных белков, а также генов тРНК нарушения работы комплекса I далеко не во всех линиях компенсируются увеличением уровня экспрессии или активности кодируемой яДНК сукцинатдегидрогеназы, что говорит об ограниченности применения субстратов комплекса II как инструмента защиты клеток при наличии мутаций мтДНК. Ряд цибридов характеризуется инверсным режимом функционирования комплекса V ЭТЦ, который позволяет поддерживать уровень $\Delta\Psi_m$ за счет расходования при этом АТФ. Несмотря на выявленные нарушения, некоторые линии цибридов характеризуются дефектной митофагией, приводящей к накоплению нефункциональных органелл. В ряде случаев сочетания мутаций могут приводить к улучшению характеризующих состояние клеток параметров, что наблюдается, в частности, при наличии мутаций m.13513G>A и m.1555A>G в генах МТ-ND1 и МТ-RNR1 соответственно.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда N 22-15-00317.

1. Kim H.R. et al. Mitochondrial DNA aberrations and pathophysiological implications in hematopoietic diseases, chronic inflammatory diseases, and cancers // *Ann. Lab. Med.* 2015. 35:1–14.
2. Kazak L. et al. Minimizing the damage: Repair pathways keep mitochondrial DNA intact // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. 13:659–671.
3. Gorman G.S. et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease // *Ann. Neurol.* 2015. 77:753–759.
4. Haig D. Intracellular evolution of mitochondrial DNA (mtDNA) and the tragedy of the cytoplasmic commons // *Bioessays.* 2016. 38:549–555
5. Yoneda M. et al. Heteroplasmic mitochondrial tRNA(Lys) mutation and its complementation in MERRF patient-derived mitochondrial transformants // *Muscle Nerve Suppl.* 1995. 3:95–101.
6. Lee S.R. et al. Mitochondrial DNA, mitochondrial dysfunction, and cardiac manifestations // *Front. Biosci.* 2017. 22:1177–1194.
7. von Kleist-Retzow J.C. et al. Impaired mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in respiratory chain-deficient cells but efficient compensation of energetic disadvantage by enhanced anaerobic glycolysis due to low ATP steady state levels // *Exp. Cell Res.* 2007. 313:3076–3089.
8. McKenzie M. et al. Mitochondrial ND5 gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial ATP consumption // *J. Biol. Chem.* 2007. 282:36845–36852.
9. James A.M. et al. Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations // *Eur. J. Biochem.* 1999. 259:462–469.

Изменения процессов эндоцитоза синаптических везикул в разных типах скелетных мышц мышей после опорной разгрузки

Тяпкина О.В.², Россомехин Р.А.^{1*}, Яковлева О.В.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

²Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский
центр «Казанский научный центр Российской академии наук»;
rossomakhin@inbox.ru

Функциональная разгрузка скелетных мышц (иммобилизация, постельный режим, космический полет) приводит к атрофии, механизмы которой хорошо изучены. Менее исследовано состояние мотонейронов, иннервирующих эти мышцы и запускающих процесс мышечного сокращения. Распространение потенциала действия по аксону мотонейрона обеспечивает передачу возбуждения с двигательного нервного окончания на постсинаптическую мембрану мышечного волокна посредством активации ацетилхолиновых рецепторов медиатором - ацетилхолином. Ранее было показано, что у крыс после антиортостатического вывешивания задних конечностей (модель опорной разгрузки по методу Морей-Холтон) изменяются уровни некантовой секреции ацетилхолина, а также кантовой вызванной и спонтанной. Интенсивность кантового освобождения медиатора может регулироваться как за счет экзо-, так и эндоцитоза. В настоящей работе был проведен анализ процессов эндоцитоза синаптических везикул в нервных окончаниях мышц разного функционального типа у мыши после 30 дней опорной разгрузки (антиортостатическое вывешивание задних конечностей (АОВ) по методу Морей-Холтон). Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах m. Diaphragma (смешанная мышца), m. Soleus (медленная мышца), m. EDL (m. extensor digitorum longus быстрая мышца) лабораторных белых мышей. Процессы эндоцитоза синаптических везикул исследовали с помощью флуоресцентного маркера FM 1-43 (3мкМ), который обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза синаптических везикул оказывается внутри нервной терминали («загрузка» терминали). Показателем эндоцитоза и загрузки флуоресцентного красителя в синаптические везикулы являлось появление ярко светящихся пятен внутри нервного окончания. Интенсивность и продолжительность стимуляции культи нервов зависела от типа мышцы: m. Diaphragma 50 имп/с в течение 1 минуты; m. Soleus – 1 имп/с 5 сек и 10 имп/с 10 сек, в течение 15 минут, m. EDL – 60 сек гиперкалиевым раствором Кребса. В контрольной группе мышей при высокочастотной стимуляции двигательного нерва диафрагмальной мышцы интенсивность свечения составила 87 ± 3 о.е. (n=14). В группе животных после АОВ интенсивность свечения терминалей составила 75 ± 5 о.е. (n=5, p<0,05). Аналогичные результаты были получены на других мышцах. Свечение терминалей камбаловидной мышцы составило 68 ± 7 о.е. (n=5, p>0,05), что достоверно ниже контрольных значений (74 ± 7 о.е., n=8). Свечение терминалей EDL составило 71 ± 7 о.е. n=5, p<0,05), что также ниже относительно контрольных значений (109 ± 3 о.е., n=7). Полученные данные могут указывать как на замедление процессов эндоцитоза синаптических везикул в нервных окончаниях мышц после опорной разгрузки, так и на морфологические изменения в нервной терминали (снижение количества синаптических везикул, дезорганизация цитоскелета).

Таким образом опорная разгрузка влияет на процессы эндоцитоза не только в скелетных мышцах, находящихся в состоянии функциональной разгрузки, но и в дыхательной мышце, что требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при поддержке госзадания ФИЦ КазНЦ РАН и КФУ.

Изменения электрических характеристик идентифицированных нейронов у виноградной улитки в результате выработки условного обстановочного рефлекса и реконсолидации памяти на этот рефлекс

Богодвид Т.Х.^{1,2*}, Муранова Л.Н.², Андрианов В.В.², Дерябина И.Б.², Шихаб А.В.², Гайнутдинов Х.Л.²

¹Поволжский университет физической культуры, спорта и туризма, Казань, Россия;

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань;
tat-gain@mail.ru

Множество экспериментальных данных показывает, что клеточные процессы, связанные с обучением, связаны с длительными модификациями эффективности синаптической передачи и изменениями эндогенных свойств нейрона и его мембраны [1,2,3]. Если длительное время основным механизмом обучения признавалось

изменение эффективности синаптической передачи, то позднее появились свидетельства несинаптических механизмов. В рамках таких представлений имеется достаточное количество исследований клеточных механизмов обучения [4,5]. Поэтому во многих работах были проведены исследования связи поведенческих результатов обучения с возбудимостью нейронов и их электрическими характеристиками мембраны [1,2,4,5]. Ранее нами были показаны мембранные корреляты (изменение мембранного и порогового потенциалов премоторных интернейронов) для условных оборонительных рефлексов постукивания по раковине и аверзии к пище [2,4,6]. Поэтому возник вопрос – возможны ли подобные изменения при выработке других видов условных рефлексов. Для этого мы исследовали возможность корреляции выработки условного обстановочного рефлекса [7], а также реконсолидации памяти на этот рефлекс, с динамикой изменений электрических характеристик премоторных интернейронов оборонительного поведения виноградной улитки LPa3 и RPa3, а также серотонинсодержащих нейронов Pd2 & Pd4 pedalного ганглия, которые модулируют данный рефлекс. Поэтому мы провели изучение изменения мембранного и порогового потенциалов командных нейронов ЛПа3 и ППа3 виноградной улитки после выработки условного оборонительного рефлекса на обстановку и реконсолидации памяти на этот рефлекс.

Эксперименты были проведены на моллюске *Helix lucorum*. У всех животных вырабатывали обстановочный условный рефлекс по контекстуальной парадигме «на шаре» в ситуации, когда животные были жестко закреплены за раковину. До начала выработки условного рефлекса и после обучения проводили тестирование уровня оборонительной реакции как показателя сформированной долговременной памяти. Тестирование поведенческих реакций проводили в двух средах (контекстах): 1) на шаре (т.е., в стандартных условиях обучения), 2) на плоской поверхности. У части улиток после выработки условного рефлекса на обстановку производили реконсолидацию долговременной памяти на обстановку [7]. Для исследования реконсолидации производили «напоминание» обстановки обучения. Результаты показали, что в нейронах LPa3 и RPa3 мембранный потенциал достоверно (около 5 мВ) снижается после обучения. Не было обнаружено его достоверных дальнейших изменений после напоминания (инициации реконсолидации относительно его уровня после обучения). Пороговый потенциал этих нейронов снижается после обучения и сохраняется далее неизменным после напоминания. В то же время после напоминания мембранный и пороговый потенциалы достоверно уменьшаются относительно исходного уровня (до обучения). То есть, эти нейроны могут участвовать в процессе реконсолидации обстановочного рефлекса.

Работа поддержана Программой стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

1. Балабан П.М., Т.А. Коршунова Сетевые, клеточные и молекулярные механизмы пластичности в простых нервных системах. Успехи физиол. наук, 2011, т. 42, №4, с. 3-19.

2. Гайнутдинов Х.Л. и др. Изменение возбудимости нейрональной мембраны как клеточный механизм обучения и памяти Успехи физиол. наук. 2011, т. 42, №1, с. 33-50.

3. Lisman J. et al., Memory formation depends on both synapse-specific modifications of synaptic strength and cell-specific increases in excitability, *Nat Neurosci.* 21 (3) (2018) 309–314. doi:10.1038/s41593-018-0076-6.

4. Gainutdinov Kh.L. et al., Excitability increase in withdrawal interneurons after conditioning in snail, *NeuroReport.* 9 (1998) 517-520.

5. Mozzachiodi R. et al., Changes in neuronal excitability serve as a mechanism of long-term memory for operant conditioning, *Nature Neurosci.* 11 (2008) 1146-1148.

6. Andrianov V.V, et al., 2015. Modulation of defensive reflex conditioning in snails by serotonin. *Front. Behav. Neurosci.* 9 279. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00279.

7. Deryabina I.B. et al., 2020. Effects of thryptophan hydroxylase blockade by p-chlorophenylalanine on contextual memory reconsolidation after training of different intensity, *Intern. J. Mol. Sci.* 21 2087. doi:10.3390/ijms21062087

Изучение влияния нового кардиопротекторного соединения нитроксисукцината 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридиния на ионные каналы кардиомиоцитов

Фролова Ш.Р.^{1,2*}, Коваленко С.Г.^{1,2}, Крамова В.К.¹, Мищенко Д.В.³, Агладзе К.И.^{1,2}

¹Московский физико-технический институт;

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

³Институт проблем химической физики Российской академии наук, Российская Федерация;

isheydi02@gmail.com

В настоящее время изучение возникновения аритмий и способов борьбы с ними является всё еще очень актуальным направлением. Одной из причин возникновения аритмий является ишемия сердца. К ишемии часто приводит окислительный стресс, при котором свободные радикалы окисляют липиды мембраны

кардиомиоцитов. Таким образом, повреждая мембраны окислительный стресс приводит к гипоксии клеток, а следовательно к ишемии сердца. Известно также, что оксид азота NO играет важную роль в регуляции тонуса сосудов, но окисленные липиды снижают синтез NO в организме. Для профилактики заболеваний, связанных с окислительным стрессом, могут быть использованы препараты с антиоксидантной активностью. Новое соединение, синтезированное в Институте проблем химической физики (ИПХФ) Российской академии наук, нитроксисукцинат 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридиния [1], производное пиридоксина, как раз обладает антиоксидантными свойствами, оно увеличивает продукцию монооксида азота в клетках сердца и защищает железосерные центры дыхательной цепи митохондрий сердца, мозга и печени в тканях животных от окислительного стресса [2]. Гибридное соединение нитроксисукцинат 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридиния состоит из двух компонентов: нитросукцинат и гидроксипиридина, поэтому приводит к генерации продукции оксида азота в клетках, а также защищает ЖСЦ дыхательной цепи митохондрий сердца, мозга и печени в составе тканей животных от окислительного повреждения.

Т.к. в сердечно-сосудистой системе главную роль в генерации потенциала действия для проведения возбуждения в сердце играют потенциально зависимые ионные каналы, то это исследование было направлено на изучение влияния нового антиоксидантного соединения нитроксисукцинат 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридиния на потенциалзависимые ионные каналы кардиомиоцитов, играющие главную роль в формировании потенциала действия. Были изучены потенциалзависимые быстрые натриевые каналы Nav1.5 и быстрые кальциевые каналы Cav, L-type под действием данного соединения.

Целью нашего исследования было понять, влияет ли данное соединение на работу ионных каналов и в каких концентрациях.

Исследование было проведено электрофизиологическим методом пэтч-кламп в конфигурации «перфорированная целая клетка» на изолированных неонатальных кардиомиоцитах новорожденных крысят.

Установлено, что в концентрации до 1 мМ нитроксисукцинат 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридиния не оказывает влияния на работу быстрых натриевых каналов Nav1.5 и быстрых кальциевых каналов Cav, L-type. В концентрации выше 1 мМ наблюдалось подавление быстрых натриевых токов INav1.5 и быстрых кальциевых токов ICav, L-type.

В результате было показано, что в концентрациях, в которых нитроксисукцинат 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридиния оказывает антиоксидантные свойства (20-160 мкМ • л⁻¹) [3], он не оказывает влияния на работу быстрых натриевых каналов Nav1.5 и быстрых кальциевых каналов Cav, L-type. А в концентрациях начиная с 1 мМ подавляет данные ионные токи дозозависимым способом.

Исследование действия данного мембранопротекторного вещества на потенциалзависимые калиевые ионные каналы продолжается.

Литература

1. Патент RU 2394815 C2

2. Т. Н. Богатыренко, З. В. Куроптева, Л. М. Байдер, В. Р. Богатыренко, Д. В. Мищенко Нитроксисукцинат 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридиния — гибридная структура с полифункциональным действием. Известия Академии наук. Серия химическая, 2020, № 10

3. Т. Р. Приходченко, А. А. Балакина, В. И. Амозова, С. Я. Гадомский, Д. В. Мищенко Антиоксидантные свойства нитроксисукцинат 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридиния при активации окислительных процессов противоопухолевым препаратом цисплатин *in vitro* и *in vivo*. Известия Академии наук. Серия химическая, 2022, № 12

Изучение механизма действия каспофунгина на модельные мембраны, имитирующие мембраны клеток-мишеней

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

¹ИИЦ РАН;

vladimir.andriyanov.99@gmail.com

Каспофунгин (КФ) является полусинтетическим катионным липопептидом группы эхиноканидинов, в настоящее время использующихся в медицине в качестве высокоэффективных противогрибковых лекарственных средств первой линии для лечения кандидозов и аспергиллезов, в том числе, инвазивных. Основным механизмом противогрибкового действия каспофунгина считается ингибирование встроенного в грибковую мембрану фермента, 1,3-β-D-глюкан-синтазы, продуцирующей специфический компонент клеточной стенки чувствительных грибов. Принимая во внимание амфифильные свойства липопептида и его детергентное действие на липидный бислой [1], можно предположить, что КФ способен проявлять антимикотическую активность, также воздействуя на плазматические мембраны клеток – мишеней. Таким образом, целью данной работы являлось изучение влияния КФ на модельные липидные мембраны.

В ходе исследования применялся метод регистрации токов, протекающих через плоские липидные бислои, полученные методом Монтала и Мюллера [2] и содержащие липидные компоненты, характерные для плазматических мембран грибковых клеток. Введение каспофунгина в 0.1 М раствор KCl (pH 7.4), омывающий мембрану из эквимоллярной смеси диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ), диолеилфосфатидилсерина (ДОФС) и эргостерина (эрг), в диапазоне концентраций от 40 до 100 мкМ вызывает увеличение проводимости мембраны до 400 пСм при трансмембранном напряжении, равном 50 мВ. Замена ДОФХ на диолеилфосфатидилэтаноламин незначительно снижает максимальную амплитуду тока, вызванного липопептидом в тех же концентрациях, 300 пСм. Двукратное увеличение содержания в липидном бислое отрицательно заряженного ДОФС индуцирует рост проводимости мембраны до 40 пСм. Полученные результаты позволяют предположить, что включение в состав бислоя липида конической формы и увеличение концентрации отрицательно заряженного липида в мембране слабо влияют на мембранную активность КФ. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-15-00417.

Список использованной литературы:

1. Cleary J.D., Stover K.R. Antifungal-Associated Drug-Induced Cardiac Disease // *Clinical Infectious Diseases*. 2015. Vol. 61, № Suppl 6. P. S662–S668.
2. Montal, M., Mueller, P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1972, 65, 3561–3566.

Исследование ингибирования эндоцитоза как возможного терапевтического подхода для предотвращения развития реперфузионного повреждения

Степанов А.В.^{1*}, Филиппов Ю.А.¹, Новикова Е.В.¹, Добрецов М.Г.¹, Кубасов И.В.¹

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

botanik2407@gmail.com

Некроз и разрушение плазматической мембраны кардиомиоцитов ишемической зоны при инфаркте миокарда ведет к высвобождению в межклеточное тканевое пространство многочисленных компонентов поврежденных клеток. Фрагменты ДНК, провоспалительные цитокины, факторы апоптоза, множество биоактивных молекул, синтезированных в ответ на ишемический стресс, а также более крупные компоненты погибших клеток распространяются в межклеточной среде и с кровотоком при реперфузии в соседние, не поврежденные ишемией зоны миокарда. Там они негативным образом могут воздействовать на здоровые миоциты, поглощаясь этими клетками путем эндоцитоза, что, в свою очередь, может запускать каскады цитотоксических реакций, сходные с теми, что явились причиной гибели клеток в ишемической зоне. Хотя многие клеточные и молекулярные процессы, происходящие на границе с ишемизированной зоной миокарда, активно исследуются, вклад эндоцитоза в распространение сигналов повреждения в интактной зоне остается неизученным. Таким образом, цель данной работы заключалась в исследовании подавления эндоцитоза как возможного терапевтического подхода для предотвращения развития реперфузионного повреждения и, как следствие, развития обширного инфаркта миокарда.

Работа проводилась на крысах самцах линии Wistar. В качестве экспериментальной модели была выбрана модель ишемии миокарда левого желудочка, вызванная лигированием левой коронарной артерии (45 мин), с последующей реперфузией (ИР). У ложнооперированных крыс (ЛО) производилось вскрытие грудной клетки без коронароокклюзии. Для подавления эндоцитоза у крыс с ИР применялся блокатор хлорпромазин (ХП) (0,5 мг/кг).

Оценка размера рубца через 2-4 недели после ИР производилась на поперечных срезах (5-7 срезов) левого желудочка, окрашенных трифенилтетразолием хлористым.

Электрофизиологическое исследование проводилось на изолированных сердцах, перфузируемых раствором Тирода, с использованием метода микроэлектродной внеклеточной регистрации (loose patch метод, диаметр кончика микроэлектрода ~ 5 мкм, сопротивление ~ 2 МОм).

Исследование распределения т-трубочек кардиомиоцитов осуществлялось с использованием конфокальной микроскопии (конфокальный микроскоп Leica TCS SP5) на изолированных сердцах, окрашенных флуоресцентным красителем Di-8-ANEPPS (20 мМ).

Анализ зон некроза на поперечных срезах сердца через 2 и 4 недели после операции не выявил достоверных отличий в доле рубцовой ткани между группой ИР-крыс и группой ИР/ХП-крыс (соответственно 24,5±6,5% и 34,8±7,1% на 2-й неделе и 28,9±3,3% и 29,8±6,1% на 4-й неделе).

Исследование организации Т-тубулярного аппарата с использованием конфокальной микроскопии не выявило достоверных различий длин интервалов между соседними т-трубочками и частотой встречаемости

длинных (более 3 μm) интервалов как между группами контрольных и ИР-крыс, так и между группами ИР- и ИР/ХП-крыс.

Электрофизиологическое исследование показало, что в группе ИР-крыс по сравнению с группой ЛО-крыс наблюдается существенное ремоделирование профилей внеклеточных потенциалов действия (ВПД) первого типа (с одним негативным пиком), регистрируемых в зоне мембраны кардиомиоцитов, свободной от входов в т-трубочки. Происходило градуальное увеличение их времени спада и формирование фазы следовой гиперполяризации. Одновременно у ВПД второго типа (с двумя негативными пиками), регистрируемых в зоне мембраны кардиомиоцитов субэпикарда, имеющей входы т-трубочек, наблюдалось достоверное выраженное снижение амплитуды и длительности второго пика.

Представленные данные позволяют предположить, что эти изменения ассоциированы с увеличением активности/экспрессии Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов низкой проводимости (СК каналы), поскольку применение селективного ингибитора СК каналов апамина (500 нМ) приводило к исчезновению фазы следовой гиперполяризации.

На фоне применения ХП характеристики ВПД первого и второго типов в группе ИР/ХП-крыс достоверно не отличались от значений, регистрируемых у ЛО-крыс. Это свидетельствует в пользу того, что краткосрочное подавление эндотоксина существенно ослабляет ремоделирование ВПД после ИР.

Размеры инфарктной зоны достоверно не отличались между собой в ИР- и ИР/ХП-группах. Это указывает на то, что сигналы повреждения существенно не влияют на размеры некротической зоны, но оказывают эффект на процессы ремоделирования электрогенеза в плазматической мембране кардиомиоцитов субэпикарда.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00967-23-00 и при частичной поддержке гранта РФФИ № 20-34-90010.

Исследование мембранной активности белка Е коронавируса SARS-CoV-2

Дениева З.Г.^{1*}, Батищев О.В.¹

¹*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук (ИФХЭ РАН), Москва;
zaret03@mail.ru*

Инфекция COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, привела к крупнейшей пандемии со времен гриппа «испанки» в 1918 году. Ввиду этого остро встал вопрос разработки вакцин и противовирусных препаратов, способных остановить распространение данной инфекции. В настоящее время в области поиска противовирусных лекарственных препаратов против COVID-19 большое внимание уделяется исследованию структуры рецептор-связывающего домена поверхностного белка S, однако, появление новых штаммов коронавируса SARS-CoV-2 говорит о его высокой изменчивости, что снижает эффективность вакцин и противовирусных лекарственных средств. Вместе с тем, оболочечный белок Е данного вируса является мембраноактивным и показывает достаточно высокую консервативность. Несмотря на критическую важность этого белка в жизненном цикле коронавируса, физико-химические механизмы его взаимодействия с клеточными мембранами до сих пор остаются невыясненными.

Целью данной работы было исследовать мембранную активность белка Е коронавируса SARS-CoV-2 на моделях гигантских однослойных везикул и липидных нанотрубок. В результате было установлено, что белок формирует поры в липидном бислое, т.е. выполняет основную функцию виropорина. Кроме того, белок Е способен деформировать липидные мембраны и образовывать двумембранные везикулы в зависимости от концентрации.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-13-00435).

Исследование роли VDAC в развитии митохондриальной дисфункции в культуре клеток в условиях гипергликемии

Белослудцев К.Н.^{1*}, Старинец В.С.², Серов Д.А.^{3,4}, Ильзоркина А.И.², Карагяур М.Н.⁵, Дубинин М.В.¹,
Белослудцева Н.В.^{1,2}

¹Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия;

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцзино, Россия;

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

⁴Институт биофизики клетки РАН - ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пуцзино, Россия;

⁵Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

bekonik@gmail.com

Сахарный диабет – метаболическое заболевание, связанное либо с нарушением секреции инсулина β клетками поджелудочной железы (сахарный диабет I типа), либо с инсулинорезистентностью органов и тканей организма человека и животных (сахарный диабет II типа). Вследствие этого происходит развитие гипергликемии, которая сопровождается нарушением белкового и липидного обмена. Эти нарушения приводят к патологическим изменениям в органах и тканях организма [1].

Общепризнано, что митохондриальная дисфункция является одним из процессов, вовлеченных в развитие сахарного диабета на клеточном уровне. Действительно, для многих органов и тканей, а также клеточных линий продемонстрировано, что сахарный диабет или гипергликемия приводят к усиленной генерации активных форм кислорода митохондриями, нарушению процессов окислительного фосфорилирования и падению мембранного потенциала. Считается, что это связано с нарушением клеточного контроля качества митохондрий – внутриклеточной системы, ответственной за митофагию, митохондриальный биогенез и митохондриальную динамику [2].

Митохондриальный метаболизм требует эффективного обмена ионами и метаболитами между митохондриями и цитоплазмой через внешнюю митохондриальную мембрану. Этот обмен осуществляется с помощью белков – поринов (или потенциал-зависимых анионных каналов – VDAC). В связи с этим не удивительно, что VDAC может быть вовлечен в широкий спектр патологий связанных с митохондриями [3]. Так недавние исследования показали, что при развитии сахарного диабета наблюдается избыточная экспрессия белка VDAC1 [2,4]. Это предполагает его возможную роль в патогенезе данного заболевания. В связи с этим целью настоящей работы было исследовать влияние фармакологического и генетического ингибирования VDAC на развитие митохондриальной дисфункции в условиях гипергликемического стресса клеточных культур.

В первой части работы мы провели исследование влияния VBIT4 – ингибитора VDAC на развитие митохондриальной дисфункции первичной культуры эндотелиоцитов легких мышей в условиях гипергликемии. Установлено, что экспозиция (36 часов) первичной культуры эндотелиоцитов легких мышей в среде с высоким содержанием глюкозы (30 мМ) приводит к достоверному снижению жизнеспособности клеток. 5 мкМ VBIT-4 устраняет цитотоксическое действие гипергликемии. Гипергликемия приводила к достоверному увеличению образования активных форм кислорода клетками, повышению активности спонтанного образования МРТ поры в митохондриях, падению мембранного потенциала и увеличению колокализации митохондрий и лизосом (свидетельствует о возможности активации митофагии). Инкубация клеток в этих условиях с 5 мкМ VBIT-4 приводила к снижению генерации активных форм кислорода, подавлению открытия МРТ поры и восстановлению колокализации митохондрий и лизосом.

В следующей части работы была получена культура фибробластов кожи человека с пониженной экспрессией VDAC1. Продemonстрировано, что клетки, со сниженной по VDAC1 экспрессией были практически не чувствительны к увеличению уровня глюкозы в среде до 30 мМ. Установлено, что в условиях гипергликемии наблюдается значительное увеличение флуоресценции DCF в фибробластах (в 1.97 раза). При снижении экспрессии VDAC1 также наблюдается рост флуоресценции, однако он менее выражен (в 1.67 раза). Это может свидетельствовать о том, снижение экспрессии VDAC1 может являться защитным механизмом при развитии гипергликемии. Продemonстрировано, что относительное снижение флуоресценции кальцеина в присутствии кобальта, индуцированное гипергликемией, в клетках с пониженной экспрессией VDAC1 менее выражено (в 1.18 раза) чем в случае немодифицированных клеток (в 1.35 раза).

Исходя из полученных результатов можно предположить, что фармакологическое или генетическое подавление активности VDAC1 в первичных культурах клеток является фактором, предотвращающим развитие митохондриальной дисфункции в условиях гипергликемического стресса клеток.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (20-15-00120).

Литература:

1. Skyler J.S., Bakris G.L., Bonifacio E., et al. Diabetes. 2017, 66, 241-255.
2. Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Dubinin, M.V. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 6559.
3. Zinghirino F., Pappalardo X.G., Messina A., et al. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 7388.
4. Sasaki K., Donthamsetty R., Heldak M., et al. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2012, 303, C1055-60.

Исследование фотодинамических свойств окта-катионных комплексов фталоцианина с ионом магния или цинка на модельной липидной мембране

Зыкова Д.Д.^{1,2*}, Константинова А.Н.¹, Соколов В.С.¹

¹Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина;

²Московский физико-технический институт;

dasha_ddz1924@mail.ru

Метод фотодинамической терапии эффективен для борьбы с раковыми заболеваниями и как способ дезактивации патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам [1]. Для поиска новых эффективных фотосенсибилизаторов (ФС) необходимы методы, позволяющие изучать их адсорбцию и фотодинамические свойства *in vitro* в системе, близкой по структуре к клеточной мембране. В настоящей работе такой системой была бислойная липидная мембрана, являющаяся хорошей моделью клеточной мембраны. Адсорбцию и фотодинамическую активность фотосенсибилизаторов на БЛМ изучали, измеряя скачок потенциала на границе БЛМ с раствором. Изучены адсорбция и фотодинамическая активность окта-катионных комплексов фталоцианина (Фц) с ионом магния (8bMgPc) или цинка (8bZnPc), которые были синтезированы в ИФХЭ РАН. Эти соединения имеют на периферии 8 положительно заряженных групп и различаются ионом металла в центре фталоцианинового макрокольца. Изменения граничного потенциала $\Delta\Phi_b$ измеряли 3 методами: разработанными в лаборатории методом компенсации внутримембранного поля (IFC), по изменению проводимости БЛМ, индуцированной нонактином, а также по электрофоретической подвижности липосом.

Адсорбция ФС приводила к изменению $\Delta\Phi_b$, знак которого соответствовал связыванию с БЛМ положительно заряженных молекул Фц. Значения $\Delta\Phi_b$ для 8bMgPc и 8bZnPc были близки, что говорит о незначительном влиянии природы иона металла в центре молекулы на их адсорбционные свойства. Значения $\Delta\Phi_b$, измеренные при адсорбции 8bMgPc методом IFC, совпали со значениями $\Delta\Phi_b$, определенными по изменению проводимости БЛМ, индуцированной нонактином. Это свидетельствует, что молекулы 8bMgPc не проникают через БЛМ. Наклоны зависимости $\Delta\Phi_b$ от концентрации Фц в растворе значительно превышали величину, предсказываемую на основе предположения, что заряды адсорбируемых соединений лежат на поверхности мембраны, а скачок потенциала удовлетворяет теории Гуи-Чепмена [2]. Значения $\Delta\Phi_b$, измеренного методом IFC, значительно превышали значения zeta-потенциала. Эти результаты объясняются тем, что заряженные группы 8bMgPc и 8bZnPc погружены в гидрофобную область БЛМ.

Обнаружено увеличение проводимости мембраны в процессе связывания с ней 8bZnPc, добавленного в водный раствор ячейки, которая со временем спадала до исходной величины. Это объяснялось перестройкой липидов, окружающих молекулы 8bZnPc в мембране, в результате которой возникают проводящие дефекты в БЛМ. Добавление к DPhPC холестерина (30 мольных %) не влияло на возникновение проводимости, но ускорило ее спад. Возрастание проводимости при адсорбции 8bMgPc не наблюдалось, откуда сделан вывод, что оно вызвано взаимодействием между ионом цинка в молекуле 8bZnPc и фосфолипидами в БЛМ.

Фотодинамическая активность исследуемых фталоцианинов определялась по скорости R разрушения молекулы-мишени синглетного кислорода di-4-ANEPPS при освещении БЛМ. Разрушение молекул di-4-ANEPPS регистрировали по исчезновению дипольного скачка потенциала, создаваемого ими на поверхности БЛМ. Молекулы мишени и Фц адсорбировали по разные стороны мембраны, чтобы исключить их взаимодействие, и разрушение di-4-ANEPPS происходило из-за их окисления синглетным кислородом, проникающим через БЛМ. По кинетике изменения $\Delta\Phi_b$ при освещении БЛМ и его восстановления в темноте определяли скорость R разрушения di-4-ANEPPS, пропорциональную стационарной концентрации синглетного кислорода в мембране. Зависимости R от концентрации 8bMgPc и 8bZnPc в растворе были близки друг к другу. В диапазоне концентраций 10^{-8} – 10^{-6} М параметр R линейно возрастает для всех Фц, а при концентрации выше 10^{-5} М перестает расти и выходит на плато, что можно объяснить тушением синглетного кислорода молекулами фталоцианина в мембране [3].

В итоге можно заключить, что природа иона металла в центре молекулы изученных фталоцианинов мало влияет на их адсорбционные и фотодинамические свойства, но сказывается на структурных перестройках липидного бислоя, вызванных встраиванием молекул Фц в мембрану. Заряженные группы исследуемых Фц погружаются в гидрофобную область БЛМ, и адсорбция молекул 8bMgPc происходит без их проникновения через мембрану. Скорость разрушения R молекул di-4-ANEPPS, которая характеризует фотодинамическую эффективность фталоцианинов, растет с увеличением их концентрации в растворе, но перестает расти при высоких концентрациях из-за тушения синглетного кислорода молекулами фталоцианина в мембране.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда РФ, проект № 19-13-00410.

1. DeRosa, Maria C. Photosensitized singlet oxygen and its applications. Coordination Chemistry Reviews 233 (2002): 351-371.

2. Sokolov V. S. and Mirsky V. M. Electrostatic potentials of bilayer lipid membranes: basic research and analytical applications. In: Ultrathin Electrochemical Chemo- and Biosensors: Technology and Performance, edited by Vladimir M. Mirsky, Heidelberg: Springer-Verlag, 2004, 255-291.

3. Krasnovsky, A. A., et al Quenching of singlet molecular oxygen by phthalocyanines and naphthalocyanines, Photochemistry and Photobiology, 2008, 55(5), 691-696.

Исследования методом АСМ электрофизических свойств мембраны клеток буккального эпителия человека

Торхов Н.А.¹, Мосунов А.А.^{1*}

¹Севастопольский государственный университет;
aamosunov@sevsu.ru

Обнаружена односторонняя неоднородная электрическая проводимость мембраны клеток буккального эпителия человека и её корреляция с топологией микромеханических свойств.

Интенсивное развитие биоэлектрических интегрированных систем человека в основе которых лежит распространение электрических сигналов в его тканях требует изучения электрических свойств организма на клеточном уровне [1]. В связи с этим, в качестве объекта исследования выступали живые клетки буккального эпителия человека (далее – клетки) полученные методом жидкостной цитологии. Данный метод включал в себя механический забор (соскоб) с внутренней поверхности щеки слизистой оболочки ротовой полости, промывание соскоба в фосфатном буфере (3.03 мМ фосфатного буфера с добавлением 2.89 мМ хлорида кальция объемом 5 мл, pH 7.0), помещение данной смеси в пробирку и сепарирование её содержимого в центрифуге в течении 5 мин с ускорением 1700g (5000 min⁻¹), отбор из центрифужной пробирки аликвоты буферного раствора содержащего взвесь живых клеток буккального эпителия. В качестве подложечного материала использовалась эпитаксиальная структура кремния дырочного p-типа проводимости p- $\text{Si}\{111\}$ с размером неровностей <20 нм.

После помещения аликвоты на эпитаксиальную поверхность кремния $\text{Si}\{111\}$, осуществлялось её подсушивание на воздухе при нормальном атмосферном давлении и температуре $T \leq 40^\circ\text{C}$ в течении <10 минут. Находящиеся в аликвоте живые клетки естественным образом осаждались на эпитаксиальную поверхность кремния и сохранялись на ней в таком виде в течении 3-4 часов после испарения основного количества влаги. Наличие на поверхности клеток адсорбционного слоя буферного раствора поддерживало их жизнеспособность в течении относительно длительного пребывания на воздухе при нормальных условиях (НУ).

Исследования геометрии рельефа поверхности клеточных оболочек и их электрической проводимости – электронно-дырочного тока растекания $I_{\text{рг}}$ (далее – ток растекания $I_{\text{пр}}$) осуществлялось на воздухе при НУ с использованием АСМ NTEGRA-AURA со сканирующим предметным столиком в контактом режиме сканирования и разрешении 300x300 точек обеспечивающем постоянный механический и электрический контакт острия иглы кантилевера с постоянной силой прижатия к поверхности проводимого на базе Центра коллективного пользования “Молекулярная структура вещества” Севастопольского государственного университета. В качестве измерительного зонда использовались токопроводящие кантилеверы HA-FM/W2C с радиусом закругления острия иглы $r \sim 35$ нм. Кантилевер был заземлен.

На поверхности мембран отчетливо видно место расположения клеточного ядра и окружающих его органелл. При этом сама поверхность оболочки не является гладкой, а имеет достаточно развитый рельеф с достаточно развитым морфологическим строением и механической организацией [2, 3].

Исследования выявили одностороннюю неоднородную электронно-дырочную проводимость мембраны клеток буккального эпителия человека. Для определения типа проводимости (электронная или дырочная) необходимо проведение дальнейших исследований.

Анализируя гистограммы распределения $N=N(I_{\text{прт}})$ можно определить, что мембрана образована областями с разной электрической проводимостью, которые образованы совокупностью более мелких участков с близкими значениями токов растекания $I_{\text{прф}}=I_{\text{прф}}(x,y)$. Исследования показали, что топология данных участков достаточно хорошо совпадает с топологией локальных неровностей рельефа и распределения адгезионных сил по поверхности мембраны $F_{\text{adh}}=F_{\text{adh}}(x,y)$, а также совершаемой ими работы $A_{\text{adh}}=A_{\text{adh}}(x,y)$. Более детальный анализ показал, что пронизывающие мембрану ионные наноканалы обладают в несколько раз более высокой электронно-дырочной проводимостью по сравнению с окружающей их поверхностью. При этом, неоднородность проводимости мембраны частично коррелирует с характером расположения некоторых органоидов клетки. Это указывает на существование электрической связи таких органоидов с клеточной мембраной.

Выявлена односторонняя электрическая проводимость мембраны. Так для $U_{\text{г}} < 0$ средние значения токов $\langle I_{\text{рг}} \rangle = 20.8$ pA значительно превышают значения $\langle I_{\text{прф}} \rangle = 0.01$ pA для $U_{\text{г}} > 0$.

Исследования показали, что, в зависимости от состояния клетки, проводимость разных областей клеточной мембраны может меняться в достаточно широких пределах, что может быть использовано для оценки состояния клетки.

Исследования были проведены в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Разрешение на проведение исследований с забором буккального эпителия получено Этическим комитетом Севастопольского государственного университета (исследование № 3, 15 июля 2021 г.).

Буккальный эпителий собирали в соответствии с правилами проведения исследований на материале человека в Российской Федерации. Все субъекты дали письменное информированное согласие.

[1]. Ece Neslihan Aybeke, Sarah Ployon, Marine Brulé, Brice de Fonseca, Eric Bourillot, Martine Morzel, Eric Lesniewska, and Francis Canon. Nanoscale mapping of the physical surface properties of human buccal cells and changes induced by saliva. *This: Langmuir* 2019, 35, 12647-12655. DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b01979.

[2]. E. Lesniewska, E. Bourillot, D. Carriou, J. Gushina, E. Pudovkina and S.N. Pleskova. The study of living and fixing buccal epitheliocytes morphology by atomic force microscopy. <https://www.researchgate.net/publication/277668472>.

[3]. N. A. Torhov, A. A. Mosunov, V. A. Novikov & I. V. Ivonin. Study of tribological properties of human buccal epithelium cell membranes using probe microscopy. *Scientific Reports*. (2022) 12:11302. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14807-5>.

Кальций-активируемая липидная пора и её роль в предотвращении перегрузки митохондрий кальцием

Миронова Г.Д.^{1*}, Белослудцева Н.В.¹

¹ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;
mironova40@mail.ru

Кальций, как известно, является медиатором многих процессов, происходящих в организме. При действии гормонов, электрических импульсов или других факторов Ca^{2+} поступает в цитоплазму и активирует определённые функции, после чего внутриклеточная концентрация этого иона должна снижаться до контрольного уровня. Этот процесс в клетке контролируется преимущественно митохондриями, в которых есть системы, связывающие Ca^{2+} с высоким сродством. Однако, при интенсивном функционировании клетки, а также при патологиях, особенно сопровождающихся продолжительной гипоксией, когда Ca^{2+} накапливается в цитоплазме в повышенных количествах, может произойти перегрузка митохондрий этим ионом. В результате, возникает опасность появления во внутренней мембране митохондрий неспецифической проницаемости в результате образования митохондриальной поры (МРТ поры), приводящей к апоптозу или некрозу клеток. Механизм этой проницаемости связан с открытием мегаканала, чувствительного к циклоспирину А (ЦсА), который имеет белковую природу. В работе мы показали, что помимо пути, связанного с открытием белковой поры, в митохондриях может происходить открытие короткоживущих липидных пор, появляющихся в мембране с матричной стороны при накоплении комплексов пальмитиновой кислоты с ионами Ca^{2+} . Эти поры не регулируются ЦсА и, по всей видимости, играют защитную роль, предупреждая митохондрии от накопления в них больших концентраций иона и открытия МРТ поры.

Ранее нами было показано, что насыщенные длинноцепочечные свободные жирные кислоты связывают Ca^{2+} с высоким сродством, которое на 1.5-2 порядка выше, чем сродство к этому иону других жирных кислот и липидов. Эти кислоты в присутствии Ca^{2+} способны индуцировать ионную проницаемость бислоевой липидной мембраны, и неспецифическую проницаемость как липосомальной мембраны, так и внутренней мембраны митохондрий, выделенных из разных тканей. Эти исследования позволили предположить общий универсальный механизм образования пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной проницаемости в бислоевых липидных мембранах, отличный от механизма образования МРТ поры.

На основании проведенных экспериментов на липосомах с применением флуоресцентных зондов было предположено, что механизм образования этой поры в липидном бислое связан с хемотропным фазовым переходом.

Известно, что вход Ca^{2+} в митохондрии приводит к активации фосфолипазы А2 и появлению свободных жирных кислот, в основном пальмитиновой и стеариновой. При их накоплении в матриксе митохондрий возможно образование, по нашим данным, комплексов этих кислот с Ca^{2+} и открытие короткоживущих пор по описанному выше механизму. Так как эти поры имеют малый диаметр, они быстро закрываются и, как мы показали, не влияют на работу дыхательной цепи, восстанавливая при этом ионный гомеостаз. В присутствии Ca^{2+} -(Sr^{2+})-зависимых ингибиторов фосфолипазы А2, накопление свободных жирных кислот не наблюдается. При этом блокируются вызванные Sr^{2+} в присутствии валиномицина спонтанные циклические изменения в концентрации K^{+} , Ca^{2+} , H^{+} , мембранного потенциала, набухания, скорости потребления кислорода и скорости

образования H_2O_2 в митохондриях. Подавление вышеописанных осцилляций ингибиторами фосфолипазы A2 мы связываем с отсутствием в матриксе свободных жирных кислот и невозможностью в этих условиях открытия липидной поры. В результате блокируется как выход ионов K^+ и Ca^{2+} из митохондрий, так и вход в них H^+ по концентрационному градиенту, тогда как индукция образования поры уравнивает ионные градиенты через митохондриальную мембрану. Следовательно, открытие липидной поры обеспечивает K^+/H^+ и Ca^{2+}/H^+ обмен в митохондриях. Участие Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A2 в этом процессе подтверждается тем, что ингибитор Ca^{2+} -независимой фосфолипазы A2 не влиял на описанные выше осцилляции. Этот путь, вероятно, играет защитную роль против токсичности Ca^{2+} и АФК.

Открытие липидной поры, по полученным нами данным, снижает вероятность появления в митохондриях белковой поры, которая, как известно, ответственна за гибель клетки. Одной из особенностей липидной поры является её способность индуцироваться относительно небольшими количествами Ca^{2+} т.е., эти поры появляются в митохондриальной мембране до того, как органеллы будут перегружены Ca^{2+} до степени, запускающей открытие МРТ поры. Это предположение было подтверждено сравнительными исследованиями параметров образования липидной поры и МРТ поры в митохондриях разных тканей крыс с генетически измененной устойчивостью к гипоксии. Эксперименты показали, что митохондрии устойчивых к гипоксии животных более восприимчивы к открытию липидной поры и более устойчивы к открытию МРТ поры, по сравнению с органеллами чувствительных к гипоксии крыс. Результаты, полученные в этих экспериментах, нашли дальнейшее подтверждение при исследованиях на двух линиях крыс (Август и Вистар) с разным уровнем окислительного фосфорилирования (ОКСФОС). При этом крысы линии Август имели более высокую скорость дыхания и эффективность ОКСФОС, а также более высокие скорости транспорта калия и набухания митохондрий и более низкие скорости продукции H_2O_2 . Они же были менее чувствительны к гипоксии и стрессу. При этом, липидные поры легче формировались в митохондриях резистентных к гипоксии крыс. Таким образом, полученные нами результаты подтверждают предположение о том, что чем эффективнее работает липидная пора, тем труднее открывается белковая пора. Важно подчеркнуть, что образование липидных пор не разобщает ОКСФОС в митохондриях, позволяя органеллам поддерживать снабжение клеток энергией во время стресса. Следовательно, липидная пора может обеспечивать защиту от перегрузки митохондрий ионами Ca^{2+} . Это предположение также может объяснить эффекты ингибиторов фосфолипазы A2 на открытие МРТ поры, задокументированное группой Pfeiffer в 2006 г.

Работа поддержана грантом РФФИ №23-25-00441.

Кальций-зависимая активация продукции митохондриальных АФК в клетках первичной культуры головного мозга

Стедьмашук О.А.^{1*}, Винокуров А.Ю.¹
¹ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»;
o.stelmashchuk@oreluniver.ru

Митохондрии представляют собой органеллы, участвующие в различных важных процессах в клетке. Помимо своей основной функции по выработке АТФ, митохондрии играют ключевую роль в регуляции передачи сигналов кальция, генерации активных форм кислорода и гибели клеток. Хотя все эти процессы подробно описаны, их взаимодействие при внутриклеточном распространении сигнала остается неясным. При этом для ряда заболеваний показана связь с перегрузкой митохондрий Ca^{2+} , что в сочетании с другими триггерами приводит к открытию митохондриальной поры (mPTP) и впоследствии запускает запрограммированную гибель клеток.

Взаимодействие АФК и митохондриального поглощения кальция исследовали в клетках первичной совместной культуры нейронов и астроцитов с помощью зондов MitoTracker Red CM-H2XRos (индикатор продукции АФК в митохондриальном матриксе), Fluo-4AM (флуоресцентный индикатор кальция в цитозоле) и X-Rhod-1, AM (флуоресцентный индикатор кальция в митохондриях).

Было обнаружено, что добавление АТФ или L-глутамата, запускающих передачу сигналов кальция в астроцитах и нейронах и инициирующих поглощение кальция митохондриями, приводит к стимулированию повышения уровня митохондриальных АФК в нейронах ($p = 0,035$) и астроцитах ($p < 0,01$). Ионифор Ca^{2+} иономицин также активирует образование АФК в митохондриях. Ca^{2+} -индуцированное увеличение продукции АФК зависело от присутствия разобщителя FCCP ($p < 0,05$ от базового уровня в нейронах), а также ингибитора митохондриального комплекса I ротенона ($p < 0,05$ от базового уровня в астроцитах). Когда комплекс I ингибировался ротеноном, наблюдаемая продукция АФК значительно увеличивалась ($p < 0,001$) в условиях увеличения внутриклеточного Ca^{2+} , индуцированного иономицином. Возможно, увеличение АФК под влиянием

иономицина может быть связано с активностью комплекса II дыхательной цепи электронов и реверсным транспортом электронов с комплекса II на комплекс I.

Таким образом, поглощение кальция митохондриями нейронов и астроцитов в ответ на физиологически значимые стимулы приводит к генерации митохондриальных АФК, что может играть важную роль в развитии физиологии и заболеваний.

Кинетика и механизмы оксидативного гемолиза под действием азо- и пероксидного инициатора

Соколова Е.М.^{1*}, Дубенская Н.А.², Психа Б.Л.¹, Нешев Н.И.¹

¹*Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Россия;*

²*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*
sem89@icp.ac.ru

При нарушении работы антиоксидантной системы в клетках возрастает количество активных метаболитов кислорода, которые вызывают разнообразные оксидативные повреждения, приводящие клетку к окислительному стрессу [1]. Наиболее опасным проявлением окислительного стресса является пероксидное окисление липидов мембран (ПОЛ). В таком состоянии клетка перестает выполнять важные физиологические функции, что приводит к развитию ряда патологических состояний организма, среди которых сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет, различные формы нейродегенеративных заболеваний. Поэтому на сегодняшний день одним из базовых направлений химической биологии и медицинской химии остается поиск и исследование веществ, обладающих антиоксидантными свойствами и последующая разработка на их основе фармакологических препаратов. Это обуславливает актуальность и практическую значимость разработки биологических моделей, на которых осуществляется эффективное тестирование данных соединений на антиоксидантную активность. Эффективность разрабатываемой модели в первую очередь определяется качеством инициирования ПОЛ в биологическом субстрате, в качестве которого в нашей работе используются эритроциты и наличием надежного количественного критерия, что позволит эффективно дифференцировать про- и антиоксидантную составляющую в действии химических соединений на биологический объект.

Важным этапом в разработке такой модели является подбор и исследование возможных химических инициаторов пероксидного окисления липидов в мембране клетки, относящихся к разным классам химических соединений.

Данная работа посвящена исследованию пероксидного гемолиза эритроцитов под действием двух инициаторов пероксидного окисления липидов, 2,2'-Азобис (2-амидинопропан) дигидрохлорид (AAPH), относящийся к классу диазосоединений, и трет-бутилгидропероксид (t-BuOOH), из класса органических пероксидов.

AAPH в водной среде подвергается мономолекулярному терморазложению, с образованием двух алкильных радикалов и выделением молекулярного азота. Процесс протекает с достаточной эффективностью уже при 35-40 °C. В кислородной среде алкильные радикалы вступают в быструю реакцию с кислородом с образованием пероксильных радикалов, которые снаружи атакуют двойные связи мембранных липидов, иницируя ПОЛ в мембране.

Трет-бутилгидропероксид (t-BuOOH), в отличие от AAPH, не способен самопроизвольно распадаться на радикалы при физиологических температурах. Легко проникая через плазматическую мембрану клетки благодаря высоколипофильному третбутильному фрагменту, t-BuOOH запускает каскад сложных, до конца не изученных, реакций с участием гемоглобина, в ходе которых образуются радикальные продукты, иницирующие процесс ПОЛ в мембране.

Нами установлено, что под действием исследуемых инициаторов в мембране эритроцитов накапливаются соединения, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивные продукты), главным из которых является малоновый диальдегид и наблюдается гемолиз эритроцитов, что согласуется с имеющимися литературными данными. В то же время кинетические закономерности гемолиза под действием данных соединений существенно различались.

В широком диапазоне концентраций была исследована кинетика гемолиза 0,2%-ной суспензии эритроцитов мыши под действием AAPH и t-BuOOH. Экспериментальные значения, характеризующие изменение степени гемолиза во времени, аппроксимировали в программе Origin сигмоидальной функцией Больцмана. Оба соединения вызывали концентрационно-независимый гемолитический эффект.

Гемолитическую активность AAPH и t-BuOOH характеризовали величиной периода индукции гемолиза, которую определяли графически по времени достижения 10% гемолиза. В случае AAPH период индукции гемолиза зависел от начальной концентрации инициатора линейно, тогда как аналогичная зависимость для t-

BuOON была существенно нелинейной и хорошо аппроксимировалась биэкспоненциальной функцией, где k_1 и k_2 равны $2 \cdot 10^{-2}$ и $65 \cdot 10^{-2}$, соответственно. Такой характер зависимости может указывать на присутствие в системе двух различных факторов, влияющих на осмотическое равновесие клетки противоположным образом, что может приводить к торможению скорости гемолиза с ростом концентрации инициатора. Это прямо подтверждается более ранним выходом гемолитических кривых на плато при высоких концентрациях t-BuOON, что ведет к остановке гемолиза.

Хотя оба изученных инициатора способны активировать ПОЛ в мембранах эритроцитов, их гемолитическое действие имеет особенности. Линейное изменение периода индукции гемолиза с ростом концентрации ААРН согласуется с представлением об ААРН как о мономолекулярном генераторе пероксидных радикалов в водной среде. В то же время гемолитический отклик системы на действие t-BuOON оказывается существенно нелинейным. Это свидетельствует, о том, взаимодействие t-BuOON с клеткой может включать процессы, не ограничивающиеся перекисидацией липидного субстрата. Эти обстоятельства следует учитывать при возможном практическом использовании указанных соединений в качестве индукторов оксидативного гемолиза эритроцитов.

Литература:

1. Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine / H. Sies // Redox Biol. – 2015. - №4. – P. 180-183.

Латеральная диффузия липидов в одно- и двухкомпонентных модельных мембранах везикул по данным ^1H ЯМР-спектроскопии с импульсным градиентом поля и контрастирующим агентом

Гиматдинов Р.С.^{1,2*}, Гнездилов О.И.², Камбеева Д.И.¹, Мельникова Д.Л.², Петрова А.Ф.², Халиуллина А.В.^{1,2}

¹Казанский государственный медицинский университет;

²Казанский федеральный университет;

rsg2004@mail.ru

Искусственные липидные везикулы (липосомы) широко используются в качестве модельных мембранных систем в различных медико-биологических исследованиях. Среди причин интереса к искусственным липосомам - возможность их применения как модельной системы для исследования особенностей везикулярного транспорта и моделирования разнообразных мембранных процессов, активное внедрение в медицинскую практику в качестве средств доставки в диагностических и клинических приложениях.

В жидкокристаллическом состоянии компоненты оболочки везикул, молекулы бислоя, имеют высокую латеральную подвижность. Мембрана ведет себя как достаточно жидкая, текучая фаза, обладающая свойствами двумерной жидкости. Выяснение механизмов и закономерностей латеральной поверхностной диффузии компонентов биологических мембран, их связь с составом, фазовым состоянием бислоя, различными патологическими процессами является важной и актуальной задачей. При анализе разнообразных мембранных процессов крайне важны численные значения коэффициентов латеральной диффузии, которые характеризуют трансляционную подвижность молекул липидов и белков вдоль двумерной поверхности мембраны. Измерения характеристик латеральной диффузии помимо данных о молекулярной подвижности, дают возможность анализировать фазовое состояние мембраны, вязкость, структуру и функции, особенности взаимодействия между компонентами мембраны.

Среди методов исследования динамических свойств биомембран, в том числе липидных оболочек искусственных везикул, особое место занимает метод ядерного магнитного резонанса с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП). Метод ЯМР ИГМП позволяет получать информацию о трансляционной подвижности в системе без внесения дополнительных макроскопических или микроскопических возмущений в систему в виде зондов или меток.

В работе исследована латеральная самодиффузия молекул фосфолипидов одно- и двухкомпонентных модельных мембран искусственных везикул методом ЯМР спектроскопии с импульсным градиентом магнитного поля. Измерения проводились на ядрах ^1H на частоте 400.22 МГц на спектрометре “AVANCE 400 III TM” (Bruker), оснащенный блоком импульсного градиента магнитного поля. Для измерения коэффициентов самодиффузии (КСД) использовалась импульсная последовательность «стимулированное эхо». Регистрировались диффузионные затухания интенсивностей отдельных линий ЯМР в Фурье-спектрах спинного эха диффундирующих молекул.

Образцы - суспензии одно- и двухкомпонентных липосом были приготовлены стандартным методом гидратации тонких липидных пленок из фосфолипидов соевого фосфатидилхолина (SPC) марки Липоид S100 и

воды (H₂O) в массовом соотношении 1:1, с добавлением контрастирующего парамагнетика в концентрации 0.73 весовых % и без него. В качестве контрастирующего агента для подавления сигнала от воды был использован содержащий гадолиний препарат ProHance, с молекулами гадотеридола как активного вещества в количестве 279,3 мг на 1 мл. В роли второго компонента мембран двухкомпонентных систем выступал холестерин (Chol) в молярном соотношении 2:1 (SPC : Chol).

Применена новая методика спектроскопического анализа для подавления сигнала от воды при измерении латеральной диффузии липидов по сигналам ядер ¹H. Известный способ подавление стремительно затухающего сигнала от быстро диффундирующих молекул воды импульсами градиента магнитного поля комбинируется с подавлением сигнала от водной фазы путем ускорения ядерной магнитной релаксации протонов воды при добавлении контрастирующего агента – ионов гадолиния в качестве парамагнитного допинга. В результате соотношение интенсивностей сигналов в спектре ЯМР на ядрах водорода ¹H изменилось, подобно методике ЯМР ИГМП с вращением образца под магическим углом. Сигнал от ОН-групп заметно уменьшился, на спектре отчетливо видны линии протонов холиновых групп липидов и протонов углеводородных цепей. Таким образом удается исследовать диффузию непосредственно молекул липидов по затуханию соответствующих линий в ¹H ЯМР спектре.

Полученные диффузионные затухания для однокомпонентного бислоя носят простой одно-экспоненциальный характер в изученном интервале времен диффузии от 50 мсек до 250 мсек. Величина коэффициента латеральной диффузии при температуре 308 К и времени диффузии 50 мсек составляет $6,8 \cdot 10^{-14}$ м²/сек. В двухкомпонентной мембране с добавлением молекул холестерина диффузионные затухания носят сложный характер и описываются уравнением для многофазной системы, представляющим собой сумму экспоненциальных функций. Обнаружена зависимость коэффициентов латеральной диффузии липидов от времени диффузии. Данные факты можно объяснить фазовыми неоднородностями в бислое с холестерином (образованием липидных доменов – рафтов) при температуре эксперимента и как показано в работе [1], нелинейной зависимости между среднеквадратичным смещением и временем диффузии вследствие кривизны бислоев в везикулярной системе. При больших временах диффузии, в режиме ограниченной диффузии, средний квадрат смещений молекул достигает предельного значения, соответствующего размерам везикул. Рассчитанные на основе этих данных значения радиусов кривизны ламеллярных бислоев везикул согласуются с полученными нами данными методом конфокальной микроскопии.

1. Lateral Diffusion Rates of Lipid, Water, and a Hydrophobic Drug in a Multilamellar Liposome / H.C. Gaede, K. Gawrisch - DOI 10.1016/S0006-3495(03)74603-7 // Biophys J. – 2003. - Sep; 85(3) – p. 1734–1740.

Лиганд рецепторов сигма-1 галоперидол модулирует Ca²⁺-ответы в макрофагах

Миленина Л.С.^{1*}, Крутецкая З.И.¹, Антонов В.Г.², Крутецкая Н.И.¹, Бадюлина В.И.¹, Симонян А.О.¹
¹СПбГУ;

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет;
l.milenina@spbu.ru

Рецепторы сигма-1 – повсеместные многофункциональные лигандрегулируемые молекулярные шапероны в мембране эндоплазматического ретикулума, имеющие уникальную историю, структуру и фармакологический профиль. Рецепторы сигма-1 модулируют широкий спектр клеточных процессов в норме и патологии, включая процессы Ca²⁺-сигнализации.

Для выявления участия рецепторов сигма-1 в процессах Ca²⁺-сигнализации в макрофагах исследовали влияние антагониста рецепторов сигма-1 нейрорептида галоперидола на Ca²⁺-ответы, вызываемые ингибиторами эндоплазматических Ca²⁺-АТФаз тапсигаргином (ТГ) и циклопiazоникой кислотой (ЦПК), а также дисульфидсодержащими иммуномодуляторами глутоксимом® (динатриевая соль окисленного глутатиона с d-металлом в наноконцентрации, ФАРМА-ВАМ, Санкт-Петербург) и моликсаном® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина, ФАРМА-ВАМ) в перитонеальных макрофагах крысы.

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar на автоматизированной установке для измерения внутриклеточной концентрации Ca²⁺, [Ca²⁺]_i, на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Для измерения [Ca²⁺]_i использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM. Статистический анализ проводили с применением критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0.05$.

Влияние галоперидола на Ca²⁺-ответы, индуцируемые ингибиторами эндоплазматических Ca²⁺-АТФаз. В контрольных экспериментах обнаружили, что добавление 0.5 мкМ ТГ к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает незначительное увеличение [Ca²⁺]_i, отражающее мобилизацию Ca²⁺ из внутриклеточных Ca²⁺-депо. В среднем увеличение [Ca²⁺]_i во время фазы мобилизации составило 31 ± 9 нМ (n

= 7; $p < 0.05$). При последующем введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдали депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль. В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 152 ± 20 нМ ($n = 7$; $p < 0.05$). Сходные результаты мы получили при использовании 10 мкМ ЦПК. В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызываемой ЦПК, составило 26 ± 9 нМ ($n = 7$; $p < 0.05$), а во время входа Ca^{2+} в макрофаги – 141 ± 22 нМ ($n = 7$; $p < 0.05$).

Показано, что преинкубация макрофагов с 30 мкг/мл галоперидола в течение 20 мин до введения 0.5 мкМ ТГ вызывала подавление обеих фаз Ca^{2+} -ответа, индуцируемого ТГ. В среднем галоперидол подавлял фазу мобилизации Ca^{2+} из депо на 23.2 ± 7.9 % ($n = 7$; $p < 0.05$), а последующий депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги – на 42.3 ± 13.6 % ($n = 7$; $p < 0.05$). Сходные результаты были получены в опытах с применением 10 мкМ ЦПК. В среднем галоперидол вызывал подавление мобилизации Ca^{2+} из депо на 25.9 ± 8.0 % ($n = 7$; $p < 0.05$) и подавление входа Ca^{2+} на 43.8 ± 12.5 % ($n = 7$; $p < 0.05$), индуцируемых ЦПК. Это свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 в активации депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого ТГ или ЦПК в макрофагах.

Кроме того, обнаружено, что добавление 30 мкг/мл галоперидола на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцированного ТГ или ЦПК, вызывает значительное подавление депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги. Так, подавление входа Ca^{2+} составило: 48.5 ± 17.1 % ($n = 7$; $p < 0.05$) для ТГ и 48.1 ± 16.9 % ($n = 7$; $p < 0.05$) для ЦПК. Это свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 не только в активации, но и в поддержании депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги.

Влияние галоперидола на Ca^{2+} -ответы, вызываемые глутоксимом и моликсаном в макрофагах. В контрольных экспериментах было показано, что инкубация макрофагов в течение 20 мин со 100 мкг/мл глутоксима или 100 мкг/мл моликсана в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо. Через 20 мин после добавления агентов $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в среднем увеличивалась от базального уровня, равного 90 ± 18 , до 135 ± 18 нМ ($n = 7$; $p < 0.05$) для глутоксима и 134 ± 20 нМ ($n = 6$; $p < 0.05$) для моликсана. При введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдали дальнейшее повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль. В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 223 ± 22 нМ ($n = 7$; $p < 0.05$) и 202 ± 20 нМ ($n = 6$; $p < 0.05$) для глутоксима и моликсана соответственно.

Обнаружено, что преинкубация макрофагов с 30 мкг/мл галоперидола в течение 6 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима приводила к значительному подавлению как мобилизации Ca^{2+} из депо (на 50.3 ± 8.4 %, $n = 7$; $p < 0.05$), так и последующего депозависимого входа Ca^{2+} в клетку (на 54.5 ± 9.5 %, $n = 7$; $p < 0.05$), индуцируемых глутоксимом. Сходные данные были получены в опытах по влиянию 30 мкг/мл галоперидола на Ca^{2+} -ответы, вызываемые 100 мкг/мл моликсана. В среднем галоперидол вызывал подавление мобилизации Ca^{2+} из депо на 49.3 % ($n = 7$; $p < 0.05$) и подавление входа Ca^{2+} в клетки на 47.6 % ($n = 7$; $p < 0.05$), индуцируемых моликсаном. Это свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 в активации депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого глутоксимом или моликсаном, в макрофагах. Кроме того, выявлено, что добавление 50 мкг/мл галоперидола на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцированного глутоксимом или моликсаном, вызывает значительное (на 51.4 ± 9.0 %, $n = 12$; $p < 0.05$) подавление депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги.

Таким образом, мы впервые на перитонеальных макрофагах крысы показали, что антагонист рецепторов сигма-1 нейролептик галоперидол значительно подавляет обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызываемых иммуномодуляторами глутоксимом и моликсаном, а также ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз ТГ и ЦПК, в перитонеальных макрофагах. Полученные данные свидетельствуют о возможном участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, вызываемом глутоксимом или моликсаном и приводящем к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах, а также об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах. Результаты указывают также на нежелательность совместного применения в клинической практике препаратов глутоксим или моликсан и нейролептика галоперидола.

Масс-спектрометрическое исследование влияния нейропротекторного препарата NT-1505 на структуру и липидный профиль мембран микросом печени мышей

Герасимов Н.Ю.^{1*}, Неврова О.В.¹, Голощапов А.Н.¹

¹ИБХФ РАН;

n.yu.gerasimov@gmail.com

Все попытки описать клиническую картину проявлений различных форм деменций в совокупности с мировыми исследованиями по данной проблематике не дают понимания о патогенетических механизмах их развития. Наша работа является новой попыткой получить ответы по установлению механизмов развития и переместить фокус исследований на изменения липидного профиля мембран и их ключевую роль в процессах дегенерации.

В работе были изучены липидный состав и структурные характеристики мембран микросом печени мышей в присутствии препарата нейропротекторного типа NT-1505. 15 самцам беспородных мышей хронически внутрибрюшинно вводился препарат NT-1505 в концентрациях 10^{-4} М и 10^{-14} М. Микросомы выделяли методом дифференциального центрифугирования. Качественный и количественный состав липидов исследованных микросом определяли методом масс-спектрометрии. Для изучения состава липидов с помощью масс-спектрометрии из микросом печени выделяли липиды в хлороформном экстракте, доведенном до концентрации 0,01 М. Полученные образцы липидов разводили в растворе однопроцентной уксусной кислоты с добавлением 5 мМ ацетата аммония до концентрации 500 нМ. С помощью электронного парамагнитного резонанса спиновых зондов исследовали микровязкость мембран микросом. В качестве зондов использовали стабильные нитроксильные радикалы.

Было показано, что 10^{-4} М NT-1505 увеличивал микровязкость мембран микросом печени мышей. Однако, необходимо учитывать, что усиление процессов пероксидного окисления липидов может изменять жирно-кислотный состав липидов мембран, путем окисления ненасыщенных жирных кислот. Что, в свою очередь приводит к дезорганизации структуры мембран вплоть до полного их разрушения. Поэтому необходимо быть осторожным при использовании исследуемого препарата в концентрации 10^{-4} М в лечении деменции альцгеймеровского типа.

NT-1505 в концентрации 10^{-14} М уменьшал текучесть мембран микросом печени мышей. А также, наблюдалось увеличение количества длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот, которые необходимы при развитии нервной системы. Таким образом, использование нейропротектора NT-1505 в сверхмалых концентрациях может оказаться полезным при лечении нейродегенеративных процессов и, в частности, болезни Альцгеймера.

Математическая модель функционирования потенциал-зависимых ионных каналов со многими воротными частицами в виде уравнений Колмогорова

Кручинина А.П.^{1*}, Куликовская Н.В.¹
¹Москва, МГУ имени М.В.Ломоносова;
a.kruch@moids.ru

Для математического моделирования функционирования вестибулярного аппарата животных потребовалось детальное описание всех типов ионных потенциал-зависимых каналов. Многочисленные исследования морфологии и электрофизиологии волосковых клеток показали, что существует определённый набор ионных потенциал-зависимых каналов калия в базолатеральной части мембран волосковых клеток. Характеристики изменения потенциала волосковых клеток на действующие динамический или электрический стимулы сильно различаются из-за разного соотношения между числом каналов каждого типа в мембранах конкретных клеток.

В работе Ходжина и Хаксли 1952 года сформулирована основная гипотеза: проводимость каждого отдельного ионного канала зависит от совокупного состояния k воротных частиц независимо друг от друга переключающихся между открытым и закрытым состояниями в случайные моменты времени. Причём, скорость (интенсивность) случайного потока событий, определяющих моменты таких переключений, зависит только от разности потенциалов на двух сторонах мембраны клетки.

Если все k воротные частицы в ионном канале включены последовательно и управляются независимыми потоками событий, то кинетика канала может быть смоделирована процессом «рождения и гибели» с числом состояний $k+1$, связанных между собой вероятностями перехода, которые также будем называть потоками с интенсивностями, a и b .

В каждый момент времени все каналы, у которых открыты i ворот из k имеющихся, находятся в состоянии S_i . Каждому состоянию поставим в соответствие значение вероятности $P(i,t)$. Когда все k каналов открыты, то советующая вероятность определяет долю времени, в течение которой канал открыт, т.е. проводимость ионного канала равна максимальной величине вероятности открытия всех воротных частиц канала.

Открытия и закрытие воротных частиц будем моделировать процессом «рождения и гибели» – это процессе с конечным числом дискретных состояний и непрерывным временем является марковским процессом, если все управляющие потоки являются пуассоновскими и взаимно независимыми. В этом случае изменение вероятностей $P(i,t)$ описывается системой линейных дифференциальных уравнений Колмогорова k -ого порядка. Поскольку, рассматривается режим Volt-Clamp, то считаем, что интенсивности всех пуассоновских процессов независят от времени, и уравнения Колмогорова приобретают линейный вид с постоянными коэффициентами. Такие уравнения имеют стационарное устойчивое решение – стационарную вероятность, а переходные процессы для коммутируемых токов представляют собой взвешенные суммы экспонент с отрицательными показателями $-t/T_i(V)$, где $T_i(V)$ – постоянные времени переходных процессов, t – время. Для стационарных вероятностей и

постоянных времени переходных процессов существуют аналитические выражения через вероятности перехода между состоянием с разным числом открытых воротных частиц a и b . Опираясь на эти соотношения возможно определяя значения стационарных вероятностей и постоянных времени переходных процессов по регистрируемому изменению тока, получить экспериментальные значения интенсивностей переходов для всех значений потенциала. Наиболее простым является случай, когда у всех воротных частиц в канале интенсивности переходов между открытым и закрытым состояниями одинаковы и интенсивности обратных переходов тоже совпадают.

Следующим шагом получим аналитическое описание интенсивностей перехода при произвольном значении потенциала мембраны клетки. Это позволит описывать ионные потенциал-зависимые токи в виде уравнений Колмогорова и в случаях изменяющегося во времени потенциала V .

Интенсивности a и b опишем экспоненциальными функциями вида:

$$a(V) = f(u(V)/1 - \exp(-u(V))),$$

$$b(V) = g(w(V)) = \exp(-w(V)),$$

где $u(V)$ и $w(V)$ – линейные функции V . Задача аппроксимации a и b сводится к поиску коэффициентов линейных $u(V)$ и $w(V)$. Для поиска используется квазирегулярный метод наименьших квадратов. В работе на основе описанных в публикациях экспериментов получены коэффициенты для всех известных калиевых токов волосковых клеток вестибулярных органов животных.

Отметим, что приводимый анализ функционирования ионных каналов со многими воротными частицами объяснить некоторые значительные разногласия при определении интенсивности случайных потоков отдельных воротных частиц. Ходжин и Хаксли определяли интенсивности переходов для одной воротной частицы, выбрав вид их аналитического представления. При вычислениях они использовали протоколы, соответствующие режимам активации каналов, указав, что деактивация происходит по простой экспоненте. Подробного анализа деактивации в их работах не приводится.

Возможно, для нейрона эти режимы менее заметны, чем режимы активации. Однако, для описания мембранного потенциала волосковых клеток вестибулярных органов существенно описание их функционирования в области потенциала покоя. В этом диапазоне постоянные времени максимальны, а их восстановление из опытных данных затруднено из-за малых амплитуд тока и больших, в сравнении с полезным сигналом, шумов. Если при выборе длительности интервала записи изменения тока в режиме Volt-Clamp ориентироваться на длительность переходных процессов при потенциалах близких к потенциалу покоя клетки, то рассмотрение конечного отрезка записи содержит значимую информацию. Постоянная времени, определенная по конечному отрезку записей соответствует составляющей с самым большим значением постоянной времени T . Используя эту оценку τ , можно выяснить присутствуют ли составляющие с постоянными времени близкими к $T/2$, $T/3$ и т.д. на начальном отрезке наблюдения. Наличие таких составляющих говорит о числе однотипных воротных частиц, которое инициализирует математическую модель на основе уравнений Колмогорова. Если быстрые составляющие имеют постоянные времени далекие от $T/2$, $T/3$, ..., то можно предположить, что воротные частицы в канале неоднородны. Определение времен переходных процессов для диапазона потенциала близкого к потенциалу покоя возможно по данным о деактивации мембраны на гиперполяризованных потенциалах.

Медленные изменения электростатических потенциалов при фотоиндуцированном освобождении протонов на поверхности липидной мембраны

Соколов В.С.^{1*}, Ташкин В.Ю.¹, Харитонов Ю.В.¹, Зыкова Д.Д.¹, Галимзянов Т.Р.¹

¹ИФХЭ РАН;

sokolovvs@mail.ru

В исследованиях механизмов протонного транспорта через мембрану особый интерес вызывают свойства протонов на поверхности мембраны. Предполагают, что их выход в водный раствор затруднен из-за потенциального барьера, образованного слоем ориентированных на поверхности молекул воды, из-за чего перенос протонов между расположенными в мембране донором и акцептором происходит внутри этого слоя. Для обоснования таких механизмов существенную роль играет оценка высоты потенциального барьера, что можно сделать, исследуя кинетику обмена протонов между мембраной и водой. Быстрый выброс протонов на границе мембраны осуществляют с помощью фотоактивируемых соединений, молекулы которых освобождают протоны при возбуждении светом. Для таких исследований необходимы методы регистрации связанных на мембране протонов, самые популярные из которых основаны на использовании флуоресцентных зондов. Однако, протоны на мембране можно регистрировать и с помощью измерения электростатического потенциала на ее границе. Ранее мы изучали изменения электрических характеристик бислоистой липидной мембраны (БЛМ) при фотоактивации 2-метокси-5-нитрофенилсульфата натрия (MNPS). У его молекулы при возбуждении УФ светом

отрывается связанная с ней сульфогруппа и освобождается протон. Было показано, что при освещении БЛМ с адсорбированными на ней молекулами MNPS вспышкой УФ света происходит изменение ее емкости и граничного потенциала (ГП) [1]. Восстановление потенциала в темноте происходило довольно медленно, за времена порядка минуты. Для выяснения природы этих медленных процессов в настоящей работе изучались изменения ГП и емкости мембраны при фотоактивированном освобождении протонов на границе мембраны из адсорбированных на БЛМ молекул под действием постоянного света.

Изменения ГП измеряли методом компенсации внутримембранного поля [1]. При освещении БЛМ, сформированной из фосфатидилхолина, с адсорбированными на ней анионами MNPS (светодиодом, длина волны 375 нм, электрическая мощность варьировалась от 0.1 до 0.8 Вт), наблюдались обратимые изменения ГП и емкости мембраны. В изменение ГП вносят вклад как исчезновение на мембране анионов MNPS, так и связывание на ней протонов. Для определения вклада протонов разработана теоретическая модель, которая учитывает разрушение молекул MNPS на поверхности мембраны, сопряженное с освобождением протонов, а также обмен молекул MNPS и протонов между поверхностью мембраны и водным раствором. Стационарное изменение потенциала, вызванное протонами, зависело от интенсивности освещения, концентрации MNPS, буфера и pH раствора. Наиболее сильное изменение потенциала наблюдалось при высоких pH около 9, при уменьшении pH оно уменьшалось и при pH менее 6 исчезало. Зависимость от pH изменения емкости мембраны было противоположным: при уменьшении pH изменение емкости возрастало. Характерное время изменения потенциала при освещении и его восстановления в темноте составляло более 30 сек. Кинетика изменения потенциала зависела от скорости перемешивания растворов в ячейке.

Вызванные освещением изменения ГП существенно возрастали, если в БЛМ встраивали молекулы, заряд которых зависит от pH. Мы встраивали в БЛМ молекулы стирильных красителей di-4-ANEPPS или RH-421, которые адсорбируются на БЛМ в нейтральном виде и изменяют дипольный потенциал мембраны. Молекула красителя может также присоединять протон, превращаясь в заряженную форму, которая не способна адсорбироваться на БЛМ. При освещении БЛМ с адсорбированными на ней молекулами MNPS и стирильных красителей наблюдались изменения потенциала, вызванные уходом из мембраны молекул красителей, присоединивших протоны.

Полученные результаты свидетельствуют, что кинетика изменения потенциала, вызванного протонированием мембраны при фотоиндуцированном распаде молекул MNPS на поверхности БЛМ, определяется изменением концентрации протонов в перемешиваемых слоях воды около мембраны, а величина изменения потенциала – зависимостью граничного потенциала БЛМ от pH. Заряд БЛМ из фосфатидилхолина сильнее всего изменялся в области pH от 6 до 9, где и наблюдались заметные изменения потенциала при фотоактивации MNPS. Получена оценка относительного изменения концентрации связанных на поверхности мембраны протонов при освещении мембраны с адсорбированными на ней молекулами MNPS, составляющая примерно два порядка.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РФФИ № 23-24-00571.

1. В. Ю. Ташкин, В. Е. Вишнякова, А. А. Щербаков, О. А. Финогенова, Ю. А. Ермаков, В. С. Соколов. Изменение емкости и граничного потенциала бислоидной липидной мембраны при быстром освобождении протонов на ее поверхности. Биологические мембраны 36 (2):101-108, 2019

Молекулярно-динамический метод определения упругих параметров липидных мембран, основанный на измерении зависимости профилей латерального давления плоских липидных бислоев от латерального натяжения и окружающего давления

Калуцкий М.А.¹, Галимзянов Т.Р.¹, Пинигин К.В.^{2*}

¹Национальный исследовательский технологический университет МИСИС;

²Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН;

pinigin@phystech.edu

Липидные мембраны являются важной структурной составляющей живых клеток, образуя слабопроницаемые оболочки как для клеток в целом, так и для клеточных органелл. Существуют большое количество клеточных явлений, сопряженных с деформациями липидных мембран: слияние, деление, порация, встраивание в мембрану мембранных белков, мембранно-опосредованное взаимодействие между мембранными включениями, деформации на границе фазового разделения и др. Для анализа данных деформаций липидная мембрана может быть рассмотрена как непрерывная упругая среда, жидкая в латеральном направлении. Ключевую роль в описании мембранных деформаций играют упругие параметры липидных мембран, так как именно эти параметры определяют энергетические барьеры и характерные времена протекания процессов,

сопряженных с деформациями мембран. Липидные мембраны живых клеток являются многокомпонентными, что позволяет клеткам изменять упругие параметры липидных мембран путем вариации липидного состава и тем самым регулировать протекание процессов, в которых задействованы деформации мембран. Таким образом, анализ упругих параметров многокомпонентных липидных мембран важен для изучения того, как клетки осуществляют данную регуляцию. В данной работе [1] предложен молекулярно-динамический метод определения следующих упругих параметров многокомпонентных липидных мембран: монослойный модуль растяжения-сжатия, монослойный модуль изгиба, монослойная спонтанная кривизна, положение нейтральной поверхности и локальный коэффициент Пуассона. Метод основан на измерении зависимости профилей латерального давления плоских липидных бислоев от латерального натяжения и окружающего давления. Использование плоских липидных бислоев позволяет исключить перераспределение липидов в области с разной кривизной, затрудняющее определение собственных упругих параметров липидных смесей в других методах [2], в которых используются искривленные липидные мембраны. Предложенный метод является обобщением и существенным пересмотром метода работы [3]. Показана необходимость существенной поправки к данному методу, не учет которой может приводить к систематической ошибке значений определяемых упругих параметров, достигающей ~25%. Вместо определения локального модуля растяжения-сжатия согласно работе [3] предложен значительно упрощенный способ определения упругих параметров, основанный на нахождении производных от моментов локального натяжения по растяжению. Из предположения о глобальной несжимаемости липидных монослоев получено выражение для локального коэффициента Пуассона, которое позволяет более точно определять значения упругих параметров. В случае квадратичной упругой энергии и локальной несжимаемости получено соотношение между модулем гауссовой кривизны как функции растяжения и модулем изгиба. Метод применен к мембранам из дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ) и их смеси. Показано, что модуль изгиба смеси данных липидов не подчиняется классическому усреднению Ройса.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-24-00661).

Список литературы:

1. Kalutskii, M.A., Galimzyanov T.R., Pinigin K.V. Determination of elastic parameters of lipid membranes from simulation under varied external pressure // Phys. Rev. E. Работа принята к публикации.
2. Pinigin, K.V. Determination of Elastic Parameters of Lipid Membranes with Molecular Dynamics: A Review of Approaches and Theoretical Aspects // Membranes. – 2022. – Т. 12. – С. 1149.
3. Campelo, F., Arnarez, C., Marrink, S.J., Kozlov, M.M. Helfrich model of membrane bending: From Gibbs theory of liquid interfaces to membranes as thick anisotropic elastic layers // Adv. Colloid Interface Sci. – 2014. – Т. 208. – С. 25–33.

Моликсан модулирует транспорт Na^+ в коже лягушки

Мельницкая А.В.^{1*}, Крутецкая З.И.¹, Бадюлина В.И.¹, Антонов В.Г.², Крутецкая Н.И.¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет;

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия;
a.melnitskaya@spbu.ru

Исследование механизмов трансэпителиального транспорта веществ является интенсивно развивающимся направлением современной биофизики, физиологии и медицины. Классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны являются кожа и мочевой пузырь амфибий.

Транспорт Na^+ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие различные Na^+ - транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки, которые являются мишенью для окислительного стресса. Многочисленные остатки цистеина, локализованные в различных сегментах этих белков, определяют их редокс-чувствительность и являются мишенью для действия внутри - и внеклеточных окисляющих и восстанавливающих агентов.

Фармакологические аналоги окисленного глутатиона (GSSG) глутоксим® (динатриевая соль GSSG с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) и моликсан® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина, «ФАРМА-ВАМ») используются как иммуномодуляторы и цитопротекторы в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний. Эти препараты оказывают комплексное влияние на процессы редокс-регуляции в клетках, однако тонкие биофизические механизмы их действия далеки от полного понимания.

Ранее нами было обнаружено, что GSSG и глутоксим модулируют транспорт Na^+ в коже лягушки. Обнаружено, что приложение этих агентов со стороны апикальной поверхности кожи подавляет транспорт Na^+ , тогда как при добавлении со стороны базолатеральной поверхности кожи, GSSG и глутоксим имитируют действие инсулина и стимулируют транспорт Na^+ . В связи с этим, целью настоящей работы было исследование влияния другого дисульфидсодержащего препарата моликсана на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки.

Для измерения электрических параметров кожи лягушки *Rana temporaria* использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ). Для измерения ВАХ на кожу подавали линейно изменяющееся напряжение (ramp) со скоростью 20 мВ/с. В интервалах между измерениями ВАХ трансэпителиальный потенциал (VT) кожи поддерживали при 0 мВ (режим короткого замыкания) или при потенциале открытой цепи VOC (VOC = VT при трансэпителиальном токе IT = 0). Из ВАХ определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания ISC (ISC = IT при VT = 0), VOC и трансэпителиальную проводимость gT. Транспорт Na^+ оценивали как амилорид-чувствительный ISC. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC) амилорид (20 мкМ). Статистический анализ проводили с применением t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $\bar{x} \pm \text{sx}$. Достоверными считали различия при $p \leq 0.05$.

Показано, что обработка апикальной поверхности кожи лягушки моликсаном подавляет транспорт Na^+ . В среднем (здесь и далее n (число опытов) = 10) после приложения 100 мкг/мл моликсана к апикальной поверхности кожи лягушки ISC уменьшается на $15.76 \pm 4.32 \%$, а VOC снижается на $16.42 \pm 6.02 \%$; изменений величины gT не наблюдали. В то же время, после приложения 100 мкг/мл моликсана со стороны базолатеральной поверхности кожи, ISC возрастает на $39.24 \pm 7.17 \%$, VOC возрастает на $41.21 \pm 10.08 \%$; величина gT также не изменяется.

Ингибирующее влияние моликсана может быть связано с его способностью взаимодействовать с функционально значимыми остатками цистеина Na^+ -транспортирующих белков, что приводит к ингибированию их активности и подавлению транспорта Na^+ . Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым ENaC и другие Na^+ -транспортирующие белки быстро и обратимо ингибируются агентами, окисляющими SH-группы остатков цистеина. В то же время, моликсан, приложенный со стороны базолатеральной поверхности кожи, имитирует действие инсулина и стимулирует транспорт Na^+ . Полученные результаты согласуются с полученными нами ранее данными, а также с данными литературы о способности GSSG и глутоксима оказывать рецептор-опосредованное влияние на клеточные процессы. Можно предположить, что GSSG и его фармакологические аналоги глутоксим и моликсан могут взаимодействовать с богатыми цистеином экстраклеточными доменами α -субъединиц инсулинового рецептора и вызывать трансактивацию рецептора, что приводит к активации Na^+ -транспортирующих белков и стимуляции транспорта Na^+ .

Известно, что ключевые Na^+ - транспортирующие белки (ENaC, Na^+ -K⁺ - АТФазы и Na^+ /H⁺ - обменники) содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенями для действия внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей. Однако добавление блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, вызывало полное подавление транспорта Na^+ . Можно предположить, что влияние моликсана на транспорт Na^+ обусловлено, в основном, модуляцией активности ENaC.

Таким образом, в настоящей работе показано модулирующее влияние моликсана на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. Полученные результаты свидетельствуют также о том, что моликсан, GSSG и глутоксим однонаправленно модулируют транспорт Na^+ в коже лягушки. Можно предположить, что эффект этих дисульфидсодержащих окислителей на транспорт Na^+ опосредован сходными регуляторными механизмами.

Наномеханические сигнатуры клеток культур глиом раннего пассажа зависят от экспрессии маркера CD44 в случае отсутствия мутации в гене IDH1, и не зависят в случае наличия мутации IDH1R132H

Шмелев М.Е.^{1*}, Фарниев В.М.¹, Швед Н.А.^{1,2}, Кумейко В.В.^{1,2}

¹Дальневосточный федеральный университет;

²Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН;
shmelev.m.e@gmail.com

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является сравнительно новым методом в биомедицине, обеспечивая оценку морфологических и функциональных характеристик раковых клеток и их микроокружения, ответственных за инвазию и прогрессирование опухоли.

Материалы и методы:

В ходе данной работы было применено АСМ-картирование высокого разрешения большого числа клеток. Мы проанализировали наномеханические свойства культур клеток глиом раннего пассажа с различным мутационным статусом IDH1 R132H. В ходе анализа каждая культура клеток была дополнительно кластеризована по наличию маркера CD44 для выявления возможных наномеханических признаков, которые дифференцируют фенотипы клеток, различающиеся по пролиферативной активности и характерному поверхностному маркеру.

Результаты:

Мутантные клетки IDH1 R132H по сравнению с клетками IDH1 дикого типа (IDH1wt) характеризуются двукратным увеличением жесткости и 1,5-кратным модулем упругости. Клетки CD44+/IDH1wt были в два раза жестче и значительно жестче, чем клетки CD44-/IDH1wt. В отличие от клеток дикого типа IDH1, CD44+/IDH1 R132H и CD44-/IDH1 R132H не проявляли наномеханических признаков, обеспечивающих статистически достоверную дифференциацию этих субпопуляций. Медианные значения жесткости клеток зависят от наличия мутации и маркирования CD44: IDH1 R132H mt (4,7 мН/м), CD44+/IDH1wt (3,7 мН/м), CD44-/IDH1wt (2,5 мН/м). Полученные результаты указывают на то, что количественное наномеханическое картирование может стать многообещающим методом быстрого анализа клеточной популяции, пригодного для детальной диагностики и персонализированного лечения форм глиомы.

Наночастицы с липоевой кислотой и глутатионом

Иншакова А.М.^{1*}, Щелконогов В.А.^{1,2,3}, Евстратова А.Ю.¹, Ал Ниссафи Л.¹, Шастина Н.С.¹, Баранова О.А.^{2,3}, Чеканов А.В.^{2,3}, Соловьева Э.Ю.², Федин А.И.²

¹МИРЭА - Российский Технологический Университет;

²ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И.

Пирогова Минздрава России.;

³ФИРЭ им. В.А. Котельникова РАН;

aminshakova@yandex.ru

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) поддерживает гомеостаз в головном мозге за счет избирательного транспорта метаболитических соединений, что препятствует свободному проникновению через ГЭБ многих высокопотенциальных лекарственных препаратов. Рецепторы глутатиона в головном мозге в основном локализованы в клетках нейроглии. Доказано, что транспорт глутатиона в клетки головного мозга осуществляется с помощью специфического механизма адсорбционно-опосредованного эндоцитоза. Эндоцитарные пути активируются внутри клеток с использованием направляющего фрагмента или лиганда, который применяется в качестве вектора. Наноразмерные системы доставки лекарственных препаратов широко используются в качестве стратегии проникновения через ГЭБ и улучшения транспорта лекарств в центральную нервную систему (ЦНС). Наночастицы с глутатионом (липосомы, мицеллы и др.) продемонстрировали огромный потенциал, как в нацеливании, так и в улучшении проникновения лекарственных компонентов в мозг. Известно, что глутатион (GSH) является нестабильным трипептидом, однако, несмотря на широкое применение, его стабильность до сих пор в значительной степени не изучена [1,2]. Вследствие этого целью работы является разработка нанодисперсных форм глутатиона и липоевой кислоты для улучшенной доставки антиоксидантов в клетки головного мозга.

Методом спонтанного эмульгирования были получены гомогенные (PDI<0.3) наноэмульсии с ЛК и глутатионом на основе фосфатидилхолина и Плуроника Ф68 с размером частиц от 106 до 148 нм. Также была разработана гетерогенная нанодисперсия с ЛК и GSH на основе Ф68, состоящая из 2 фракций частиц: 40-60 нм (15%) и 120-280 нм (85%). Полученные нанодисперсии были электронейтральными.

Наночастицы с антиоксидантами характеризуются высокой дисперсионной стабильностью при длительном хранении (более 3 месяцев) при комнатной температуре и являются перспективными кандидатами для дальнейшей оценки их антиоксидантного и антиагрегантного действия в экспериментах in vitro.

Список используемой литературы.

1. Reginald-Opараа J.N., Svirskisa D., O'Carrollb S. J., Sreebhavanc S., Deand J. M., Wua Z. Optimisation of glutathione conjugation to liposomes quantified with a validated HPLC assay. Int. J. Pharm. 2019. V.567. P.118451-118461.

2. Heba F. S., Sayed M. A., Ashraf E. H., Mahmoud M. O. Targeting brain cells with glutathione-modulated nanoliposomes: in vitro and in vivo study. Drug Des. Devel. Ther. 2015. V.9. P. 3705-3727.

Нарушение принципа «один нейрон – один рецептор» в экспрессии генов хеморецепторов в нейронах обонятельного эпителия позвоночных – случайность или детерминированное явление

Копылова Е.Е.^{1*}, Кабанова Н.В.¹, Ковалицкая Ю.А.¹, Коваленко Н.П.¹, Масулис И.С.¹, Быстрова М.Ф.¹
¹*Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;*
ikopylov76@gmail.com

Популяция нейронов обонятельного эпителия позвоночных представляет собой матрицу хемосенсорных элементов, способных к распознаванию широкого спектра соединений. Способность к дифференцированному детектированию различных по химической природе веществ обеспечивается специализацией сенсорных клеток на уровне экспрессии обонятельных рецепторов (ОР), в свою очередь, определяющих направленность афферентных волокон в соответствующий отдел обонятельной луковицы. Молекулярной основой для избирательного распознавания обонятельных стимулов традиционно считается реализация принципа «один нейрон – один рецептор» в зрелых обонятельных нейронах. Механизмы избирательной экспрессии одного из многочисленных рецепторных генов (1360 у мыши, 816 – у человека, 811 – у псовых) детально не установлены. Предполагается, что в индивидуальном нейроне селекция гена рецепторного белка осуществляется за счет модификации гетерохроматина с участием деметилаз, привлечения транскрипционных факторов Lhx2 и Ebf, формирования внутри- и межхромосомных контактов, обеспечивающих доступность генетических локусов для транскрипции. Однако, данные транскриптомного анализа, указывают на возможность экспрессии нескольких (от 2 до 9) рецепторных генов в зрелых обонятельных нейронах. Эти результаты могут быть обусловлены автоматизированной сортировкой клеток, не исключающей присутствие в образце примесей мРНК соседних клеток. Применение метода, позволяющего избежать попадания примесей мРНК из соседних клеток в анализируемый образец, позволит обойти эту проблему. В представленной работе был усовершенствован метод получения диссоциированных жизнеспособных одиночных нейронов. Нами были отобраны одиночные зрелые нейроны, идентифицированные по присутствию маркера OMP. Из одиночных лизированных клеток была выделена тотальная кДНК, которая была использована для получения ПЦР-фрагментов с универсальными вырожденными праймерами к генам ОР. Продукты ПЦР соответствующей одиночной клетки были клонированы в плазмиду pJET1.2, т.е. были созданы клонотеки, содержащие в составе вектора фрагменты белок-кодирующей области всех генов ОР, представленных в данной клетке. Для секвенирования использовано от 20 до 40 клонов для каждой клетки, что представляет репрезентативное количество для оценки гомогенности клонированных фрагментов. Идентификацию генов ОР проводили путем выравнивания нуклеотидных последовательностей отсекаемых образцов клонотеки на геном *Mus musculus* (C57BL/6J, RefSeq GCF_000001635.27) с помощью ресурса BLAST.

Было проанализировано 10 индивидуальных обонятельных нейронов. Обнаружено три варианта представленности транскриптов в индивидуальном нейроне. В первом случае однозначно выявляется экспрессия одного рецептора. Во втором варианте детектируется два рецептора, с очевидным превалированием одного транскрипта. В третьем случае – обнаруживаются от двух до четырех рецепторов. Для этого варианта нейронов мажорные множественные транскрипты присутствуют в следующих сочетаниях: Or8k35 и Or4c109 (60,7 и 32,14 % соответственно); Or6z6 и Or4c116 (57,7 и 34,6%); Or4p8 и Or6z6 (68,4 и 21,1%); Or4e1 и Or4c113 (48 и 36%). В тех случаях, когда в нейроне обнаруживается один превалирующий вариант транскрипта гена ОР (второй вариант), соответствующие гены обладают как достаточно высоким уровнем экспрессии в популяции клеток, по данным Ibarra-Soria и соавт. - Or6p1, Or4c117, Or4e1, Or6z7, так и минимальным уровнем в случае гена Or4c113. Это указывает на высокую чувствительность метода детектирования транскриптов, использованного в данной работе. При множественной экспрессии генов ОР для пары Or6z6/Or4c116 ген Or6z6 при популяционном секвенировании превосходит по представленности транскриптов ген Or4c116 в 25 раз, в то время как в индивидуальной клетке - всего в 2 раза. Для пары Or4p8/Or6z6 наблюдается обратное соотношение: ген Or6z6, более активный в смешанной популяции, при одновременной экспрессии с другим сопутствующим партнером в отдельном нейроне представлен меньшим количеством продукта. В обоих случаях транскрипция Or6z6, локализованного на хромосоме 7, сопряжена с активацией генов Or4c116 либо Or4p8, расположенных на хромосоме 2. Хромосома 2 наиболее обогащена генами ОР, сгруппированными в три дистанцированных друг от друга кластера. Не исключено, что локус хромосомы 7, содержащий Or6z6, образует физические контакты в области протяженного кластера 38 на хромосоме 2, кодирующего 269 генов ОР, включая Or4c116 и Or4p8. Эти гены, удаленные друг от друга на 213 927 н.п., могут входить в состав одного структурного домена при образовании межхромосомных контактов, и возможна их активация синхронно с сопутствующим геном Or6z6 на хромосоме 7. Однако, характерный для индивидуальной клетки профиль экспрессии генов-партнеров, выбор которых продиктован структурными особенностями ДНК в области контактов, допускает альтернативные варианты сочетанной экспрессии. При вовлеченности в транскрипцию нескольких генов ОР, соотношение соответствующих мРНК зависит, скорее, от транскрипционного статуса единовременно экспрессируемых генов,

нежели от индивидуальных особенностей каждого из них. Этот эффект может объясняться динамическими перестройками структуры хроматина, сопутствующими транскрипции, в области межхромосомных контактов и участков связывания регуляторных белков. Полученные результаты позволяют заключить, что в обонятельных нейронах могут экспрессироваться гены как одного, так и нескольких ОР, причем в мультирецепторных клетках выбор сопутствующего гена может носить не случайный характер.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант №22-24-00860.

Нейроны моллюска как тестовая система для изучения токсичности митохондриальных разобщителей окислительного фосфорилирования.

Попова Л.Б.^{1*}, Кирсанов Р.С.¹, Краснов В.С.^{1,2}, Хайлова Л.С.¹, Коршунова Г.А.¹, Котова Е.А.¹,
Антоненко Ю.Н.¹

¹МГУ имени Ломоносова, НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского;

²МГУ имени Ломоносова, Химический факультет;

lala@belozersky.msu.ru

Разобщители окислительного фосфорилирования «рассеивают» протонный градиент на внутренней мембране митохондрий, транспортируя протоны обратно в митохондрии минуя АТФ-синтазу и приводя тем самым к разобщению окисления и фосфорилирования в митохондриях. Умеренная степень разобщения может быть полезна в терапевтических целях. На основе разобщителей могут быть созданы лекарства против ожирения и болезней, связанных с окислительным стрессом, включая нейродегенеративные заболевания. Однако многие известные в настоящее время протонофоры являются высокотоксичными веществами. Необходим поиск новых митохондриальных разобщителей, которые имеют большое окно между разобщающими и токсичными концентрациями. В связи с этим, тесты на токсичность являются ключевыми в вопросе практического применения протонофоров. В качестве тестовой системы для изучения токсичности митохондриальных разобщителей мы разработали и используем изолированную нервную систему моллюска. Преимущества этой тестовой системы: 1) Нейроны находятся в естественной среде, окружены глиальными клетками и нервными оболочками. 2) Ганглии, помещенные в солевой раствор, сохраняют функции. Например, изолированные педалные ганглии продолжают генерировать двигательный ритм, и влияние сенсорных входов незначительно. 3) В ганглиях моллюсков есть крупные нейроны, которые можно идентифицировать в различных препаратах. Это позволяет исследовать свойства индивидуальных нейронов в большом количестве разных экспериментов. 4) Нейроны моллюсков имеют весь основной набор рецепторов и ионных каналов, характерных для млекопитающих. Эксперименты проводили на нейронах изолированных ганглиев прудовика (*Lymnaea stagnalis*). Ганглии вырезали и раскалывали на дне ванночки, заполненной солевым раствором. Мы выделили и исследовали показатели нейронной активности, изменения которых были универсальными для всех изученных нами разобщителей. Добавление разобщителя в омывающий раствор вызывает деполяризацию нейрона, увеличение частоты спайковой активности и уменьшение амплитуды спайков. Уменьшается скорость деполяризации и реполяризации мембраны во время генерации спайка, что приводит к его расширению. Со временем клетка совсем прекращает генерировать спайки. В предлагаемой системе мы исследовали как классические митохондриальные разобщители, такие как CCCP, FCCP и DNP, так и новые разобщители, синтезированные в нашем институте. Разобщители отличаются по эффективной концентрации и по времени развития эффекта. Более слабое влияние на мембранный потенциал и спайковую активность нейрона соответствует меньшей токсичности разобщителя. Классические протонофоры CCCP и FCCP в концентрации 2 – 10 мкМ изменяли спайковую активность нейронов через 2 – 10 минут. Полное прекращение спайковой активности наблюдалось через 20 – 40 минут. В отличие от них DNP, который длительное время использовали как лекарство от ожирения, влиял на спайковую активность в концентрации 200 – 500 мкМ. Вновь синтезированный в нашем институте митохондриальный разобщитель протонофорного типа митофлуоресцеин (mitoFluo) представляет собой конъюгат флуоресцеина с децил(трифенил)фосфонием [1,2]. Качественно влияние mitoFluo подобно действию CCCP, но проявляется при больших концентрациях (10 – 20 мкМ) и при гораздо более длительном воздействии (2 – 2,5 часа). Другой вновь синтезированный протонофорный разобщитель СМТРР-С10 является сложным эфиром карбоксиметилтрифенилфосфония [3]. В концентрации 10 – 20 мкМ СМТРР-С10 действует на нейроны гораздо мягче и медленнее, чем CCCP. В течение часа после добавления СМТРР-С10 активность нейронов возвращается к норме. Еще одна новая группа разобщителей, производные 7-гидроксикумарина, UB-3-COOCn, проявляли протонофорные свойства, присущие другим митохондриальным разобщителям в экспериментах на липосомах и изолированных митохондриях, но при этом они почти не влияли на активность нейронов [4]. Около 10 лет назад был синтезирован протонофор BAM15 – производное оксадиазолопиразина. В первой статье утверждалось, что он не действует на плазматическую мембрану клеток, и

поэтому не токсичен [5]. Сейчас BAM15 планируют использовать как лекарство в борьбе с ожирением и инсулинорезистентностью, и как геропротектор. В нашей тестовой системе мы показали, что BAM15 в микромолярных концентрациях (5 мкМ) вызывает такое же необратимое подавление электрической активности нейронов, как и СССР, но реакция развивается медленнее, примерно в течение часа. Следовательно, BAM15 токсичен даже в низких концентрациях [6]. Также мы исследовали протонофорную активность широко используемого в быту антимикробного препарата триклозана [7]. В нашей тестовой системе триклозан и СССР оказывают похожее действие на активность нейронов. Но влияние триклозана обнаруживается при более длительном воздействии (40-60 мин.) и требует больших концентраций (10-20 мкМ), что соответствует различию в разобщающей активности триклозана и СССР на митохондриях. Изменения в активности нейронов мы связываем с изменением концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме, так как протонофорные разобщители индуцируют выход кальция из митохондрий, а работа основных нейронных каналов регулируется изменениями внутриклеточной концентрации ионов кальция. Тот факт, что вновь синтезированные протонофорные разобщители оказывали слабое токсическое действие на нейроны, возможно, объясняется тем, что они подвергаются воздействию клеточных ферментов. Например, нами показано, что производные 7-гидроксикумарина UB-3-COOCn гидролизуются митохондриальной альдегиддегидрогеназой (ALDH2) [4].

Сокращения: СССР – карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон; FCCP – карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразон; DNP – 2,4-динитрофенол; UB-3-COOCn – алкиловые эфиры умбеллиферон-3-карбоновой кислоты.

Список литературы: 1. doi: 10.1039/c4cc04996a; 2. doi: 10.1134/S0006297919100043; 3. doi: 10.1016/j.abb.2022.109366; 4. doi: 10.1016/j.bioelechem.2023.108369; 5. doi: 10.1016/j.molmet.2013.11.005; 6. doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107673; 7. doi: 10.1016/j.bbamem.2018.01.008

Нелокально-электростатические аспекты электроосмотического сопряжения между водным потоком и электрическим током в плотных контактах между эпителиальными клетками

Рубашкин А.А.^{1*}, Исерович П.², Рейнах П.С.³

¹ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²Государственный университет Нью-Йорка, Медицинский центр нижнего штата, Бруклин, Нью-Йорк, США ;

³Медицинский университет Вэньчжоу, Кафедра офтальмологии и оптометрии, Вэньчжоу, Китай; andrey.rubashkin@gmail.com

Эпителиальные ткани являются интерфейсом между органами и окружающей средой. Электроосмотическая природа парацеллюлярного транспорта воды в протекающем эпителии была продемонстрирована Дж. Фишбаргом с соавторами в экспериментах на эпителии роговицы глаза кролика *in vitro* [1, 2]. В этой же статье была экспериментально доказана важная роль плотных контактов (ПК) между клетками в генерации электроосмоса. Эти работы показали, что электроосмос в плотных контактах отличается от электроосмоса, описываемого классической теорией Гельмгольца-Смолуховского. Основы теории этого явления были заложены в [3, 4]. В них для расчета изменения энергии сольватации W при переходе ионов в ПК использовалась классическая теория сольватации, основанная на формуле Борна. Однако, для такой структурированной среды, как вода применение формулы Борна некорректно, поскольку расчет по ней дает сильно завышенные значения для W ионов [5]. В настоящем сообщении приведено развитие предыдущих теоретических работ [3, 4], а для расчета W используется нелокально-электростатическая теория, основы которой изложены в монографии [5].

Для анализа электроосмотического связывания в ПК мы использовали систему двух уравнений. Первое – это гидродинамическое уравнение Стокса-Бринкмана, связывающее распределение по сечению ПК скорости воды с напряженностью приложенного электрического поля и с электрическим током в ПК. Второе – уравнение Пуассона, связывающее распределение электростатического потенциала в ПК с концентрациями фиксированных и подвижных электрических зарядов. В оба этих уравнения входят концентрации Na^+ и Cl^- , которые пропорциональны соответствующим коэффициентам распределения ионов (n). Поэтому изменение W ионов при их переходе в ПК определяет характер электроосмотического связывания между водным и ионными потоками. Мы выполнили нелокально электростатический расчет изменения W ионов и коэффициентов распределения между ПК и свободным раствором. Расчет показал, что увеличение корреляционной длины (L) воды в ПК снижает величину n ионов и электропроводности в ПК, а коэффициент связи между потоком воды и электрическим током через ПК увеличивается при росте L . Расчет также показал, что теоретическое значение

связывающего коэффициента совпадает с его экспериментальным значением, ранее определенном в [1], если L воды в ПК увеличивается на 20% по сравнению с ее значением в свободном растворе. Отметим, что увеличение L в ПК обусловлено наличием в них белковых молекул клаудина, а существование этого эффекта было обосновано в [6-7]. Проведенный анализ показывает, что существуют два фактора, которые влияют на возникновение водного транспорта через ПК и его направление. Первый – это увеличение L в ПК по сравнению с ее значением в свободном растворе. Второй – это наличие как электрических зарядов белковых молекул клаудина (распределенных внутри ПК), так и зарядов на мембранах, ограничивающих ПК. Перечислим ряд изменений в ПК, которые являются следствием увеличения L в ПК. 1) увеличение зарядовой селективности Na^+/Cl^- в ПК, 2) снижение электропроводности в ПК по сравнению с ее значением в свободном растворе, 3) увеличение связывающего коэффициента между водным потоком и электрическим током в ПК по сравнению с его рассчитанным значением по классической формуле электроосмоса Гельмгольца-Смолуховского. Эти изменения качественно объясняются следующим образом. Увеличение L приводит к увеличению абсолютной величины изменений W ионов Na^+ и Cl^- при переходе их из свободного раствора в ПК. При этом изменения W сохраняют свои отрицательные значения, поэтому значения n ионов меньше единицы. Из этого следует, что концентрация ионов в ПК ниже, чем в свободном растворе. Последний эффект приводит к уменьшению электропроводности по сравнению с ее значением в свободном растворе, содержащем NaCl . Уменьшение электропроводности вместе с увеличением длины Дебая в ПК приводит к увеличению связывающего коэффициента между водным потоком и электрическим током в ПК по сравнению с его значением, рассчитанным по формуле электроосмоса Гельмгольца-Смолуховского, так как электропроводность находится в знаменателе. Перечисленные эффекты в плотных контактах и определяют отличие электроосмоса в ПК от электроосмоса, описываемого классической теорией Гельмгольца-Смолуховского.

[1] Sanchez J.M., Li Y., Rubashkin A.A., Iserovich P., Wen Q., Ruberti J.W., Smith R.W., Rittenband D., Kuang K., Diecke F.P.J., Fischbarg J. 2002. Evidence for a central role for electro-osmosis in fluid transport by corneal endothelium. *J. Membr Biol.* 187:37–50.

[2] Fischbarg J., Diecke F.P.J., Iserovich P., Rubashkin A.A. 2006. The role of the tight junction in paracellular fluid transport across corneal endothelium. Electro-osmosis as a driving force. *Journal Membrane Biol.* 210: 117–130.

[3] Rubashkin A.A., Iserovich P., Hernandez J.A., Fischbarg J. 2005. Epithelial fluid transport: Protruding macromolecules and space charges can bring about electro-osmotic coupling at the tight junctions. *J. Membrane Biol.* 208:251-263.

[4] Рубашкин А.А. 2006. Модель электроосмоса в протекающих плотных контактах между эпителиальными клетками. Доклады Академии Наук. 407 (3): 408–410.

[5] Воротынцев М.А., Корнышев А.А. Электростатика сред с пространственной дисперсией. Москва, Наука 1993.

[6] Рубашкин А.А., Исерович П. 2018. Расчет Na^+/Cl^- селективности в плотных контактах между эпителиальными клетками методами нелокальной электростатики с полюсными моделями диэлектрической функции без эффекта переэкранирования. *Цитология.* 60(2): 136-143.

[7] Rubashkin A.A., Iserovich P., Vorotyntsev M.A. 2020. Physical origin of Na^+/Cl^- selectivity of tight junctions between epithelial cells. Nonlocal electrostatic approach. *J. Mol. Liq.* 317: 113884-1–113884-18.

Нелокально-электростатический подход к катионной селективности моновалентных катионов в водной полости K^+ канала в биомембране и к зарядовой селективности в плотных контактах между эпителиальными клетками

Рубашкин А.А.^{1*}, Исерович П.², Остроумова О.С.¹

¹ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²Государственный университет Нью-Йорка, Медицинский центр нижнего штата, Бруклин, Нью-Йорк, США ;

andrey.rubashkin@gmail.com

На важность анализа электростатических взаимодействий в водной полости ионного канала в биомембране для объяснения стабилизации катиона в полости указывалось в [1-2]. В [1] не рассматривалось изменение химического потенциала $\Delta\mu$ катиона при его переходе в полость KcsA K^+ канала, поскольку предполагалось, что статическая диэлектрическая проницаемость ϵ в полости не отличается от ϵ воды во внешнем растворе. В [2] рассматривался переход катиона в цилиндрический канал, было показано, что ϵ воды в канале значительно меньше ее значения во внешнем растворе. Однако стабилизацию катиона в канале авторам объяснить не удалось, поскольку для оценки $\Delta\mu$ катиона использовалась классическая формула Борна, расчет по

которой, как известно, дает завышенные величины для энергии сольватации иона W в растворе [3]. По этой причине в [1] значение ϵ в полости и было выбрано равным 80, то есть ее значению в свободном растворе. Поэтому в [4] мы провели анализ возможности применения классической теории сольватации, основанной на формуле Борна, к объяснению как стабилизации катиона в водной полости канала, так и к возникновению катионной селективности в полости. Этот анализ показал невозможность объяснить стабилизацию катиона в полости на основе классической электростатики. В работе [5] мы рассматривали переход катиона из раствора в селективный фильтр канала, причем для расчета W мы использовали нелокально-электростатическую НЭ теорию, основы которой изложены в монографии [3].

В представленном здесь сообщении мы, применяем идеи наших работ [4,5] для моделирования процесса перехода моновалентных катионов в водную полость канала, и используем НЭ теорию для расчета W катиона как в свободном растворе, так и в водной полости канала. Явление возникновения K^+/Na^+ селективности в водной полости (Cav) ионного канала существенно отличается от механизма образования зарядовой селективности в плотных контактах (ПК) между эпителиальными клетками. Основной эффект здесь – различие ΔW для катионов K^+ и Na^+ . Электростатическое взаимодействие иона с зарядами белков, окружающих полость важно для стабилизации катиона в водной полости, но не для возникновения катионной селективности в полости, которая рассчитывается по формуле: $SK/Na(Cav) = \exp[(-\Delta\mu_K)/kT] / \exp[(-\Delta\mu_{Na})/kT]$. Расчет селективности, проведенный по этой формуле предсказывает существование K^+/Na^+ селективности в водной полости нанометровых размеров в пределах $1.4 < SK/Na < 8$. При этом значение ϵ в полости канала варьировалось от 2 до 10. Мы смогли объяснить стабилизацию катиона в полости, что невозможно сделать при таком большом отличии ϵ в полости от ее значения в свободном растворе при использовании классической теории сольватации.

Рассмотрим теперь общее и различие в процессах возникновения катионной селективности в каналах и зарядовой селективности в плотных контактах (ПК) между эпителиальными клетками. Теорию последней мы разработали в [6-8], используя НЭ теорию для расчета энергий сольватации ионов. Было показано, что Na^+/Cl^- возникла вследствие комбинации двух эффектов. Первый из этих эффектов – это электростатическое взаимодействие подвижных ионов с фиксированными зарядами макромолекул клаудина в ПК. Второй эффект – это увеличение корреляционной длины воды в ПК и как следствие – большие отрицательные значения энергий ΔW пересольватации Na^+ и Cl^- , приводящие к их низким концентрациям внутри ПК. Высокая Na^+/Cl^- селективность в ПК обусловлена низкими ионными концентрациями в сочетании с взаимодействиями ионов с отрицательными зарядами клаудина в ПК. В формулу для расчета зарядовой селективности $S_{Na/Cl}$ в ПК входят изменения химических потенциалов ионов ($\Delta\mu = -\Delta W$) и электростатический потенциал в ПК (ϕ_{TJ}): $S_{Na/Cl}(TJ) = \{\exp[(-\Delta\mu_{Na})/kT] / \exp[(-\Delta\mu_{Cl})/kT]\} \exp[-2e\phi_{TJ}/kT]$. Отметим, что последнего сомножителя не было в формуле для катионной селективности.

Как катионную селективность в полости ионного канала, так и зарядовую селективность в плотных контактах невозможно объяснить, пользуясь классической теорией сольватации.

[1] Roux B., MacKinnon R. The Cavity and Pore Helices in the KcsA K^+ Channel:

Electrostatic Stabilization of Monovalent Cations. *Science*, 1999, 285, p. 100–102.

[2] Partenskii M.B., Dorman V., Jordan P.C. Influence of a channel-forming peptide on energy barriers to ion permeation, viewed from a continuum dielectric perspective. *Biophys. J.*, 1994, 67, p. 1429–1438.

[3] Воротынцев М.А., Корнышев А.А. Электростатика сред с пространственной дисперсией. Москва, Наука 1993.

[4] Рубашкин А.А., Остроумова О.С. Расчет K^+/Na^+ селективности в водной полости K^+ канала по классической формуле Борна. *Международный научно-исследовательский журнал*, 2022, № 11(125), с. 1–8.

[5] Рубашкин А. А., Исерович П. Новый подход к селективности ионных каналов: Нелокально-электростатическое рассмотрение. *Доклады Академии Наук*, 2007, 417(1), с. 121–124.

[6] Рубашкин А.А., Исерович П. 2018. Расчет Na^+/Cl^- селективности в плотных контактах между эпителиальными клетками методами нелокальной электростатики с полюсными моделями диэлектрической функции без эффекта переэкранирования. *Цитология*, 2018, 60(2), с. 136–143.

[7] Rubashkin A.A., Iserovich P., Vorotyntsev M.A. Physical origin of Na^+/Cl^- selectivity of tight junctions between epithelial cells. Nonlocal electrostatic approach. *J. Mol. Liq.* 2020, 317, p. 113884-1–113884-18.

[8] Рубашкин А.А., Исерович П., Воротынцев М.А. Теория обращения зарядовой селективности в катион- или анион- селективных плотных контактах между эпителиальными клетками: Нелокально-электростатический подход. *Биофизика*, 2021, 66, с. 99–106.

Особенности реполяризации ПД кардиомиоцитов трехнедельных крыс при аппликации клонидина гидрохлорида

Галиева А.М.^{1*}, Зиятдинова Н.И.¹, Шакиров Р.Р.¹, Биктемирова Р.Г.¹, Зефилов Т.Л.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

galieva_alina94@mail.ru

Активация симпатической нервной системы отвечает за реакцию организма “сражайся или беги”. Физиологические реакции на активацию симпатической нервной системы и мозгового вещества надпочечников опосредуются действием эндогенных катехоламинов норадреналина и адреналина на адренергические рецепторы. Адренергические рецепторы относятся к суперсемейству рецепторов, связанных с G-белком (GPCR). Адренорецепторы делятся на рецепторы α_1 , α_2 , β_1 , β_2 и β_3 . α_2 -адренорецепторы связаны с ингибирующими Gi-белками, которые инактивируют аденилилциклазу, уменьшая выработку циклического аденозинмонофосфата. [1] Помимо эндогенных лигандов адреналина и норадреналина, α_2 -рецепторы могут быть активированы несколькими препаратами-агонистами, включая клонидин, бримонидин и моксонидин. [2]

Цель. Изучить влияние стимуляции α_2 -адренорецепторов на электрическую активность сердца трехнедельных крыс в концентрациях 10-6 М.

Материал и методы. Исследование проведено на трехнедельных белых беспородных крысах. В качестве наркоза использовали 25% раствор уретана из расчета 1,2 г/кг массы животного, который вводился внутривенно. Наркотизированному животному вскрывали грудную клетку, сердце быстро извлекали и помещали в чашку Петри с оксигенизированным раствором Тироде. Сердце препарировали и изготавливали многоклеточный препарат с ушком правого предсердия, поперечным гребешком и фрагментами верхней и нижней полых вен. Электрическую активность кардиомиоцитов изучали с использованием внутриклеточного микроэлектродного отведения на препарате правого предсердия при навязанном ритме с частотой 5 Гц. Внешнее раздражение осуществляли через платиновые электроды. Полученные записи электрической активности миокарда анализировали в оригинальной программе Elph 3.0. Раствор агониста α_2 -адренорецепторов клонидина гидрохлорида (10-6 М) подавался в течение 20 мин.

Результаты. У трехнедельных животных клонидин гидрохлорид в изученных концентрациях не вызывал достоверных изменений в значении мембранного потенциала, длительности фазы деполяризации и амплитуды потенциала действия. Однако аппликация агониста α_2 -адренорецепторов в концентрации 10-6 М приводила к удлинению фазы реполяризации потенциала действия на уровне 50% и 90%.

Вывод. Было выявлено, что аппликация клонидина гидрохлорида в концентрации 10-6 М оказывает положительное влияние на амплитудно-временные показатели электрической активности кардиомиоцитов сердца 3-недельных крыс.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-15-00121, <https://rscf.ru/project/21-15-00121/>.

Список литературы:

1. Motiejunaite J. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines Ann Endocrinol (Paris) 2021 Jun;82(3-4):193-197.

2. Gilsbach R., Schneider J., Lothar A., Schickinger S., Leemhuis J., Hein L. Sympathetic α_2 -adrenoceptors prevent cardiac hypertrophy and fibrosis in mice at baseline but not after chronic pressure overload // Cardiovasc Res. - 2010.-V.86, № 3. - P.432-442.

Отклонения в возрасте эритроцитов у больных атеросклерозом

Гисич А.В.^{1,2*}, Ястребова Е.С.¹, Некрасов В.М.¹, Мальцев В.П.^{1,2}

¹Институт химической кинетики и горения РАН;

²Новосибирский Государственный Университет;

a.gisich@g.nsu.ru

Атеросклероз является ведущим смертельным заболеванием в США и в большинстве развитых стран мира. Нестабильные атеросклеротические бляшки могут разрываться и приводить к острым заболеваниям, таким как сердечные приступы и инсульты. Прогнозирование подобных процессов является актуальной задачей мирового уровня.

Дисфункции эритроцитов участвуют в патогенезе атеросклероза. Локальная гипоксия, вызванная недостатком кислорода, поставляемого эритроцитами, влияет на функцию клеток в нестабильных бляшках. Более того, жесткость мембран эритроцитов у больных атеросклерозом выше, чем у доноров. В дополнение,

старые эритроциты обладают меньшей деформируемостью, чем молодые, из-за повышенной концентрации гемоглобина и жесткости мембраны.

Целью настоящего исследования является выявление различий возрастных показателей эритроцитов между донорами и больными атеросклерозом брахиоцефальных артерий.

Для измерения параметров эритроцитов цельную кровь забирали путем венепункции в вакуумную пробирку (9:1 кровь:антикоагулянт). Затем клетки использовали в экспериментах на Сканирующем Проточном Цитометре (СПЦ) при комнатной температуре (22 °C) в течение 3 часов. Протокол был одобрен институциональным наблюдательным советом участвующей больницы. Текущую настройку СПЦ можно найти здесь (doi: 10.1002/cyto.a.24554).

В работе представляется новый подход, позволяющий восстановить возраст отдельных эритроцитов, построить возрастное распределение и сформировать возрастную категорию по 8 показателям. Подход основан на анализе изменений морфологии эритроцитов в процессе везикуляции.

В результате был проведен анализ эритроцитов 40 доноров и 60 больных атеросклерозом брахиоцефальных артерий. Повышенная устойчивость эритроцитов к гемолизу обнаружена у больных с нестабильными атероматами. При этом у пациентов было больше старых эритроцитов, чем у доноров.

Построенная зависимость жесткости мембран эритроцитов от возраста эритроцитов у доноров и больных атеросклерозом позволяет сделать вывод о наличии патологии. Обнаруженные закономерности могут служить диагностическим фактором и поводом для дальнейших исследований.

Отличие ответов премоторных интернейронов на серотонин и предшественника его синтеза 5-НТР у интактных и сенситизированных улиток

Богодвид Т.Х.^{1,2*}, Андрианов В.В.², Муранова Л.Н.², Гайнутдинов Х.Л.²

¹*Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма;*

²*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань;*

tat-gain@mail.ru

Одним из проявлений долговременной памяти является долговременная сенситизация (ДС). Сенситизация - это форма неассоциативного обучения, при которой у животного происходит значительное усиление величины вызванной реакции на ранее нейтральный стимул, следующей вслед за нанесением сильной (повреждающей) стимуляции [1,2]. Если отдельный сильный стимул вызывает кратковременную сенситизацию, длящуюся минуты, то повторение такой стимуляции вызывает ДС, длящуюся дни и недели [3]. Было показано, что выработанная ДС сохраняется от 2-х недель до 1 месяца [1]. Долговременный характер феномена доказывается также тем, что ДС не вырабатывается при использовании блокаторов биосинтеза белка и блокаторов транскрипции. Эти результаты демонстрируют, что ДС, несмотря на неассоциативный характер ее выработки, нуждается в белковом синтезе, т.е. она является формой долговременной памяти. Было найдено, что когда аплизия получает опасный (сильный) стимул, например, электрошок хвоста, то сети серотонинергических нейронов животного выделяют эндогенный серотонин [4]. Этот выделенный серотонин (5-НТ) вызывает целый ряд клеточных изменений, которые ведут к повышению оборонительного рефлекса. Доказательством необходимости 5-НТ для формирования ДС послужили эксперименты с применением нейротоксина, истощающего серотонин.

Кроме хорошо известной роли 5-НТ как медиатора в синаптической передаче было показано, что он может выполнять интегративные функции при выделении его во внеклеточную среду [5]. Эти результаты послужили основой для применения аппликации 5-НТ в омывающий раствор в качестве подкрепляющего стимула для создания клеточных аналогов обучения. Известно, что аппликация 5-НТ вызывает эффекты, сходные с облегчением дегабитулирующих и сенситизирующих стимулов на нервную сеть, лежащую в основе оборонительного ответа. Посредством аппликаций 5-НТ в омывающий центральную нервную систему раствор также удастся воспроизвести электрофизиологические корреляты пластичности [6]. Ранее нами было найдено, что аппликации 5-НТ и 5-гидрокситриптофана (5-НТР) в раствор, омывающий препарат, вызывали уменьшение мембранного потенциала премоторных интернейронов как интактных, так и обученных улиток [7]. В то же время у обученных улиток, в отличие от интактных, аппликации 5-НТ и 5-НТР вызвали повышение порогового потенциалов премоторных интернейронов LPa3 и RPa3. В данной работе мы исследовали изменения возбудимости премоторных интернейронов в ответ на аппликацию 5-НТ и 5-НТР в препаратах интактных улиток и улиток после ДС.

Эксперименты были проведены на изолированном препарате нервной системы моллюска *Helix lucorum*. Для выработки ДС оборонительного рефлекса животным предъявляли электрические стимулы в область головы 4 раза в день в течение 4-х дней с интервалом в 1,5-2 часа. Регистрация электрических характеристик

производилась на премоторных интернейронах оборонительного рефлекса LPa3 и RPa3, для вызова потенциала действия через регистрирующий электрод подавали прямоугольный импульс тока длительностью в одну секунду. Анализировались величины мембранного потенциала (Vm) и порога генерации потенциала действия (Vt) в ответ на аппликацию в раствор 5-HT и 5-HTP в препаратах интактных улиток и улиток после ДС. Было найдено, что при аппликации 5-HT и 5-HTP мембранный потенциал достоверно снижался в группах как интактных, так и сенситизированных улиток (на 4 мВ). Порог генерации потенциала действия, наоборот, недостоверно повышался. Полученные результаты свидетельствуют об изменениях свойств разных 5-HT рецепторов при формировании ДС.

Работа поддержана Программой стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

1. Береговой Н.А. и др., Изменение поведения при выработке долговременной сенситизации оборонительного рефлекса у виноградной улитки // Журн. высш. нервн. деят. 1990. Т. 40. № 3. С. 594-596.

2. Herdegen S. et al., Immediate and persistent transcriptional correlates of long-term sensitization training at different CNS loci in *Aplysia californica*. PLoS ONE. 2014. V.9. No 12. e114481.

3. Philips G.T. et al., (2011). The tail-elicited tail withdrawal reflex of *Aplysia* is mediated centrally at tail sensory-motor synapses and exhibits sensitization across multiple temporal domains. Learn. Mem. 18(4), 272–282.

4. Levenson J. et al., Levels of serotonin in the hemolymph of *Aplysia* are modulated by light/dark cycles and sensitization training // J. Neurosci. - 1999. - V. 19, № 18. - P. 8094-8103.

5. Marinesco S, Carew TJ. Serotonin release evoked by tail nerve stimulation in the CNS of *Aplysia*: characterization and relationship to heterosynaptic plasticity. J. Neurosci. 2002;22(6):2299-2312.

6. Lin, A.H. et al., (2010). Serotonin stimulation of cAMP-dependent plasticity in *Aplysia* sensory neurons is mediated by calmodulin-sensitive adenylyl cyclase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 107, 15607–15612.

7. Bogodvid T.K. et al., Responses of premotor interneurons to serotonin application in naïve and learned snails are different // Front. Cell. Neurosci. 2017. V. 11. Article 403.

Оценка влияния наноразмерных частиц диоксида кремния на морфометрические параметры мембран клеток крови методом лазерной интерференционной микроскопии

Игнатова А.М.^{1*}, Никитюк А.С.¹, Старостенко Д.А.², Львова М.Н.³, Бурмистрова О.С.¹, Кошкина А.А.¹, Наймарк О.Б.¹

¹Институт механики сплошных сред УрО РАН;

²Институт ядерной физики имени Г.И.Будкера СО РАН;

³Институт цитологии и генетики СО РАН;

iampstu@yandex.ru

Клетки крови чувствительны к факторам внешней среды и под их воздействием могут изменять свои свойства, в том числе морфометрические параметры. Из работ, представленных в монографии [1], известно, что измененные и неизмененные эритроциты обладают неравнозначной функциональностью. Авторы связывали стойкость эритроцитов к гемолизу с их общим числом в единице объема крови и размером. Исследования, касающиеся динамики клеточных сообществ указывают на то, что функциональная неравнозначность встречается применительно между отдельным сообществам и внутри сообществ. Так клетки одного пациента вырабатывают менее активный фермент, чем клетки другого пациента, а при различных анемиях параметры отдельных эритроцитов одного пациента отклоняются от нормы в широких диапазонах, очевидно, что гипо-, гиперхромные, а также эритроциты измененной формы при пойкилоцитозе, обладают различной функциональностью.

Функциональная неравнозначность клеток крови может быть вызвана такими факторами внешнего воздействия, как наноразмерные частицы [2]. Оценка функционального статуса одной клетки относительно другой является важной исследовательской задачей.

Целью исследования является изучение влияния наноразмерных частиц диоксида кремния на морфометрические параметры мембран клеток крови (эритроциты и лейкоциты).

Исследования проводили на экспериментальном образце лазерного интерференционного микроскопа МИМ-Н (УОМЗ, Россия), укомплектованном лазером с длиной волны 650 нм. Микроскоп данной модификации предполагает работу на просвет и не требует предметных стекол с зеркальным напылением, как это обычно требуется при работе с микроскопами такого типа [3]. Лазерная интерференционная микроскопия позволяет получить «фазовый портрет» отдельных клеток крови в нативном состоянии без фиксации и окрашивания [4].

В качестве объекта исследования использовалась кровь из локтевой вены относительно здоровых добровольцев в возрасте от 30 до 36 лет. Подготовку венозной крови проводили следующим образом: забор осуществляли в вакуумную пробирку с гепарином. Затем отобранная кровь разделялась на три порции по 1 мл, первая порция рассматривалась как контрольная, вторая порция перемешивалась со стерильным физиологическим раствором в пропорциях 1:1, третья порция перемешивалась со стерильным физиологическим раствором, содержащим 15 мкл суспензии наноразмерных частиц диоксида кремния (НЧДК), также в пропорциях 1:1. Суспензия НЧДК содержала частицы размером 4-80 нм, средний размер частиц составил 16,38 нм, концентрация составила $1,21 \cdot 10^{-6}$ г/мл. Вторая и третья порции крови инкубировались в термостате при температуре 37° С в течение 30 мин. Контрольная порция не инкубировалась, ранее было установлено, что инкубирование в указанных условиях нативной крови с антикоагулянтom не дает существенных отличий от выбранного контроля.

После инкубации из полученных порций крови были изготовлены препараты следующим образом: 10 мкл порции помещали на поверхность предметного стекла, затем вносили 5 мкл физиологического раствора, после на поверхность предметного стекла накладывалось покровное стекло и проводили снятие интерференционного фазового портрета. Препарат из контрольной порции был изготовлен сразу после забора. С каждой порции проводили съемку 15-20 эритроцитов и лейкоцитов.

Обработка изображений осуществлялась в программе MIM Visualiser и ImageJ-FiJi. Измеряли следующие параметры: максимальную (Hmax) и минимальную (Hmin) фазовую высоту клетки; максимальный (Dmax) и минимальный (Dmin) диаметр клетки; площадь (S) и периметр (P) контура клетки; коэффициент сферичности (KS) и фрактальную размерность контура клетки (D), а также был проведен анализ контура клетки на предмет выявления признаков мультифрактальности методом 2D. Согласно рекомендациям в статье [5], вычисляли индекс оксигенации (ИО) мембраны эритроцита, как отношение минимальной фазовой высоты к максимальной. Сравнение групповых показателей проводили по методу Манна-Уитни.

По результатам эксперимента установлено, что эритроциты и лейкоциты из группы контроля отличаются от аналогичных клеток, в группах, подвергнутых инкубированию. Клетки инкубированные с чистым физиологическим раствором и раствором с добавлением наноразмерных частиц диоксида кремния также отличаются между собой.

Действие НЧДК на морфометрические параметры эритроцитов выражено в том, что изменяется их индекс оксигенации, а также фрактальные свойства контура.

Библиографический список

1. Клиорин А.И., Тиунов Л.А. Функциональная неравнозначность эритроцитов: Л.: Наука. – 1974, 148 с.
2. Землянова М.А., Зайцева Н.В., Игнатова А.М., Степанков М.С., Торопов Л.И., Кольдибекова Ю.В. Исследование и оценка гематологических показателей крови и морфометрических параметров эритроцитов крыс при воздействии наночастиц оксида кальция // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020, Т. 170. № 11. – с. 631-635.
3. Баяндин Ю.В., Никитюк А.С., Воронина А.О., Белоглазова Ю.А., Гагарских О.Н., Гришко В.В., Наймарк О.Б. Анализ морфометрических и фрактальных свойств фазово-контрастных изображений нативных и апоптотически измененных клеток mcf-7 // Российский журнал биомеханики. - 2020. - Т.24, №3. - С.312-322.
4. Игнатова, А.М. Анализ рельефа опухолевых клеток MCF-7 при апоптотических изменениях на основе фазово-контрастных изображений, полученных методом лазерной интерференционной микроскопии. / А.М. Игнатова, А.С. Никитюк, Ю.В. Баяндин, В.В. Гришко, О.Б. Наймарк // Вычислительная механика сплошных сред. –2021. –Т. 14, № 2. –С. 171-176.
5. Золотовская И.А., Давыдкин И.Л., Дупляков Д.В., Лимарева Л.В., Сустретов А.С. Влияние антикоагулянтной терапии на оксигенацию мембран эритроцитов во взаимосвязи с показателями микроциркуляции у пациентов с фибрилляцией предсердий // Кардиология: Новости. Мнения. Обучение. – 2018, №1(16). – с. 82-90. doi:10.24411/2309-1908-2018-00004

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственный контракт № АААА-А19-119013090021-5)

Параметры потенциала действия предсердных кардиомиоцитов новорожденных крысят на фоне блокады NPY1 рецепторов

Искаков Н.Г.^{1,2*}, Аникина Т.А.¹, Николаев Т.И.¹, Насартдинова Р.Р.², Зефилов Т.Л.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет ;

²Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма;
nikitaiskakov1992@mail.ru

В сердечно-сосудистой системе обнаружена большая группа химических веществ, названных комедиаторами, посредством которых осуществляется передача импульса от одной клетки к другой. В симпатической нервной системе основными комедиаторами являются АТФ, нейропептид Y. Котрансмиттеры играют важную роль в процессах возрастного развития сердца. Нейропептид Y был открыт в 1982 г, и сразу после открытия данный пептид был синтезирован и определен как нейротрансмиттер, регулирующий разнообразные функции организма. Нейропептид Y был идентифицирован, как самый распространенный пептид в центральной нервной системе млекопитающих. Нейропептид Y был обнаружен в сердце, сосудах центральной нервной системы пищеварительной системе и других тканях организма. По данным авторов нейропептид Y связан с рядом физиологических процессов. К центральным эффектам данного пептида относят регуляцию дыхания, гипотензии, гипотермии, эндокринных функций. К периферическим эффектам относят регуляцию сердечно-сосудистой и респираторной систем. Одним из объектов, в котором нейропептид Y может играть важную роль, является сердце. В сердце крыс эффекты NPY реализуются посредством активации Y1R, Y2R и Y5R. Показано, что нейропептид Y оказывает влияние на частоту спонтанной активности так и на сократительную функцию сердца. Нейропептид Y вызывает разнонаправленное изменение частоты сердечных сокращений. Увеличение частоты сердечных сокращений наблюдалось в препаратах морской свиньи. У собак и кошек инъекция NPY вызывала снижение частоты сердечных сокращений. На препаратах изолированного сердца по Лангендорфу у кролика и собак не наблюдалось изменение частоты спонтанной активности при аппликации нейропептида Y.

Исследование проводилось на белых беспородных крысах 7-суточного возраста (n=18). Электрическую активность кардиомиоцитов изучали с использованием внутриклеточного микроэлектродного отведения на препарате миокарда правого предсердия с сохраненным синусным узлом и спонтанной активностью. Мембранный потенциал (МП) и потенциал действия (ПД) регистрировали с использованием стеклянных микроэлектродов (диаметр кончика <1 мкм, сопротивление 30-80 МΩ), которые изготавливались в день эксперимента на горизонтальном пуллере Р-1000 ("Sutter Instruments"). Полученные записи электрической активности миокарда анализировали в оригинальной программе "Elph 3.0" [Zakharov, 2019]. Нами анализировались следующие амплитудно-временные параметры регистрации потенциала действия: частота генерации ПД, амплитуда потенциала действия, длительность фазы деполяризации ПД, длительность фазы реполяризации ПД на уровне 20, 50 и 90%. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы рассчитывали по парному t критерию Стьюдента. (p < 0,05). Все используемые химические реактивы фирмы "Сигма". На одном препарате изучали эффекты селективного блокатора Y1-рецепторов BIBP 3226 (10-6М) и влияние агониста Y1,5-рецепторов [Leu,31 Pro34] NPY (10-6М) на фоне селективного антагониста Y1-типа рецепторов BIBP 3226 (10-6М).

Целью нашего исследования явилось изучение эффектов селективного блокатора и влияние агониста Y1,5-рецепторов на фоне селективного антагониста Y1-типа рецепторов.

Селективный блокатор BIBP 3226 10-6М вызывал изменения длительности фазы реполяризации. Длительность потенциала действия на уровне 20%, 50% и 90% реполяризации (ДПД20, ДПД50, ДПД90) увеличивалась с 25.8±4.7 до 28.1±4.8 мс, с 78.2±8.6 до 84.6±8.2 мс, с 175.9±9.1 до 192.4±7.2, что составляет 9%; 8%; 10%, соответственно (p<0.05; n=8). Совместная аппликация блокатора и агониста вызывала увеличение длительности реполяризации на уровне ДПД20 и ДПД 50 с 17.5±2.0 до 19.5±2.3 до с 43.7±8.4 до 46.6±8.6 что составляет 11% и 7.5%, соответственно (p<0.05; n=10).

Таким образом, совместное введение селективного блокатора и агониста Y1-рецепторов новорожденным животным приводило к сохранению эффекта блокатора. Возможно, в изменениях длительности фазы реполяризации ПД у 7- суточных животных принимают участие Y5-рецепторы, так как [Leu,31 Pro34] NPY является агонистом Y1 и Y 5-рецепторов

Пероксиредоксин 6 снижает поражение нефронов в раннем реперфузионном периоде

Гордеева А.Е.^{1*}, Курганова Э.А.^{1,2}

¹Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

²Пушкинский государственный естественно-научный институт, г. Пущино, Россия.;
gordeeva1310@yandex.ru

Нефроны - высокочувствительные элементы почки, которые остро реагируют на гипоксию, приводящую к развитию патологических изменений. Реперфузия спасает клетку от гипоксии, однако приводит к усугублению патологических изменений из-за активации свободно-радикальных реакций. Именно в начальный момент реперфузии происходит запуск каскада патологических процессов. Эти реакции являются губительными для нефронов и для уменьшения их действия целесообразно использовать ферменты-антиоксиданты. В настоящей работе для протекции нефронов от реперфузионного поражения используется фермент-антиоксидант пероксиредоксин 6 (Prx6). Prx6 нейтрализует широкий спектр гидропероксидов, обладает хорошей биодоступностью и способен проникать в клетки, повышая их антиоксидантный статус, кроме того он эффективно снижает выраженность поражения при различных свободно-радикальных патологиях.

Цель работы - исследование влияния экзогенного Prx6 на состояние нефронов в начальный реперфузионный период после ишемии. В экспериментах были использованы крысы-самцы линии Вистар для воспроизведения модели ишемии-реперфузии правой почки с левосторонней нефрэктомией. Срок ишемии 45 минут, реперфузии - 2, 5 и 24 часа. Prx6 вводили внутривенно за 15 минут до ишемии. Рекомбинантный Prx6 получен в лаборатории механизмов рецепции Института биофизики клетки РАН. Пероксидазная активность экзогенного белка - 200 нмоль/мг/мин по H₂O₂ и 100 нмоль/мг/мин по трет-бутилпероксиду.

Было показано, что структурное повреждение нефронов происходит уже через 2 часа реперфузии - увеличение Боуменова пространства и расширение извитых канальцев. Максимальное поражение отмечено через 24 часа реперфузии: очагово-диффузные дистрофические и некротические изменения в эпителии извитых канальцев носят выраженный характер. В этот период отмечается максимальный рост концентрации мочевины и креатинина в крови относительно контрольных значений (в 6 и 3 раза соответственно), что указывает на нарушение фильтрационной способности почки. Отмечена перестройка аппарата нефрона, которая выражается в увеличении площади почечных телец, площади сосудистых клубочков, площади Боуменова пространства. Отмечены дистрофии нефроцитов и очаги паренхимы с иммуносигналом для молекулы поражения почек KIM-1. При использовании экзогенного Prx6 уже с началом реперфузии не было отмечено перестройки аппарата нефрона, а его компоненты не были увеличены. Снижена площадь иммуносигнала для KIM-1 и минимизация дистрофии нефронов. Снижение поражения нефронов с началом реперфузионного периода на фоне использования Prx6 отразилось на улучшении функциональности нефронов. Использование Prx6 привело к снижению концентрации мочевины и креатинина уже в ранний реперфузионный период и сохранению на этом уровне в течение 24 часов. Таким образом, экзогенный Prx6 при его внутривенном введении перед ишемией почки, снижает поражение нефронов с началом реперфузии. Это способствует улучшению компенсаторно-приспособительных свойств нефронов в течение реперфузионного периода и сохранению их функциональности. Реализацию Prx6 своих протекторных свойств с началом реперфузии связывают с его мощными антиоксидантными свойствами, преимущественно с пероксидазной активностью, которая позволяет нейтрализовать гиперпродукцию активных форм кислорода.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФИЦ «ПНЦ БИ» РАН (№ 075-01512-22-00)

Подавление кальций-индуцированного слияния липидных мембран растительными полифенолами

Злодеева П.Д.^{1*}, Шекунов Е.В.¹, Остроумова О.С.¹, Ефимова С.С.¹

¹Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия;
zlodeeva.pd@yandex.ru

Полифенолы – органические соединения, структура которых содержит ароматические бензольные кольца с различным количеством гидроксильных групп. Эти вторичные метаболиты растений обладают антиоксидантной, противовоспалительной, антимикробной, противоопухолевой и противовирусной активностью и широко используются в фармакологии. Благодаря своей амфифильной природе полифенолы способны встраиваться в липидные мембраны и изменять их физико-химические свойства. Поскольку процесс слияния

мембран чувствителен к изменению характеристик бислоя, можно предположить, что изучаемые соединения могут модулировать этот процесс.

Данная работа посвящена поиску ингибиторов кальций-опосредованного слияния отрицательно заряженных малых липидных везикул (МЛВ) среди полифенолов, установлению взаимосвязи между структурой тестируемых соединений и их способностью подавлять слияние мембран, а также выявлению возможных механизмов их антифузогенной активности.

Метод высвобождения кальцеина из липосом был использован для количественной оценки ингибирующего действия полифенолов при слиянии МЛВ, сформированных из смеси фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилглицерина (ФГ) и холестерина (ХОЛ) (40/40/20 мол. %). Была оценена способность восемнадцати полифенолов подавлять слияние липидных мембран. Ингибирующую активность продемонстрировали стильбен питекатаннол (67%), флаванол таксифолин (37%), флавонолы кверцетин (85%) и мирицетин (58%), а также флаван-3-ол катехин (22%). Агликоны, содержащие от 1 до 3 ОН-групп, а также гликозиды не ингибировали кальций-опосредованное слияние МЛВ. Соединениями, способными подавлять слияние отрицательно заряженных мембран, являлись агликоны, содержащие от 4 до 6 ОН-групп. Анализ данных показал, что определяющим фактором для проявления антифузогенной активности являлось количество гидроксильных групп в А- и В-кольцах, тогда как структура С-кольца могла быть различной.

Для выявления механизмов ингибирующего действия тестируемых полифенолов с помощью метода дифференциальной сканирующей микрокалориметрии была проанализирована способность растительных полифенолов изменять термотропные характеристики ФХ и ФГ. Влияние исследуемых соединений на фазовый переход ФХ было сильнее, чем на плавление ФГ. Показано, что способность полифенолов подавлять слияние липидных мембран связано с их разупорядочивающим действием.

Анализ структур тестируемых соединений и полученных результатов позволил выдвинуть предположение, что антифузогенное действие полифенолов зависит от глубины погружения молекул в бислой и их ориентации в мембране. Значительной способностью подавлять слияние МЛВ характеризуются полифенолы, преимущественно локализованные в области липидных головок и расположенные перпендикулярно нормали к плоскости бислоя. Вероятно, такие соединения индуцируют положительную кривизну монослоя, что приводит к ингибированию слияния липидных мембран вследствие увеличения энергетических затрат на образование промежуточных интермедиатов слияния, характеризующихся отрицательной кривизной.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 22-15-00417.

Поиск синергистов порообразующей активности полимиксина Б

Мартынюк В.А.^{1*}, Грехнёв Д.А.¹, Захарова А.А.¹, Ефимова С.С.¹, Вигонт В.А.¹, Остроумова О.С.¹

¹Институт цитологии РАН;

ve08ra@mail.ru

Полимиксин Б (ПМБ) представляет собой амфипатический циклический липопептидный антибиотик, использующийся в настоящее время для лечения инфекций, вызванных полирезистентными грамотрицательными бактериями. Считается, что механизм действия ПМБ заключается в нарушении целостности как внешней, липополисахаридной, так и внутренней, фосфолипидной, мембраны бактериальной клетки и увеличении её проницаемости [1]. Существенным ограничением клинического применения ПМБ является его высокая токсичность, вследствие чего актуальной проблемой является поиск синергистов его активности с целью уменьшения нежелательных побочных эффектов и увеличения эффективности данного соединения.

Недавно было показано, что ПМБ может образовывать тороидальные поры в модельных фосфолипидных бислоях, что подтверждается увеличением порообразующей активности липопептида в ответ на введение в систему липидов, характеризующихся конической формой, или низкомолекулярных соединений, способных индуцировать положительную кривизну липидного монослоя. Более того, было продемонстрировано увеличение ПМБ-индуцированной проводимости мембраны в присутствии в мембраноомывающем растворе агентов, способных снижать граничный потенциал бислоя, в частности растительный полифенол флоретин увеличивает порообразующую активность ПМБ приблизительно в 30 раз [2].

С использованием модельных клеточных систем и метода диффузии в агар с бумажных дисков установлено, что введение 1 мМ флоретина в агар приводит к статистически значимому росту зоны ингибирования роста *E. coli* полимиксином Б в дозе 75 мкг. Для дальнейшего поиска соединений, потенцирующих порообразующую активность ПМБ, был применён метод регистрации токов, протекающих через плоские липидные бислои. Бислойные липидные мембраны, имитирующие состав внешней мембраны грамотрицательных бактерий, были сформированы по методу Монтала и Мюллера [3]. Установлено, что

введение растительных полифенолов бутеина или ресвератрола в 0.1 М раствор KCl (pH 7.4), омывающий липидную мембрану из дипальмитоилфосфатидилхолина, дипальмитоилфосфатидилглицерина и Кдо2-липидов А (49.5:49.5 + 1 мол %), до 20 мкМ вызывает увеличение проводимости мембраны, модифицированной ПМБ, более чем в 10 раз. Введение в примембранный раствор до 400 мкМ алкалоида пиперина приводит к увеличению макроскопического ПМБ-индуцированного тока приблизительно в 30 раз. Обсуждается роль изменений граничного потенциала и упаковки мембранных липидов в потенцирующем действии бутеина и ресвератрола. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-15-00417.

1. Deris, Z. Z., Swarbrick, J. D., et al. (2014). / Probing the Penetration of Antimicrobial Polymyxin Lipopeptides into Gram-Negative Bacteria. / Bioconjugate Chemistry, 25(4), 750–760.

2. Zakharova, A.A.; Efimova, S.S.; Ostroumova, O.S. / Lipid Microenvironment Modulates the Pore-Forming Ability of Polymyxin B. / Antibiotics 2022, 11, 1445.

3. Montal, M., Mueller, P. / Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. / Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1972, 69, 3561–3566.

Порообразующая активность низина и её перспективы в противоопухолевом действии

Тюлин А.А.^{1*}, Ефимова С.С.¹, Остроумова О.С.¹
¹Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург;
atyulin530@gmail.com

Несмотря на то, что в последние годы были достигнуты серьёзные успехи в области терапии рака, онкологические заболевания всё равно остаются серьёзной проблемой по всему миру. Разрабатываемые лекарственные препараты теряют эффективность вследствие развития резистентности, которая снижает положительный эффект химиотерапии и играет важную роль в метастазировании [1,2]. Это определяет острую потребность в разработке новых подходов к терапии и поиску новых лекарственных препаратов. В этом отношении антимикробные пептиды привлекают к себе всё больше внимания исследователей, поскольку фундаментальные отличия липидного состава плазматических мембран здоровых и раковых клеток [3,4] могут быть использованы в нацеливании антимикробных пептидов на опухолевые клетки.

Низин – это нетоксичный лантибиотик, состоящий из 34 аминокислотных остатков. Данный антимикробный пептид был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов и Всемирной организацией здравоохранения для использования в качестве пищевого консерванта [5]. Противоопухолевая активность низина была продемонстрирована на модели рака крови [6,7], ЖКТ [6], печени [6,8] и других. Более того, низин не проявляет активности по отношению к моделям здоровых клеток человека [8,9]. Несмотря на большое количество работ, посвященных исследованию противоопухолевой активности низина, механизмы его действия остаются не до конца ясными. Известно, что низин запускает митохондриальный путь апоптоза [10], процесс, в котором важную роль играют липиды митохондрий – кардиолипиды [11]. Поэтому исследование активности низина в кардиолипид-содержащих мембранах может быть важным аспектом.

Целью данной работы являлось изучение молекулярных механизмов действия низина на плоские бислои из фосфолипидов и раковые клеточные культуры, а также оценка перспектив совместного применения низина с малыми молекулами, усиливающими его мембранную активность для подавления роста раковых клеток.

Обнаружено, что низин не образует трансмембранные поры в модельных мембранах, состоящих из диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ) или диолеилфосфатидилэтаноламина (ДОФЭ), в концентрации до 2 мМ. Добавление к ДОФХ или ДОФЭ диолеилфосфатидилсерина (ДОФС) (ДОФХ/ДОФС или ДОФЭ/ДОФС, 50/50 мол.%) не влияет на вероятность образования пор, однако приводит к снижению детергентной концентрации низина с 2 мМ до 600-700 мкМ. Замещение ДОФС тетраолеилкардиолпином приводит к появлению ступенеобразных флуктуаций тока при концентрации низина не более 10 мкМ. Согласно полученным результатам, добавление 20 мкМ флоретина к низин-модифицированным мембранам, состоящим из ДОФХ/кардиолипидов, вызывает пятикратное увеличение интегрального тока за счёт снижения дипольного потенциала на 100 мВ. В дополнение к этому, флоретин способен потенцировать низин-индуцированную деполяризацию митохондриальных мембран в модельной линии рака печени (HepG2). Комбинации соединений приводят к более сильному падению митохондриального потенциала по сравнению с активностью низина и флоретина по отдельности.

С учетом того, что фосфатидилсерин экстернализируется в процессе трансформации клеток, уменьшение детергентной концентрации низина в ДОФС-содержащих бислоях может способствовать проникновению антибиотика в опухолевые клетки, где он связывается со своими внутриклеточными мишенями. Значительная порообразующая активность низина в присутствии кардиолипидов может означать, что низин активирует

митохондриальный путь апоптоза путём формирования пор во внутренней мембране митохондрий. Флоретин может быть агонистом низина в процессе деполяризации митохондриальных мембран.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-15-00417.

1. Kartal-Yandim M., Adan-Gokbulut A., Baran Y. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer // *Crit. Rev. Biotechnol.* Taylor & Francis, 2015. Vol. 36, № 4. P. 716–726.
2. Dagogo-Jack I., Shaw A.T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* Nat Rev Clin Oncol, 2018. Vol. 15, № 2. P. 81–94.
3. Skotland T., Sandvig K. Need for more focus on lipid species in studies of biological and model membranes // *Progress in Lipid Research.* Elsevier Ltd, 2022. Vol. 86. P. 101160.
4. Eggers L.F. et al. Lipidomes of lung cancer and tumour-free lung tissues reveal distinct molecular signatures for cancer differentiation, age, inflammation, and pulmonary emphysema // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 7, № 1.
5. Shin J.M. et al. Biomedical Applications of Nisin // *J. Appl. Microbiol.* NIH Public Access, 2016. Vol. 120, № 6. P. 1449.
6. Goudarzi F. et al. In Vitro Characterization and Evaluation of the Cytotoxicity Effects of Nisin and Nisin-Loaded PLA-PEG-PLA Nanoparticles on Gastrointestinal (AGS and KYSE-30), Hepatic (HepG2) and Blood (K562) Cancer Cell Lines // *AAPS PharmSciTech.* 2018. Vol. 19, № 4. P. 1554–1566.
7. Goudarzi F., Mohsen Esmailzadeh, Yaghoubi Hashem. The Mechanisms of Anticancer Activity of Nisin Peptide on Myelogenous Leukemia Cell Line (K562) As a New Treatment: Inducing Apoptosis by Changing in the Expression of Bax and Bcl-2 Genes // *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2021. Vol. 27. P. 2661–2670.
8. Paiva A.D. et al. Toxicity of bovicin HC5 against mammalian cell lines and the role of cholesterol in bacteriocin activity // *Microbiol. (United Kingdom).* 2012. Vol. 158, № 11. P. 2851–2858.
9. Avand A., Akbari V., Shafizadegan S. In Vitro Cytotoxic Activity of a Lactococcus lactis Antimicrobial Peptide Against Breast Cancer Cells // *Iran. J. Biotechnol.* Iran National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, 2018. Vol. 16, № 3. P. e1867.
10. Kamarajan P. et al. Nisin ZP, a bacteriocin and food preservative, inhibits head and neck cancer tumorigenesis and prolongs survival // *PLoS One.* Public Library of Science, 2015. Vol. 10, № 7.
11. Paradies G. et al. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* Elsevier, 2014. Vol. 1837, № 4. P. 408–417.

Причина синхронизации открывания-закрывания двух каналов грамицидина А при их близком расположении в липидной мембране

Антоненко Ю.Н.^{1*}, Рокицкая Т.И.¹, Котова Е.А.¹, Новодережкин В.И.¹

¹Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова ;

antonen@belozersky.msu.ru

Ранее изучались каналы пептида грамицидина А, ковалентно связанные друг с другом линкером [1,2], либо соединенные через белок стрептавидин в случае наличия у грамицидина А биотина на С-конце [3]. Грамицидин А – пептид, состоящий из 15 аминокислотных остатков, который образует ионные каналы в липидной мембране, формируя трансмембранный димер голова к голове. Было показано, что димеры грамицидина А, соединенные разными пептидными [1] или непептидными [2] линкерами формируют в липидной мембране ионные каналы, амплитуда которых приблизительно в два раза превышает амплитуду одиночного канала. Двойные каналы имеют целый ряд особенностей, в частности имеют продолжительное время жизни (минуты), превышающее примерно на один-два порядка время жизни исходного канала, которое составляет несколько секунд (в зависимости от условий измерения). Эта особенность получила свое объяснение в рамках представления о кооперативном влиянии соседних, т.е. расположенных рядом, каналов на упругую деформацию липидного бислоя [1–4].

Однако, другое свойство, а именно синхронность включения и выключения двойных каналов, образованных в результате взаимодействия двух одиночных каналов грамицидина, не получило должного объяснения. Наблюдение тока через мембрану имеет временное разрешение около 1 мс, и с такой точностью можно сказать, что каналы двойной амплитуды образуются одномоментно без видимой ступеньки промежуточного состояния. Точнее, такие ступеньки иногда наблюдались [1–3], однако в 40 % случаев акты открывания-закрывания двойных каналов были одномоментными. Трудно представить себе, что это обусловлено соответствующей структурой, позволяющей формировать латеральные комплексы с такими кинетическими характеристиками. Двойные каналы наблюдаются только в случае вышеперечисленных искусственно-конъюгированных пептидов, причем они имеют очень разную структуру. Действительно, двойные каналы

наблюдались как на пептидах с двумя разными видами линкеров [1,2], так и при конъюгировании пептидов через стрептавидиновый мостик [3]. Это заставляет думать о какой-то другой причине синхронизации открывания-закрывания двух рядом расположенных каналов. В настоящей работе мы высказываем гипотезу о возможной причине такой синхронизации, основанной на феномене, который известен для других физических систем. Мы предполагаем, что синхронизация работы двух каналов обусловлена существованием общих колебательных мод, связанных с конформационной подвижностью в этих двух близко расположенных каналах. Упрощенно говоря, речь идет об аналогии с двумя гармоническими осцилляторами с сильной связью между ними.

В данной работе мы рассматриваем модель, в которой два проводящих канала могут взаимодействовать с коллективной ядерной модой, например с конформационной модой, создающей связь между ними и, таким образом, способствующей их смешиванию. Если предположить, что константа связи зависит от медленно меняющейся конформационной координаты, то можно объяснить (1) синхронное включение двух каналов; (2) долгоживущий характер состояния с двойной проводимостью; (3) образование короткоживущих состояний с одиночной проводимостью перед открытием двойного канала; и (4) закрытие двойного канала через те же короткоживущие одиночные состояния.

Мы предполагаем, что данное явление наблюдается не только с каналами грамицидина, но и с другими каналами, такими как каналы аламетицина и сирингомицина. Эти каналоформеры известны своей способностью формировать как каналы минимальной проводимости, так и каналы больших размеров, причем размеры этих каналов строго определены в данных условиях. Обычно считается, что большие каналы имеют больший размер благодаря участию большего количества мономеров пептидов в формировании стенки такого канала, то есть предполагается, что размер полости больших каналов растет с увеличением числа мономеров [5]. Однако более поздние работы показали, что как в случае аламетицина [6] так и в случае сирингомицина [7], размер пор больших и малых каналов одинаков. Можно предположить, что в данном случае тоже может иметь место одновременное открывание одиночных каналов в кластерах, как это наблюдается в двойных каналах грамицидина. Поскольку оба пептида являются природными, то можно предположить, что в данном случае формирование сильной связи между мономерами, приводящее к синхронизации их работы, может быть обусловлено структурными особенностями этих каналов. Такая модель предполагает, что каналы, скажем, аламетицина представляют из себя агрегат кластеров пептида, каждый из которых способен образовывать канал минимальной проводимости, однако в результате сильного взаимодействия с соседями происходит объединение открытых состояний, причем такие открытые состояния могут быть разной величины в зависимости от числа вовлеченных в них одиночных каналов.

1. R.L. Goforth et al., J. Gen. Physiol. 121 (2003) 477-493.
2. L. Al Momani et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 328 (2005) 342-347.
3. T.I. Rokitskaya et al., J. Gen. Physiol. 121 (2003) 463-476.
4. M.B. Partenskii, et al., J. Phys. Chem. 118 (2003) 10306-10311.
5. R. Latorre & O. Alvarez, Physiol. Rev. 61 (1981) 77-150.
6. Y.A. Kaulin, et al., Biophys. J. 74 (1998) 2918-2925.
7. S.M. Bezrukov & I. Vodyanoy, Biophys. J. 64 (1993) 16-25.

Проникновение молекул легкоплавкой агарозы в жидком состоянии через клеточные и ядерные мембраны - причина вариабельности в результатах Comet assay

Сирота Н.П.^{1*}, Колманович Д.Д.¹
¹ИТЭБ РАН;
sirota@iteb.ru

Comet assay (Комета-тест) лучший тест, широко используемый для демонстрации отсутствия повреждений в молекуле ДНК. Он считается отличным инструментом скрининга для выявления повреждений ДНК, что имеет большое практическое значение. Несмотря на высокую применимость этого метода, наблюдается большая вариабельность и низкая сходимость результатов в рамках различных экспериментальных исследований проводимых как в рамках одной так и в межлабораторных работах, что затрудняет сравнение исследований. Считалось что это результат использование разных протоколов. Однако уже были проведены ряд исследований по согласованным протоколам для выяснению причин вариабельности в межлабораторных результатах (1,2,3)

В этих исследованиях было показано, что на результаты комета теста могут влиять концентрация агарозы, плотность образующихся комет, длительность щелочного периода инкубации нуклеонидов перед электрофорезом, pH буферного раствора для электрофореза и время лизиса (4).

В литературе нет данных по исследованиям взаимодействия легкоплавкой агарозы с внутриклеточным генетическим материалом. Мы обнаружили, что при приготовлении препаратов с клетками, иммобилизованными в легкоплавкую агарозу, происходит проникновение агарозы внутрь клеточного ядра, где происходит ее стерическое взаимодействие с цепями геномной ДНК. При желировании агарозы образуются спиралевидные структуры в виде тяжей из нескольких молекул агарозы (5). Возникает структура с напряженностью вдоль сформировавшихся альфа спиралей в таких нитях. Дополнительная напряженность может возникать в процессе растекания капли агарозы под действие тяжести покровного стекла при формировании препарата. В процессе лизиса клеток происходит дезинтеграция клеточных и ядерных мембран и депротеинизация молекул геномной ДНК.

После завершения лизиса напряженность в альфа спиральях приводит к сокращению агарозных нитей. И как следствие на препарате наблюдается перемещение двуцепочечной ДНК стерически замкнутой с агарозными нитями. Анализ препаратов подвергнутых окрашиванию бромистым этидием (интеркалятором в двуцепочечную ДНК) под флуоресцентным микроскопом показал наличие ДНК-комет с хвостами ориентированными в соответствии с направлением потока легкоплавкой агарозы.

Обработка препаратов (после лизиса и окрашивания) ДНКазой 1 продемонстрировали что в структуре хвостов ДНК-комет присутствует именно ДНК. Аналогичные изображения наблюдались на препаратах с клетками асцитной карциномы Эрлиха, изолированными сплееноцитами мышей и клетками карциномы молочной железы мыши ЕМТ6/Р.

Литература:

1. Evaluation of the Major Steps in the Conventional Protocol for the Alkaline Comet Assay Mahsa Karbaschi et.al Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 6072; doi:10.3390/ijms20236072
2. Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme modified comet assay in human biomonitoring studies Amaya Azqueta et. al Mutat Res Gen Tox En 843 (2019) 24–32
3. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results Peter Møller et al. NATURE PROTOCOLS | www.nature.com/nprot
4. Calibration of the comet assay using ionising radiation. Gunnar Brunborg et al Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 885 (2023) 503560
5. Mechanically Tailored Agarose Hydrogels through Molecular Alloying with β -Sheet Polysaccharides Aurelien Forget Macromol. R

Процессы перекисного окисления липидов с участием тиосемикарбозонов

Кошман В.Е.^{1,2*}, Шелепова Е.А.^{1,2}, Селютин О.Ю.², Дмитриев А.А.², Поляков Н.Э.²

¹Новосибирский государственный университет ;

²Институт химической кинетики и горения им В.В. Воеводского СО РАН;
kosmanvova2010@mail.ru

Тиосемикарбозоны (ТСК) обладают широким спектром биологической активности, в том числе противораковой, и представляют большой интерес для ученых из различных областей науки. Их противораковая активность долгое время объяснялась способностью ингибировать рибонуклеотидредуктазу. Однако последние исследования указывают на значительную роль окислительного стресса в противоопухолевой активности ТСК. Этот аспект их биологической активности в настоящее время изучен очень слабо и представляет большой интерес для медицинской химии [1].

В данной работе на примере тиосемикарбозонов ди-2-пиридилкетон-4,4-диметил-3-тиосемикарбазона (Dp44mT), ди-2-пиридилкетон-4-циклогексил-4-метил-3-тиосемикарбазона (DpC) и новых тиосемикарбозонов АОВР и АОДР изучены процессы перекисного окисления липидов с участием хелатных комплексов с ионами железа и меди. Взаимодействие хелатных комплексов с липидным бислоем и их роль в реакции перекисного окисления липидов были изучены на модельных системах методами ЯМР 1H и молекулярно-динамического моделирования с использованием GROMACS.

Эксперименты проводились в модельных системах (мицеллы линолевой кислоты и бицеллы ДНРС/DLPC). Изучены окислительно-восстановительные свойства комплексов Dp44mT, DpC, АОВР и АОДР с железом и медью в реакции перекисного окисления липидов и роль природного антиоксиданта аскорбиновой кислоты в этом процессе. Также было изучено взаимодействие комплексов ТСК с липидной мембраной. Было установлено, что комплексообразование Dp44mT с железом практически полностью ингибирует реакцию перекисного окисления, в то время как комплексы с медью сохраняют окислительную активность. В то же время в присутствии аскорбиновой кислоты активность комплексов Dp44mT с железом значительно возрастает. Выявлено, что комплексообразование Dp44mT с ионами железа ингибирует образование ОН-радикала в реакции

Фентона. В присутствии аскорбиновой кислоты наблюдалось образование ОН-радикала. Увеличение окислительной активности комплексов Dp44mT с ионами железа в присутствии аскорбиновой кислоты обусловлено циклической окислительно-восстановительной реакцией с комплексами Dp44mT. Комплексообразование железа с DpC также ингибирует перекисное окисление липидов. Комплекс железа с АОВР проявляет окислительно-восстановительную активность, при этом аскорбиновая кислота усиливает влияние комплекса на скорость реакции перекисного окисления липидов. Молекула Dp44mT расположена на поверхности липидного бислоя, в то время как молекулы АОВР и АОДР могут проникать внутрь. При этом молекула АОДР расположена ближе к поверхности бислоя, чем АОВР.

[1] Lu B., Chen X., Ying M., He Q., Cao J., Yang B., *Frontiers in Pharmacology*. 8, 992 (2018)

Разработка более эффективных лекарственных форм полиеновых антибиотиков

Ефимова С.С.^{1*}, Остроумова О.С.¹

¹*Институт цитологии Российской академии наук;*

efimova@incras.ru

Полиеновые макролидные антибиотики, в частности, амфотерицин В, до сих пор остаются золотым стандартом лечения тяжелых системных микозов. Основным механизмом действия полиеновых антибиотиков считается образование трансмембранных пор в мембранах клеточек-мишеней, в результате чего нарушается водно-солевой баланс, и грибковая клетка гибнет. Последнее определяет чрезвычайно низкую вероятность развития устойчивости у патогенных микроорганизмов. Существенным ограничением применения полиеновых макролидных антибиотиков является их высокая токсичность. Липид-ассоциированные композиции амфотерицина В с успехом применяются для снижения нефротоксичности антибиотика, сохраняя его противогрибковую эффективность. С целью дальнейшего повышения эффективности и снижения токсичности действия макролидного антибиотика нами разработаны его инновационные липосомальные формы, включающие различные фосфолипиды, стерин и флавоноиды. Установлено, что наибольший интерес в плане снижения токсичности представляют липосомальные формы, включающие предшественник холестерина в биосинтетическом пути, 7-дигидрохолестерин, и растительный стерин, десмостерин. Показано, что флоретин-модифицированные амфотерицин-содержащие липосомы характеризуются большей эффективностью, выражающейся в величине утечки флуоресцентного маркера из везикул, имитирующих мембраны грибковых клеток, по сравнению с липосомальными комплексами, не включающими флоретин или включающими биоханин А, генистеин и кверцетин. Одиночные полиеновые ион-проницаемые поры в липидных бислоях, имитирующих состав мембран грибковых клеток, имеют симметричную вольт-амперную характеристику, что свидетельствует о функционировании симметричных амфотерициновых каналов, а, следовательно, о возможностях снижения пороговой концентрации антибиотика по сравнению с пороговыми концентрациями, необходимыми для образования асимметричных полиеновых каналов. На основании полученных данных определен оптимальный состав липосомальных форм амфотерицина В, обеспечивающий их повышенное сродство к мембранам патогенных микроорганизмов и пониженное – к мембранам клеток млекопитающих. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 22-74-10023).

Регистрации пароксизмального деполяризационного сдвига при помощи метода локальной фиксации потенциала в конфигурации outside-out

Ларюшкин Д.П.^{1,2*}, Крицкая К.А.¹, Косенков М.А.¹, Гайдин С.Г.¹, Зинченко В.П.¹

¹*Институт биофизики клетки РАН;*

²*Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»;*

mr.ldp@yandex.ru

Эпилепсия — это одно из наиболее распространенных неврологических заболеваний, характеризующееся внезапно возникающими приступами судорог. Полагают, что в основе эпилепсии лежат нарушения баланса торможения и возбуждения нейрональных сетей, приводящие к сложной пространственно-временной структуре синхронизации и десинхронизации больших нейрональных ансамблей. Клеточным коррелятом эпилептиформной активности, регистрируемой при помощи ЭЭГ, является пароксизмальный

деполяризационный сдвиг (ПДС). ПДС — это положительный сдвиг мембранного потенциала нейрона, достигающий — 15 мВ и длящийся до 400 мс, на фоне которого могут возникать от одного до нескольких потенциалов действия.

На сегодняшний день предложено несколько механизмов, которые могли бы объяснить явление гиперсинхронизации нейронов во время эпилепсии, таких как: высокая концентрация внеклеточного калия, уменьшение внеклеточного пространства и/или эфептические связи. Наряду с этим, существуют данные, что гиперсинхронизация может происходить благодаря эндогенному электрическому полю, что подтверждается несколькими математическими моделями, однако экспериментов о роли электрического поля при возникновении ПДС проведено не было. Таким образом, мы предположили, что если мощности эндогенного электрического поля достаточно для деполяризации мембраны, то мы смогли бы зарегистрировать такое поле при помощи метода локальной фиксации потенциала.

Для экспериментов мы использовали смешанную нейроглиальную культуру гиппокампа крысы линии Вистар. Активацию эпилептиформной разрядов индуцировали бикакулином в концентрации 10 мкМ. Для регистрации сигнала использовали метод patch-clamp (с программным обеспечением pClamp10.2) в конфигурации whole-cell, а после того, как были записаны контрольные показатели (два кластера ПДС), мы переходили в конфигурацию outside-out, записывали два кластера и отводили электрод 1,25 мкм и т.д., пока амплитуда ПДС была различима на фоне шума. Анализ данных производили при помощи языка программирования python3 с использованием пакетов numpy, scipy.signal, pyABF.

В результате проведенных экспериментов нами было показано, что при помощи метода patch-clamp в конфигурации outside-out возможно зарегистрировать ПДС нейрональной сети в нейроглиальной культуре крысы, вызванных бикакулином. Полученные результаты могут быть использованы при исследовании эпилепсии на клеточном уровне.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИБК РАН № 075-01512-22-03 по теме: "Нейропротекторные препараты нового поколения" № 1022080100047-5-1.6.4

Регуляция НАДФН-оксидазы через рецепторы формилированных пептидов на гранулоцитах костного мозга у мышей, устойчивых к ожирению

Тихонова И.В.¹, Дюкина А.Р.^{1*}, Шайхутдинова Э.Р.², Сафронова В.Г.¹

¹Институт биофизики клетки РАН - обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино, РФ;

²Филиал федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пущино, РФ;
Dyukina@rambler.ru

Известно, что ожирение является предшественником различных патологий (сахарного диабета 2 типа, рака, артрита, гипертонии и др.) и характеризуется вялотекущим хроническим воспалением. Воспалительный каскад при ожирении инициируют, главным образом, полиморфноядерные нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы), наиболее реактивные клетки врожденного иммунитета с высоким цитотоксическим потенциалом, включающим продукцию активных форм кислорода. Показано изменение функциональной активности нейтрофилов при ожирении, однако в условиях устойчивости к ожирению функционирование нейтрофилов, включающее генерацию активных форм кислорода, не исследовано.

Цель работы - исследовать НАДФН-оксидазо-зависимую генерацию реактивных форм, опосредованную высоко- и низкоаффинными рецепторами формилированных пептидов (Fpr1, Fpr2) в гранулоцитах костного мозга у устойчивых к ожирению мышей (УОМ). Поскольку длительное потребление высокожировой диеты (ВЖД) является стрессорным фактором, изменяющим иммунный профиль у склонных к ожирению мышей, мы предположили, что у мышей, устойчивых к ожирению, будет также наблюдаться модификация функций иммунных клеток, включая продукцию реактивных форм, инициированную мембранными рецепторами формилированных пептидов.

В исследовании использованы самцы мышей линии C57BL/6j, содержащиеся в барьерных условиях на ВЖД (общей калорийностью 516 ккал/100 г) в течение 16 недель. Контролем служила группа животных, содержащихся в условиях стандартной диеты (калорийность 306 ккал/100 г). Включенные в эксперимент мыши, получавшие ВЖД, не отличались от контрольных мышей по длине и массе тела. Мышей, получавших ВЖД и имеющих значительно более высокий прирост массы тела, чем контрольная группа, в экспериментальную группу не включали. Были сформированы четыре экспериментальных группы: (I) – контроль; (II) контроль с острым воспалением; (III) УОМ; (IV) УОМ с острым воспалением. Острое воспаление вызывали

внутрибрюшинным введением суспензии зимозана в растворе Хэнкса (5 мг/мл, 150 мкл) за 12 ч до эксперимента. Контрольной группе (I) и УОМ (III) вводили 150 мкл раствора Хэнкса внутрибрюшинно.

Проводили биохимический анализ, определяли концентрацию глюкозы в цельной крови, измеряли относительную массу органов кроветворения с активно пролиферирующей тканью (тимус, селезенка, печень). Гранулоциты изолировали из костного мозга методом центрифугирования в градиенте плотности перколлы. Метод хемилюминесцентного анализа применяли для оценки интенсивности генерации реактивных форм, которую инициировали 1 мкМ N-formyl-MLF (fMLF, активация Fpr1) и 1 мкМ WKYMVM (синтетический агонист Fpr2). Ингибиторы PLC (U73122, 0.2 and 2 мкМ), PKC (GF109203X, 1 мкМ), p38MAPK (SB202190, 10 мкМ), ERK1/2 (FR180204, 10 мкМ), JNK (SP600125, 10 мкМ), применяли для выявления участия данных ферментов в сигнальной трансдукции от Fpr1 и Fpr2 на НАДФН-оксидазу у УОМ. Рассчитывали амплитуду ответа и продукцию реактивных форм. Эффект ингибиторов определяли, как отношение параметра, полученного от клеток, обработанных ингибитором, к параметру интактных клеток, принятому за 100%.

Показан более высокий уровень спонтанной продукции реактивных видов в клетках УОМ. Средняя эффективная концентрация (EC50) для ответов на N-formyl-MLF была выше у УОМ с воспалением и без него по сравнению с соответствующими контрольными группами, что указывает на незначительную роль Fpr1. Повышенные ответы на WKYMVM (агонист Fpr2) были в контроле с острым воспалением, но они были сходными в других группах. Возможно, Fpr2 были частично инактивированы у УОМ из-за наличия воспалительного процесса. ВЖД и острое воспаление привело к усилению положительной регуляции активности НАДФН-оксидазы с помощью PLC. Результаты показали снижение роли PKC в регуляции активности НАДФН-оксидазы через рецепторы формилированных пептидов в гранулоцитах УОМ, а также в клетках контроля с воспалением, активированным через Fpr2. Было выявлено ослабление передачи сигналов Fpr1 и Fpr2 через митоген-активируемые протеинкиназы (MAPKs) в гранулоцитах УОМ при использовании специфических ингибиторов p38, ERK1/2, JNK. Передача сигналов p38 через Fpr2 была ниже у УОМ при воспалении. Таким образом, диета с высоким содержанием жиров модифицировала роль Fpr1 и Fpr2, а также подавляла передачу сигналов MAPKs в регуляции НАДФН-оксидазы у УОМ. Полученные данные могут быть полезны для понимания иммунологических особенностей устойчивости к ожирению и открытия возможности использования рецепторов формилированных пептидов в качестве потенциальных терапевтических мишеней для подавления воспаления, связанного с ожирением, и разработки стратегий борьбы с метаболическими нарушениями, обусловленными ожирением.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (№22-15-00215).

Редокс-статус эритроцитов человека и глутатионилирование гемоглобина в условиях стресса

Зарипов П.И.^{1,2*}, Кулешова Ю.Д.¹, Мельникова Е.В.¹, Полуэктов Ю.М.¹, Анашкина А.А.¹, Митькевич В.А.¹, Макаров А.А.¹, Петрушанко И.Ю.¹

¹Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН;

²МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики;
aglaepanchina@yandex.ru

Состояние эритроцитов имеет критическое значение для жизнеспособности всего организма. Время жизни и функциональная активность эритроцитов определяется условиями их формирования в костном мозге и уровнем стресса, которому они подвергаются в течение своей жизни. Задачи оценки характера стрессового воздействия, разработки методов снижения повреждения красных кровяных телец в условиях стресса и продления их жизни крайне актуальны. Решение позволит увеличить срок хранения донорской крови, бороться с состояниями анемии, а также увеличить продолжительность жизни человека. Сегодня очевидно, что старение эритроцитов, изменение их свойств тесно связаны с редокс-статусом клеток, который зависит от соотношения восстановленных и окисленных форм молекул. Окисление белковых молекул, в первую очередь, гемоглобина (Гб) – это ключевой фактор повреждения и, как следствие, преждевременного старения эритроцитов. Глутатионилирование гемоглобина - присоединение глутатиона через дисульфидный мостик к тиоловой группе белка, приводит к возрастанию сродства гемоглобина к кислороду, что может вносить вклад в адаптацию клеток к разным стрессовым условиям.

Цель нашей работы – оценить редокс-статус эритроцитов при характерных стрессовых воздействиях и установить роль Гб и его глутатионилирования в этих процессах.

Мы инициировали стрессовые состояния, типичные для эритроцитов, циркулирующих в кровотоке – гипоксию (недостаток O₂ в среде), механический, гипоосмотический и метаболический стресс. Для оценки изменения редокс-параметров клеток использовали метод проточной цитометрии [1]. Фиксировали параметры

малоуглового и бокового светорассеяния, характеризующих, соответственно, размер и гранулярность/форму клеток. С помощью флуоресцентных красителей характеризовали внутриклеточное содержание глутатиона (GSH), активных форм кислорода (АФК), NO, а также уровень Ca^{2+} . Уровень GSH в лизатах эритроцитов также оценивали с помощью реактива Элмана – DTNB – 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) [2]. Для оценки степени глутатионилирования Гб использовали метод вестерн-блоттинга.

В условиях гипоксии – снижения парциального давления кислорода до 1% – быстрее всего на изменение уровня кислорода реагирует уровень внутриклеточного Ca^{2+} . Изменение Ca^{2+} играет важную сигнальную роль, после чего происходит изменение параметров, характеризующих редокс-статус эритроцитов: уровня АФК, NO и внутриклеточного глутатиона. Через три часа инкубации эритроцитов в условиях гипоксии наблюдается существенное возрастание уровня NO и GSH, происходящее на фоне снижения уровня АФК. Увеличение содержания NO связано с синтезом *de novo* через запуск Ca^{2+} -зависимых NO-синтаз [3]. В свою очередь, как мы показали, возрастание уровня GSH обусловлено не синтезом, а выходом молекул глутатиона из нековалентного комплекса с Гб [4]. В условиях гипоксии степень глутатионилирования Гб практически не меняется.

Механический стресс, возникающий *in vivo* при прохождении эритроцитов через узкий просвет малых капилляров, моделировали пропуская клетки через колонку из смеси α - и микро-целлюлозы [5]. Механическое воздействие приводит к развитию значительного окислительного стресса – росту уровня АФК, NO, снижению внутриклеточного GSH на фоне пониженного содержания Ca^{2+} . Клетки сжимаются, при этом форма клеток значительно не меняется. Наблюдается существенное возрастание уровня глутатионилирования Гб, что обусловлено развитием окислительного стресса.

Острый осмотический стресс, вызванный снижением осмолярности с 330 до 220 мОсм приводит к возрастанию внутриклеточного Ca^{2+} , при этом уровень NO не меняется. Снижение GSH и рост АФК в этом случае менее выражены, чем при механическом стрессе и при этом наблюдается небольшое снижение глутатионилирования Гб. Через 24 часа инкубации практически все внутриклеточные параметры возвращаются к норме и уровень глутатионилирования Гб соответствует контролю. Таким образом, с течением времени происходит адаптация клеток к гипоосмотическому стрессу.

Метаболический стресс индуцировали 24-часовой инкубацией эритроцитов в безглюкозной среде. Размер клеток увеличивается, вероятно, в результате нарушения работы ионных насосов вследствие дефицита АТФ. Снижается содержание GSH на фоне отсутствия роста АФК, что может быть связано с недостатком НАДФ-Н, необходимого для восстановления GSSG глутатионредуктазой, а также прекращением синтеза GSH *de novo*. Кроме того, дефицит НАДФ-Н нарушает работу NO синтаз, что может быть причиной снижения уровня NO. Метаболический стресс вызывает существенное увеличение глутатионилирования гемоглобина, что, по-видимому, обусловлено снижением уровня GSH и накоплением GSSG.

Таким образом, возрастание глутатионилирования Гб при стрессовых воздействиях может быть индуцировано развитием окислительного стресса или недостатком АТФ. Продолжение исследований позволит раскрыть молекулярные механизмы клеточной защиты и адаптации эритроцитов к стрессу и предложить в дальнейшем механизмы защиты от преждевременного старения клеток.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mitkevich V.A. et al. Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells // *Biochimie*. 2013. Vol. 95, № 6. P. 1344–1349.
2. Ellman G., Lysko H. A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups // *Analytical biochemistry*. 1979. V. 93. P. 98-102.
3. Ulker, P. et al. Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells // *Nitric Oxide*. 2011. V. 24. №. 4. P. 184-191.
4. Fenk, S. et al. Hemoglobin is an oxygen-dependent glutathione buffer adapting the intracellular reduced glutathione levels to oxygen availability // *Redox Biology*. 2022. V. 58. P. 102535.
5. Minetti, G. et al. Membrane rearrangements in the maturation of circulating human reticulocytes // *Frontiers in physiology*. 2020. V. 11. P. 215.

Рианодин и ингибитор SN-6 вызывают положительный хронотропный эффект у пейсмекерных клеток правого предсердия куриного эмбриона

Лебедева Е.А.^{1*}

¹ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН;
Mirestel@ya.ru

Введение. Предполагается, что в основе механизма генерации спонтанных импульсов сердца взрослых животных лежит самопроизвольное высвобождение ионов кальция из саркоплазматического ретикулума через

рианодиновые рецепторы, которое в свою очередь связано с ионными токами мембраны, в частности с работой Na/Ca-обменного механизма [Lakatta et al., 2010; Lyashkov, et al., 2018]. В тоже время клеточные механизмы, ответственные за электрическую возбудимость в эмбриональном сердце мало изучены, а имеющиеся экспериментальные данные противоречивы [Opthof, 2007]. Один из важных вопросов заключается в том, обусловлена ли активность эмбрионального миокарда теми же механизмами, что и в сердце взрослых животных [Goenezen et al., 2012].

Цель данной работы заключалась в оценке вклада Na/Ca-обменного механизма и рианодиновых рецепторов в генерацию электрической активности у клеток правого предсердия куриных эмбрионов.

Материалы и методы. Эксперименты проводили с помощью стандартной микроэлектродной техники и фармакологического анализа на спонтанно сокращающихся препаратах правого предсердия куриных эмбрионов (HH36, m тела=3.6±0.3 г). В качестве ингибитора Na/Ca-обменного механизма (INaCa) использовали селективный блокатор SN-6 (4-тиазолидинкарбоновая кислота), для изучения роли рианодиновых рецепторов – рианодин («Sigma», Германия). Значимость различий определяли по U-критерию Манна–Уитни (p<0.05). Данные приведены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение (M±σ).

Результаты. В контрольном солевом растворе (31±1 °C) у препаратов правого предсердия куриного эмбриона частота генерации потенциалов действия (ПД) составила 145±15 имп/мин, а скорость нарастания переднего фронта ПД (dV/dtmax) – 103±41 В/с (n=18). Все зарегистрированные ПД имели фазу медленной диастолической деполяризации (МДД, фаза 4).

При ингибировании Na/Ca-обменного механизма с помощью SN-6 (10 мкМ, n=11) регистрировали повышение частоты генерации ПД на 15% за счет укорочения длительности фазы МДД на 18% по сравнению с контролем (p<0.05). Остальные электрофизиологические параметры ПД достоверно не изменялись.

Добавление в перфузирующий раствор рианодина (1 мкМ, n=10) вызывало аналогичный эффект: длительность фазы медленной диастолической деполяризации укорачивалась, что приводило к повышению частоты генерации ПД в среднем на 17% (p<0.05). Данный эффект регистрировали на протяжении всей экспозиции рианодина (60 минут). Прекращения электрической активности у препаратов правого предсердия куриного эмбриона при действии рианодина не зарегистрировано.

Заключение. Увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция в результате добавления рианодина или ингибирования работы Na/Ca-обменного механизма у клеток водителя ритма куриного эмбриона не приводило к замедлению, нарушению или остановке генерации электрических импульсов. В отличие от взрослых животных, где нарушение функционирования этих ионных каналов приводит к отрицательному хронотропному эффекту [Lakatta et al., 2010], в эмбриональном сердце происходило повышение частоты генерации ПД. Полученные данные позволяют заключить, что на данном этапе эмбрионального развития Na/Ca-обменный механизм и рианодиновые рецепторы не играют ключевой роли в механизме формирования электрических импульсов в эмбриональном сердце курицы.

Роль рецепторов свободных жирных кислот в эффектах бутирата натрия на сократительную активность толстой кишки мыши при моделировании синдрома раздраженного кишечника

Шайдуллово И.Ф.^{1*}, Сорокина Д.М.¹, Бучареб Д.¹, Ситдилов Ф.Г.¹, Ситдилова Г.Ф.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

ilnarshaidullov@rambler.ru

Синдром раздраженного кишечника (СРК) является широко распространенным функциональным расстройством желудочно-кишечного тракта, характеризующимся вариабельной комбинацией хронической или рецидивирующей боли в животе и изменениями в работе кишечника при отсутствии каких-либо отклонений. Недавние исследования показали, что хронические изменения иммунной системы на молекулярном уровне связаны с аномальной кишечной ферментацией короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), которые являются ключевыми продуктами ферментации неперевариваемых углеводов бактериями-комменсалами, обитающими в желудочно-кишечном тракте. КЦЖК могут участвовать в регуляции перистальтики и оказывать возбуждающее или ингибирующее действие на моторику желудочно-кишечного тракта. Недавно было показано, что эффекты КЦЖК могут быть опосредованы через рецепторы свободных жирных кислот 2 (FFA2) и 3 (FFA3) типа, хотя неясно их роль при развитии СРК. Целью нашего исследования являлся анализ роль FFA2 и FFA3 в эффектах бутирата на спонтанную активность толстой кишки мыши.

Эксперименты проводили на мышах возрастом 45 дней. Сила сокращения сегментов проксимального отдела толстой кишки мыши регистрировалась в изометрических условиях. В течение всего эксперимента препарат омывался аэрированным раствором Кребса. Бутират натрия использовали в концентрации 10 мМ.

В контроле проксимальная часть толстой кишки мыши демонстрировала спонтанную активность, начиная примерно через 45 минут после установки образца. Применение бутирата натрия вызывало снижение тонического напряжения, амплитуды и частоты спонтанных сокращений. Активация рецепторов FFA3 – AR420626 в концентрации 10 мкМ в течение 10 минут не изменяла параметры спонтанной активности сегментов. В этих условиях тормозящие эффекты бутирата натрия на тоническое напряжение, амплитуду и частоту спонтанных сокращений сохранялись и не отличались от его эффектов в контроле.

Ингибитор рецептора FFA2 – GLPG0974 (100 мкМ) также не изменял параметры сократимости толстой кишки контрольной группы. В этих условиях ингибирующее действие бутирата натрия на тоническое напряжение и амплитуду сохранялось, однако его влияние на частоту сокращений было менее выраженным по сравнению с контролем.

В модельной группе СРК ингибирующие эффекты бутирата натрия на спонтанную активность, вызванную AR420626 и GLPG0974 также сохранялись. При этом, частота спонтанных сокращений на фоне действия GLPG0974 были выражены в меньшей степени, чем в контрольной группе ($p > 0.05$).

Данные результаты позволяют предположить, что ингибирующее действие бутирата на спонтанную сократительную активность не связано с активацией рецепторов FFA3, но рецепторы FFA2 могут опосредовать ингибирующее действие бутирата натрия на частоту спонтанных сокращений.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-25-20045

Секреция нейромедиаторов во вкусовой почке

Рогачевская О.А.^{1*}, Черкашин А.П.¹, Хохлов А.А.¹, Колесников С.С.¹

¹ИБК РАН - ФИЦ ПНЦБИ РАН;

o.rogachevskaja@gmail.com

За первый этап формирования вкусовых ощущений, передающих информацию о качестве и ценности пищи, отвечают вкусовые рецепторные клетки, контактирующие с веществами, растворенными в слюне. Вкусовые клетки сгруппированы в плотные ассоциаты – вкусовые почки, и по морфофункциональным критериям подразделяются на четыре типа: зрелые веретенообразные рецепторные клетки типа I – III, апикальная мембрана которых достигает вкусовой поры, и базально расположенные незрелые клетки (IV тип). В клетках типа II («истинно» рецепторные клетки, экспрессирующие рецепторы горького, сладкого, умами и другие компоненты цепи вкусовой трансдукции) функционирует неканонический безвезикулярный химический синапс, где нейротрансмиттер АТФ секретируется через каналы кальций-независимым образом. Клетку типа II и примыкающее нервное окончание окружает астроцитоподобная клетка типа I, формируя межклеточный компартмент, подобный синаптической щели. Считается, что вкусовые клетки типа I детектируют соленое и через генерацию потенциала действия непосредственно активируют прилежащее нервное окончание. Клетки типа III (опосредуют кислый и, возможно, некоторые соленые стимулы), называемые еще «синаптическими», единственные во вкусовой почке формируют классические химические синапсы с нервными окончаниями и в ответ на вкусовую стимуляцию квантово высвобождают серотонин кальций-зависимым образом. Таким образом, клетки типа II и III полученную информацию о вкусовом стимуле преобразуют в секрецию нейромедиаторов (АТФ и серотонина преимущественно), активирующих афферентные нервные окончания.

Поскольку зачастую в физиологических экспериментах *in vitro* требуется регистрация выброса нейромедиатора из отдельной вкусовой клетки, что приводит к необходимости детектировать наномолярные концентрации нейромедиатора в локальном объеме экспериментальной камеры, одним из основных подходов, используемых при исследовании вкусовой рецепции, является метод клеток-сенсоров, экспрессирующих рецептор секретируемой молекулы и генерирующих клеточный ответ на появление нейромедиатора.

В частности, для изучения регуляции секреции серотонина во вкусовых клетках типа III, нами был создан сенсор серотонина на базе клеток СНО и 5-HT_{2C} рецептора, сопряженного с системой мобилизации внутриклеточного кальция, что позволило регистрировать его сигналы с помощью Ca²⁺-зондов и микрофотометрии. Однако, полученный биосенсор генерировал Ca²⁺ сигналы по принципу «все-или-ничего», что демонстрировало лишь сам факт секреции нейромедиатора. Для получения количественной информации нами был создан градуальный сенсор серотонина на основе клеток НЕК293, серотонинового рецептора типа 5-HT₄, сопряженного с аденилатциклазным каскадом, и генетически кодируемого цАМФ-сенсора (флуоресцентный белок Pink Flamindo), что дало возможность детально изучить механизмы регуляции секреции серотонина из вкусовых клеток типа III.

Клетки СНО, экспрессирующие гетеродимерный ионный канал P2X₂/P2X₃, и клетки COS, экспрессирующие эндогенные P2Y рецепторы, использовались в качестве сенсоров при изучении секреции АТФ,

что позволило нам не только впервые продемонстрировать факт секреции АТФ вкусовыми клетками типа II, но и детально изучить его механизмы.

Вкусовая стимуляция клеток типа III не приводила к генерации ответов клетками-сенсорами АТФ, однако используя флуоресцентный краситель куинакрин, который специфически окрашивает АТФ-содержащие везикулы в цитоплазме клеток, и конфокальный микроскоп, мы показали, что в ответ на деполяризацию клеток типа III наблюдалось уменьшение везикуло-подобных структур у базальной мембраны, что может рассматриваться как свидетельство экзоцитоза АТФ в качестве нейротрансмиттера этими вкусовыми клетками.

При использовании метода биосенсоров для исследования стимул-зависимой секреции нейромедиаторов, практически невозможно стимулировать только апикальную мембрану клеток, и существует вероятность регистрации неспецифических эффектов вкусовых соединений. Поэтому для on-line мониторинга секреции АТФ в условиях физиологически адекватной стимуляции нами была разработана уникальная методика на основе подхода Уссинга и люциферин-люциферазного метода. Для этого фрагмент языкового эпителия, содержащего желобоватый вкусовой сосочек, закреплялся в модифицированной камере Уссинга, которая за счёт физической изоляции апикальной и базолатеральной частей позволила стимулировать отдельно апикальную часть вкусовых клеток, экспонированную в верхнюю ячейку камеры, и детектировать АТФ, секретирующийся из базальной части эпителия в нижнюю ячейку камеры, заполненную смесью люциферин-люциферазы. Эта методика позволила визуализировать выброс АТФ языковым эпителием *ex vivo* в ответ на стимуляцию вкусовыми веществами при сохранении жизнеспособности вкусовой ткани и ее способности отвечать на горькие вещества в течении нескольких часов.

Описанные подходы существенно расширяют инструментарий, используемый при изучении секреции нейромедиаторов, и могут использоваться для разных типов клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-14-00031.

Сократительная активность легочной артерии в моделях изменения объема гладкомышечных клеток

Гусакова В.С.^{1*}, Пшемьский М.А.¹, Рашкаускайте В.А.¹, Зайцева Т.Н.¹, Смаглий Л.В.¹, Гусакова С.В.¹
¹*СибГМУ Минздрава России;*
ryd4enkoviknoriya@mail.ru

Важным аспектом функционирования клеток и тканей организма является поддержание нормального клеточного объема. Известно, что развитие гипоксической легочной гипертензии приводит к набуханию гладкомышечных клеток и ремоделированию гладкомышечного слоя легочной артерии. Что определяет необходимость выявления существующих взаимосвязей между процессами регуляции сократительных функций гладкомышечных клеток сосудов и изменения объема гладкомышечных клеток. Исследование проводили на сегментах легочной артерии крыс линии Wistar с использованием неселективного блокатора хлорного транспорта DIDS, селективного блокатора объем-зависимых хлорных каналов DCPIB, блокатора $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта буметанида. Сокращения гладкомышечных клеток в моделях изменения объема добивались путем помещения сегментов в гиперосмотический раствор, содержащий 120 мМ сахарозы (гиперосмотически-индуцированное сокращение), гипоосмотический раствор, содержащий сниженную концентрацию NaCl (гипоосмотически-индуцированное сокращение) и сменой гипоосмотической среды на осмоосмотическую (изоосмотически-индуцированное сокращение). Одним из механизмов объем-зависимой регуляции сократительной активности гладких мышц легочной артерии является активация $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта и объем-зависимых хлорных каналов. Выявлено, что буметанид вызывает разнонаправленный эффект на гиперосмотически-индуцированные сокращения, зависящий от концентрации и времени предобработки. Буметанид снижает амплитуду гипоосмотически-индуцированного сокращения, тогда как при осмоосмотической стрижии клеток буметанид увеличивает амплитуду и устраняет транзитный характер сократительного ответа. Блокаторы хлорных каналов DIDS и DCPIB снижают амплитуду и длительность сокращений в моделях изменения объема клеток, селективный блокатор объем-зависимых хлорных каналов DCPIB оказывает более выраженный эффект.

Структурно-физиологические исследования калиевых каналопатий

Ли Б.², Чжан Х.², Мищенко А.², Глухов Г.С.^{1,2}, Пашков А.¹, Май Л.², Карлова М.Г.¹, Новоселецкий В.Н.^{1,2}, Абрамочкин Д.В.^{1,2}, Заклязьминская Е.В.³, Соколова О.С.^{1,2*}

¹МГУ, биологический факультет;

²Университет МГУ-ППИ, Шэньчжэнь, Китай;

³Российский научный центр хирургии имени академика Петровского, Москва, Россия;

sokolova184@gmail.com

Калиевые токи IKs, IKr, It0, IK1, ISS и IK2P способствуют реполяризации в кардиомиоцитах в нормальных и неработающих сердцах. Мутации в генах, кодирующих альфа- и бета-субъединицы калиевых каналов, проводящих эти токи, приводят к ряду аритмических нарушений, таких как синдром удлиненного QT (LQTS), синдром укороченного QT (SQTS), семейная фибрилляция предсердий (FAF), синдром Бругада (BrS) и синдром ранней реполяризации (ERS), а также могут встречаться у жертв внезапной смерти (SCD) (OMIM). Мутации с потерей функции (LoF) обычно приводят к LQTS, тогда как мутации с усилением функции (GoF) имеют более вариабельный вид (SQTS, BrS, ERD и FAF). Предположительно, клинический фенотип и изменения на ЭКГ у пациентов с мутациями в этих генах коррелируют с дефектами ионной проницаемости. С другой стороны, существует множество смешанных и перекрывающихся фенотипов, являющихся результатом сложных молекулярных путей дисфункции каналов. Современные технологии секвенирования нового поколения (NGS) предоставляют уникальную возможность одновременно тестировать множество генов у пациентов с подозрением на каналопатии и выявлять генетическую причину заболевания. Однако большой объем проведенного генетического тестирования выявляет множество редких/уникальных генетических вариантов, клиническое значение которых неизвестно. Правильная интерпретация этих генетических данных имеет решающее значение для правильного генетического консультирования и клинического лечения, включая выбор оптимального антиаритмического лечения, оценку риска SCD и принятие решения об имплантации антиаритмического устройства. Таким образом, функциональные исследования вновь обнаруженных вариантов имеют решающее значение для классификации варианта как патогенного или непатогенного.

Мы представляем результаты генетического скрининга генов KCNJ2, KCNQ1 и KCNH2 в российской когорте пациентов с LQTS и BrS, а также обсуждаем структурные предпосылки для интерпретации этих генетических вариантов. Работа поддержана Грантом РНФ 22-14-00088 и муниципальным правительством Шэньчжэня и университетом МГУ-ППИ.

Структурные изменения мембраны и цитоскелета эритроцита под воздействием гормонов

Мокрушников П.В.^{1*}, Рудяк В.Я.^{1,2,3}

¹Новосибирский Государственный Архитектурно-Строительный Университет (СибСТРИН), Новосибирск, Россия;

²Институт Теплофизики, Сибирское отделение РАН, Новосибирск, Россия;

³Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия;

pavel.mokrushnikov@bk.ru

В литературе достаточно подробно обсуждается каскад биохимических реакций при взаимодействии гормонов и клеток [1], которые меняют функции мембран и клеток. Тем не менее, до сих пор слабо изучены структурные изменения мембран, возникающие при их взаимодействии с гормонами стресса и андрогенами. Под изменением структуры (конформации) плазматических мембран понимается изменение вторичной, третичной и четвертичной структур мембранных белков, фаз липидного бислоя, перераспределение белков и липидов по бислою, изменение морфологии мембран. Слабо изученными остаются и происходящие при этом последующие изменения функций мембран и клеток. Целью данной работы является экспериментальное изучение структурных изменений мембраны и цитоскелета эритроцита, возникающих под воздействием гормонов стресса (кортизола, адреналина, норадреналина) и андрогенов (андростерона, тестостерона, ДЭА, ДЭАС), далее просто гормонов.

Методами атомно-силовой микроскопии показано, что при взаимодействии мембран эритроцитов с гормонами мембраны покрываются квазипериодическими складками. Они появляются из-за усиления продольных и поперечных механических напряжений в мембране, вызванных изменением конформации мембранных белков и образованием вокруг них белок-липидных доменов. Длина волны складок плазматических

мембран при этом равна или кратна 100 нм. Это говорит о том, что именно вокруг белков, связанных с цитоскелетом и возникают белок-липидные домены, поскольку размер ячейки спектрин-актин-анкириновой сети составляет 100 нм. Результаты исследований, полученных флуоресцентными методами и ИК-спектроскопии подтверждают наше предположение. Флуоресцентными методами было установлено, что при связывании гормонов с плазматической мембраной менялась конформация мембранных белков. Методами ИК-спектроскопии было установлено, что при этом увеличивается интенсивность связей между функциональными группами белков и липидов в мембране, возрастает упорядоченность белков и липидного бислоя. Флуоресцентными методами с помощью зонда пирен было установлено, что при воздействии гормонов на мембрану, за исключением ДЭАС, микровязкость липидного бислоя сильнее увеличивалась в белок-липидной области взаимодействия, чем в области липид-липидных взаимодействий. При добавлении цитохалазина В, который вызывает ингибирование полимеризации актиновых филаментов спектрин-актин-анкириновой сети, к взвеси эритроцитов с норадrenalином, складки на поверхности мембраны не наблюдались [2]. Это значит, что без изменения конформации мембранных белков и белков цитоскелета складки в мембране не создаются.

Можно дать следующее объяснение полученным результатам. Известно, что гормоны стресса и андрогены при взаимодействии с плазматическими мембранами связываются с адренорецепторами, меняя их конформацию [1]. Адренорецепторы взаимодействуют со спектрин-актин-анкириновой сетью, меняют её конформацию, а через неё меняют конформацию мембранных белков, связанных с цитоскелетом. В белок-липидных доменах, образующихся около этих мембранных белков, поменявших свою конформацию после взаимодействия мембраны с гормонами, происходит переход липидного бислоя из жидкокристаллической неупорядоченной фазы в гель-фазу $L_d \rightarrow L_\beta$ или в жидкокристаллическую упорядоченную фазу $L_d \rightarrow L_o$. Происходит деформация липидного бислоя, которая не является свободной в цитоплазматической мембране, этому мешает спектрин-актин-анкириновая сеть, к которой крепятся белок-липидные домены. В мембране возникают механические продольные напряжения чередующихся сжатий и растяжений [2, 3]. При малых изменениях конформации мембранных белков складки выступают над поверхностью мембраны на 2-3 нм. Это соответствует разности высот липидного слоя в жидкокристаллической упорядоченной фазе L_o около мембранных белков и жидкокристаллической неупорядоченной L_d фазе между доменами. При дальнейшем изменении конформаций адренорецепторов и спектрин-актин-анкириновой сети происходит сжатие этой сети. Это сжатие создает поперечные и продольные усилия в мембране, приложенные к точкам крепления сети к мембране. При увеличении этих механических напряжений и напряжений, создаваемых несвободной деформацией липидного бислоя, мембрана теряет устойчивость и покрывается складками высотой до 50 нм.

Таким образом, в эритроцитарной мембране при воздействии на нее гормонов (андрогенов, катехоламинов) образуется неподвижная квазипериодическая сеть белок-липидных доменов. Домены образуются вокруг мембранных белков, связанных с цитоскелетом. Образование в мембранах этой сети может влиять на перенос молекул газа через мембрану кинками-солитонами [4], латеральную диффузию липидов в мембране [5], активность её Na^+, K^+ -АТФаз, на пластичность мембран и возможность прохождения эритроцитов по микрокапиллярам [2].

Список литературы:

1. Mitre-Aguilar, I.B. Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer / I.B. Mitre-Aguilar, A.J. Cabrera-Quintero, A. Zentella-Dehesa // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2015. – Vol. 8(1) – P. 1–10.
2. Мокрушников П.В. Структурные переходы в мембранах эритроцитов (экспериментальные и теоретические модели) / Мокрушников П.В., Панин Л.Е., Панин В.Е., Козельская А.И., Зайцев Б.Н. // Новосибирск, НГАСУ, 2019, с. 286.
3. Mokrushnikov P.V. Mechanical Stresses in the Lipid Bilayer of Erythrocyte Membranes / P.V. Mokrushnikov // in book: “Lipid Bilayers: Properties, Behavior and Interactions” edited by Mohammad Ashrafuzzaman. – NY: – Nova Science Publishers, 2019. – P. 43-91.
4. Mokrushnikov P.V. Mechanism of gas molecule transport through erythrocytes' membranes by kinks-solitons / P.V. Mokrushnikov, V.Ya. Rudyak, E.V. Lezhnev // *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics.* - 2021. - V. 12(1). - P. 22-31.
5. Mokrushnikov P.V. Lipids lateral diffusion study associated with structural changes in cytoplasmic membranes / P.V. Mokrushnikov, V.Ya. Rudyak // *Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology, (BGRS/SB-2022), The Thirteenth International Multiconference, Abstracts, 04–08 July, 2022 Novosibirsk, Russia, P. 813-814*

Тушение флуоресценции NBD-PC в DOPC, DOPA и TOCL содержащих мембранах при добавлении цитохрома с

Конюхова С.П.^{1*}, Волков В.В.¹, Степанов Г.О.¹, Осипов А.Н.¹
¹РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;
sopfia.k.2000@gmail.com

На сегодняшний день в молекулярной медицине одним из перспективных подходов к лечению патологий является использование специфических внутриклеточных механизмов запрограммированной клеточной гибели[1]. Одни из самых изученных видов клеточной гибели - это апоптоз и ферроптоз[2,3], в развитии которых играет важную роль окисление фосфолипидов мембран. Причем если окисление кардиолипина является маркером апоптоза, для ферроптоза специфично окисление фосфатидилэтаноламина с арахидоновой кислотой. Такая специфичность окисления различных фосфолипидов при различных процессах клеточной гибели дало начало новому научному направлению – регуляторная липидомика.

Несмотря на это, до сих пор не все элементы механизма развития программируемой смерти клеток ясны. Например, взаимодействие цитохрома С (CytC) с кардиолипин-содержащими мембранами ведет к увеличению пероксидазной активности CytC и запускает апоптоз[4,5], но остается непонятным, почему при наличии кардиолипина и CytC в составе митохондрий нормальных клеток они не погибают. Это может быть связано с тем, что не только кардиолипин (TOCL), но и другие фосфолипиды принимают участие во взаимодействии с CytC. Одним из таких фосфолипидов может быть фосфатидная кислота (DOPA), которая структурно очень похожа на кардиолипин, так как является его составной частью (кардиолипин состоит из двух молекул фосфатидной кислоты). Одновременно с этим, количество DOPA регулируется при помощи фосфолипазы D, а фосфолипаза D присутствует на внешней листке мембран митохондрий.

В данной работе исследовалась способность CytC формировать комплексы с DOPA и с TOCL. Материалами, использованные в работе, были фосфатидилхолиновые липосомы с 20% содержанием DOPA или TOCL, а также с 1% примесью флуоресцентно-меченного фосфатидилхолина (NBD (C6) PC). Взаимодействие CytC с мембранами, содержащими флуоресцентную метку, приводит к резкому тушению флуоресценции за счет близкорасположенного гемового железа. При помощи спектрофлуориметрии NBD (C6) PC (λ возбуждения 460 нм, λ испускания 480–590 с максимумом в 536 нм) было показано взаимодействие фосфолипидных мембран с CytC.

Так, интенсивность флуоресценции NBD (C6) PC в составе DOPA и TOCL содержащих мембран уменьшается на 30,5% и 17,8% соответственно, при добавлении CytC (20:1). Все сравнения выполнены относительно мембран, состоящих полностью из фосфатидилхолина.

Таким образом однозначно показано, что не только TOCL, но и DOPA содержащие мембраны могут выраженно взаимодействовать с цитохромом С, а значит именно это взаимодействие может играть иницирующую роль в развитии апо- и ферроптоза.

1. Льюин Б. и др. Клетки. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. — 951 с.

2. Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина, А.В. Алексеев (2013) 'МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АПОПТОЗА. СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМА с С КАРДИОЛИПИНОМ', БИОХИМИЯ, том 78, вып. 10, с. 1391 – 1404

3. Marcus Conrad, Valerian E. Kagan, Hülya Bayir, Gabriela C. Pagnussat, Brian Head, Maret G. Traber, and Brent R. Stockwell (2018) 'Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species', Genes And Development, 32, pp. 602–619

4. Stepanov G.O., Gnedenko O.V., Osipov A.N. et. al. Evaluation of cytochrome c affinity to anionic phospholipids by means of surface plasmon resonance // FEBS Letters. 2006. Vol. 583. P. 97–100.

5. Cytochrome c-cardiolipin complex // Biochemistry Moscow. 2013. Vol. 78. No. 10. P. 1391–1404.

Ультраструктурные изменения митохондрий сердца крыс при адаптации организма к гипоксии разной степени тяжести

Хмиль Н.В.^{1*}, Павлик Л.Л.¹, Германова Э.Л.², Лукьянова Л.Д.², Миронова Г.Д.¹
¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики, РАН, Пущино, Россия;
²Институт общей патологии и патофизиологии, РАН, Москва, Россия;
nat-niig@yandex.ru

Митохондрии, как первичные потребители клеточного кислорода, тесно интегрированы в пути восприятия кислорода, а также адаптации к его недостатку посредством своих структурных или функциональных модификаций. В работе изучены ультраструктурные особенности митохондрий сердца в ответ на однократное и многократное воздействие различных режимов гипобарической гипоксии (ГБГ, FiO₂–14%–10%–8%). Исследование проведено на крысах, имеющих различную исходную резистентность к дефициту кислорода: низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ). Исходя из характера локализации в клетке митохондрии кардиомиоцитов как правило разделяют на три субпопуляции: межфибриллярные (МФ), субсарколеммальные (СС) и околядерные (пренуклеарные) (ОЯ).

В работе установлено, что НУ и ВУ животные имеют исходные различия в структуре всех трёх типов митохондрий сердца, а именно:

1. В норме МФ митохондрии НУ группы имели матрикс средней плотности, в то время как в митохондриях ВУ группы матрикс был более электронно-плотным. Кроме того, если у НУ животных МФ митохондрии, как правило, располагаются в один ряд между миофибриллами, то у ВУ животных они часто, локализуются в 2 и более ряда.

2. Для СС митохондрий НУ животных было характерно расположение по одной органелле в инвагинациях сарколеммальной мембраны, что придавало ей извитой вид, в то время как те же митохондрии в ВУ группе располагаются небольшими скоплениями под сарколеммальной мембраной.

3. ОЯ митохондрии в обеих группах животных при нормоксии имели характерное расположение по полюсам ядра, а сами ядра располагались в середине клетки. При этом средняя плотность ОЯ органелл, как и среднее число мелких митохондрий было значительно выше у ВУ животных.

Таким образом, сниженная плотность матрикса, менее плотная упаковка крист и меньшее общее количество и количество малых митохондрий в МФ и ОЯ типе, также как характер расположения митохондрий в субсарколеммальной зоне у НУ животных, по сравнению с ВУ, по всей видимости, определяют сниженную у НУ крыс устойчивость к гипоксии.

«Слабое» и «умеренное» однократное 30 мин. воздействие ГБГ не приводило деструктивным изменениям в ультраструктуре всех трех субпопуляций митохондрий НУ и ВУ животных. Однако при «тяжелой» гипоксии у НУ животных кроме адаптивных изменений наблюдались и небольшие деструктивные, характерные для патологических состояний нарушения (хаотичное расположение и лизис крист, вакуолизация, диффузный лизис миофибриллярных пучков). В СС зоне, особенно у НУ животных, при «тяжелой» гипоксии усиливались процессы слияния митохондрий. Они резко укрупнялись, вытягиваясь в длину. Клеточная мембрана при этом плотно опоясывала митохондрии, увеличивая площадь их общения с кислородом крови. Характерным отличием для митохондрий в ОЯ зоне у НУ в отличие от ВУ было резкое увеличение количества мелких органелл.

Отличительной чертой в морфологии кардиомиоцитов при «тяжелой» гипоксии как у НУ, так и у ВУ было изменение локализация ядер и их появление около сарколеммы. Движение ядер к сарколемме, вероятно, является одним из механизмов адаптации организма к гипоксии.

Долгосрочная адаптация формировалась в результате одночасового многократного (в течение 12 дней) гипоксического воздействия трех разных режимов ГБГ.

Ультраструктурный анализ МФ митохондрий показал, что «слабое» и «среднее» гипоксическое воздействие не приводит к большим изменениям у обоих типов животных. Характерной особенностью ультраструктуры МФ митохондрий НУ животных стало появление после «слабого» ГБГ воздействия электронно-плотных образований, напоминающих «микро-митохондрии», которые ранее описаны в литературе и нами при воздействии гипоксической гипоксии.

Выраженные изменения в результате «слабого» и «среднего» гипоксического воздействия были отмечены в СС и ОЯ митохондриях только НУ животных. Несмотря на то, что плотность матрикса, упаковка крист и форма органелл значимо не менялись, тем не менее общее число как СС, так и ОЯ митохондрий возрастало практически в 2 раза в группе НУ. СС митохондрии располагались не по одной органелле в инвагинациях сарколеммальной мембраны, а скоплениями от 3 до 15 органелл. При этом наблюдалась транслокация митохондрий в субсарколеммальную зону.

Изменения, вызванные воздействием «тяжелой» гипоксии, во всех субпопуляциях митохондрий как НУ, так и ВУ животных были сравнимы с воздействиями предыдущих гипоксических режимов. Форма органелл, электронная-плотность их матрикса, упаковка крист и межкристовое пространство значимо не менялись, тем не

менее общее число как СС, так и ОЯ митохондрий возрастало по сравнению с контролем в группе НУ и не менялось у ВУ.

Таким образом, транслокацию и перегруппировку митохондрий под сарколеммальную и ядерную мембраны, которые мы наблюдали при некоторых воздействиях, можно рассматривать как адаптивную, компенсаторно-приспособительную реакцию митохондриального аппарата клетки на изменения физиологического состояния организма в целом. К адаптационным процессам относится и появление митохондрий, которые, как принято считать, являются предшественниками малых митохондрий. Адаптационные процессы происходили в обоих фенотипах животных, однако были более выражены у НУ животных. Это согласуется с полученными нами ранее данными о том, что гипоксические тренировки приводят к значительно большему увеличению времени жизни при «экстремальной» гипоксии (3% O₂) НУ животных, чем ВУ. Учитывая все полученные данные, можно полагать, что для лечения больных в барокамере рекомендуется использование 30-60 мин гипоксии «средней» тяжести в течение 12 дней, так как именно в этот период развиваются оптимальные условия адаптации животных к гипоксии. Работа поддержана грантом РНФ № 23-25-00441.

Участие альфа2-адренорецепторов в регуляции биоэлектрических параметров кардиомиоцитов предсердий новорожденных крысят

Галиева А.М.^{1*}, Зиятдинова Н.И.¹, Зефилов А.Л.², Исаков Н.Г.¹, Зефилов Т.Л.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия;

galieva_alina94@mail.ru

Адренергические рецепторы, также называемые адренорецепторами, представляют собой белки, состоящие из 400-600 аминокислот, с семью доменами, охватывающими мембрану, и принадлежат к суперсемейству рецепторов, связанных с G-белком (GPCR). Они представляют собой мембранные рецепторы, которые активируют G-белки после связывания лиганда, вызывая тем самым изменение на один или несколько ионов и / или активируя фермент, присоединенный к рецептору. Белки G_s и G_i активируют и ингибируют фермент аденилатциклазу, в то время как белки G_q активируют фосфолипазу C. [1] По мнению ряда авторов, в миокарде желудочков крыс и предсердия морской свинки и человека при активации альфа2-адренорецепторов происходит активация G_i-белка, что снижает активность аденилатциклазы, уровень цАМФ, и тем самым – активность протеинкиназы А, что в итоге блокирует экзоцитоз норадреналина. Кроме того, не исключается, что к этому процессу причастен и путь G_q-белок- протеинкиназа C. Полагают, что подтипы альфа2-адренорецепторов (α_{2A}, α_{2B} и α_{2C}) связаны с G_i белком, т.е. реализуют единую систему сигнализации. [2]

Исследование проведено на однедельных белых беспородных крысах. Наркотизированным животным вскрывали грудную клетку, изготавливали многоклеточный препарат с ушком правого предсердия сердца. Электрическую активность кардиомиоцитов изучали с использованием внутриклеточного микроэлектродного отведения при навязанном ритме с частотой 5 Гц. Раствор агониста α₂-АР клонидина гидрохлорида (10⁻⁶ М) подавался в течение 20 мин.

У однедельных животных клонидин гидрохлорид в изученной концентрации не вызывал достоверных изменений в значении мембранного потенциала, длительности фазы деполяризации и амплитуды потенциала действия. Однако увеличивал фазу реполяризации потенциала действия на уровне 50% (p<0,05), 90% (p<0,05).

Таким образом, стимуляция α₂-адренорецепторов неселективным агонистом в кардиомиоцитах однедельных крысят с навязанным ритмом в исследуемой концентрации приводила к увеличению длительности фазы реполяризации потенциала действия, что, возможно, связано с возрастными особенностями каскадов внутриклеточных посредников данного типа адренорецепторов сердца.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-15-00121, <https://rscf.ru/project/21-15-00121/>.

Список литературы

1. Motiejunaite J. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines Ann Endocrinol (Paris) 2021 Jun;82(3-4):193-197.

2. Коротаева Ю.В. Альфа2-адренорецепторы миокарда (обзор литературы) /Ю.В. Коротаева, В.И. Циркин // Известия Коми научного центра УрО РАН.- 2015.- № 2(22).- С.57-64

Участие мембранных механизмов в регуляции электрокинетических свойств эритроцитарных популяций при стрессе

Зверев А.А.^{1*}, Шамратова В.Г.², Даутова А.З.¹, Исаева Е.Е.²

¹Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма;

²Башкирский государственный медицинский университет;

[Alekccei5@rambler.ru](mailto:Alekcei5@rambler.ru)

Важнейшим параметром эритроцитов, обеспечивающим их беспрепятственное движение по кровеносному руслу, является отрицательный заряд поверхности. О величине клеточного заряда принято судить по их электрокинетическому потенциалу (ЭКП) и экспериментально измеряемой скорости передвижения клеток в электрическом поле - электрофоретической подвижности (ЭФП) (Elblbesy MA, 2017). Снижение поверхностного потенциала эритроцитов, уменьшая силы электростатического отталкивания клеток, усиливает их агрегацию, изменяет вязкость крови, инициирует процесс тромбообразования (Sheremet'ev IuA, 2013). В силу этого сохранение оптимальной величины заряда эритроцитов как в состоянии покоя, так и при функциональных нагрузках имеет первостепенное значение для поддержания суспензионной устойчивости и необходимых реологических характеристик движущейся крови. Естественно, что информация о закономерностях и механизмах обеспечения такой стабильности представляет не только теоретический, но и практический интерес.

Проведенные нами исследования ЭФП эритроцитов (ЭФПЭ) в норме, патологии, физическом и эмоциональном напряжении организма показали, что решению этих задач может способствовать дифференциальный подход к изучению эритроцитарной популяции (Матюшичев В.Б., 2007). С этих позиций эритроциты периферической крови рассматривались не как гомогенная масса функционально тождественных клеток, а как клеточная популяция, состав и динамика которой отражают мембранные функции и метаболизм отдельных клеток, влияние плазменных факторов, деятельность органов продукции и деструкции эритроцитов. При таком подходе удалось установить, что биоэлектрический гомеостаз эритроцитов достигается главным образом благодаря перераспределению их отдельных субпопуляций в пропорциях, способных обеспечить сохранение оптимального суммарного уровня ЭКП.

Цель работы заключалась в изучении вклада мембранных механизмов в регуляцию электрокинетических свойств эритроцитарных популяций при стрессе.

Методы. Обследовали группу студентов (n=20) в возрасте 18-19 лет, находящихся в состоянии экзаменационного стресса, и ту же группу лиц в состоянии эмоционального и физического покоя (контроль). ЭФП эритроцитов определяли методом микроэлектрофореза в аутоплазме, разведенной в среде Рингера. Для количественной оценки качественных особенностей структуры популяций использовались параметры формы распределения ЭФПЭ. Помимо обычно учитываемых средних величин, в расчет принимались параметры гистограмм: коэффициенты асимметрии (As) и эксцесса (Ex), позволяющие выделить в общей популяции отдельные субпопуляции эритроцитов и оценить степень их гетерогенности. Активность Na,K-АТФазы оценивали путем добавления строфантина в 10⁻⁵ М.

Результаты. Первичные процессы, лежащие в основе изменения баланса субпопуляций эритроцитов с разным зарядом, могут реализовываться на разных уровнях, начиная с мембранного и заканчивая системным. Учитывая, что в формировании ЭКП клетки участвует наряду с относительно пассивной (поверхностный заряд) активная составляющая, отражающая проницаемость мембран и работу ионных насосов, можно допустить, что к динамике процессов перераспределения субпопуляций эритроцитов по их ЭКП причастны ионтранспортные мембранные системы (Krylov VN, 2014). Универсальным звеном, осуществляющим метаболическую саморегуляцию рецепторных и электрических свойств мембран, является Na, K-насос. О влиянии Na, K-насоса на электрокинетические свойства эритроцитов свидетельствует наличие корреляций между величиной ЭФПЭ и активностью Na, K- АТФазы эритроцитарных мембран. У студентов находящихся в состоянии стресса статистически значимо увеличивается ЭФПЭ, за счет увеличения доли клеток с повышенным ЭКП. Под влиянием строфантина ЭФПЭ снижается, благодаря ингибированию насосов субпопуляции клеток с повышенным ЭКП. В состоянии эмоционального равновесия изменения средних величин ЭФПЭ и параметров распределения под влиянием строфантина не наблюдалось. Способность строфантина подавлять работу насоса распространяется лишь на однородные субпопуляции (положительный Ex), отличающиеся более высоким, чем в среднем по популяции, ЭКП (отрицательная As). При эмоциональном и физическом напряжении организма доля таких субпопуляций в общем пуле возрастает, указывая на усиление функций Na,K -насоса. Что касается преобладания в популяции клеток с пониженным уровнем ЭФП, то здесь наблюдается как отсутствие реакции на действие ингибитора, так и некоторое повышение ЭКП, свидетельствуя об изменении состояния мембраны, в частности, ее проницаемости. К числу факторов, обуславливающих деструктивные изменения в мембранах, очевидно, можно отнести активацию свободнорадикальных процессов, негативное влияние плазменного окружения, pH среды и др.

Таким образом, в условиях относительного динамического равновесия процессов продукции и разрушения эритроцитов, к перераспределению баланса субпопуляций причастны механизмы ауторегуляции, реализующие свое действие главным образом на мембранно-клеточном уровне. Проведенные нами эксперименты с использованием *in vitro* ингибитора Na, K-насоса строфантина (10-5 М) показали, что ингибирующее действие строфантина прослеживается только в отношении субпопуляции клеток с повышенной ЭФПЭ.

Список литературы

1. Krylov VN, Deriugina AV, Konstantinova AI. [Electrophoretic mobility and activity Na,K-ATPase of erythrocytes in rats under stress]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2014 Nov;100(11):1297-302. Russian. PMID: 25665408.
2. Elblbesy MA, Moustafa ME. The Impact of Biophysical Properties of Erythrocytes on their Aggregation. *Int J Biomed Sci*. 2017 Jun;13(2):113-118. PMID: 28824347; PMCID: PMC5542914.
3. Sheremet'ev IuA, Popovicheva AN, Egorikhina MN, Levin GIa. [Study of the relationship between shape and aggregation change in human erythrocytes]. *Biofizika*. 2013 Mar-Apr;58(2):264-8. Russian. PMID: 23755552.
4. Матюшичев, В. Б. Электрокинетическая структура эритроцитарных популяций и функциональное состояние организма / В. Б. Матюшичев, В. Г. Шамратова // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. – 2007. – № 4. – С. 119-124.

Фазовый переходы в системах химерных антиген рецепторов

Приходько И.В.¹, Гурия Г.Т.^{1,2*}

¹ФГБУ "НМИЦ гематологии" Минздрава России;

²Московский Физико-Технический Институт;

guria@blood.ru

Создание химерных антиген рецепторов — одна из наиболее перспективных технологий для лечения онкологических заболеваний [1]. В настоящее время активно разрабатываются модификации химерных антиген рецепторов, ставящих целью увеличить не только чувствительность, но и специфичность распознавания раковых клеток [2].

В ряде недавних работ утверждается, что специфичность химерных антиген рецепторов связана с их способностью к кластеризации [3,4]. Механизмы кластеризации рецепторов активно изучаются [5,6]. Обнаружено, что, в ряде случаев, механизм зарождения кластеров носит пороговый характер.

Оценка способности химерных антиген рецепторов к пороговому формированию кластеров может быть произведена с позиций теории нуклеации. За счет этого открываются возможности на *in vitro* стадиях разработки химерных антиген рецепторов производить сравнение их эвентуальной специфичности. В настоящее время, оценка специфичности производится на стадии *in vivo* испытаний [7]. Развитие идей нуклеационной теории [8] позволяет производить оценки специфичности узнавания, основываясь на анализе способности химерных антиген рецепторных систем претерпевать фазовые переходы. Построены соответствующие параметрические диаграммы.

Работа поддержана грантом РФФИ №20-34-90024.

Список литературы

1. Bories P., Ysebaert L. Chimeric antigen receptor T cells // *Bulletin du Cancer*. 2021. Vol. 108, № 10. 55–64 p.
2. Hirobe S. et al. The Effects of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Hinge Domain Post-Translational Modifications on CAR-T Cell Activity // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. Vol. 23, № 7.
3. Dong R. et al. Rewired signaling network in T cells expressing the chimeric antigen receptor (CAR) // *EMBO J*. 2020. Vol. 39, № 16. P. 1–14.
4. Liu D. et al. The Role of Immunological Synapse in Predicting the Efficacy of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Immunotherapy // *Cell Commun. Signal. Cell Communication and Signaling*, 2020. Vol. 18, № 1. P. 1–20.
5. Beppler C. et al. Visualizing and manipulating hyperstabilization of T cell microvilli contacts by engineered chimeric antigen receptors Casey // *bioRxiv*. 2022. P. 1–52.
6. Prihodko I. V., Guria G.T. Dynamic effects in nucleation of receptor clusters // *Entropy*. 2021. Vol. 23, № 10. P. 1–19.
7. Simonetta F. et al. Molecular Imaging of Chimeric Antigen Receptor T Cells by ICOS-ImmunoPET // *Clin. Cancer Res*. 2021. Vol. 27, № 4. P. 1058–1068.
8. Schmelzer J., Ulbricht H. Thermodynamics of finite systems and the kinetics of first-order phase transitions // *J. Colloid Interface Sci*. 1987. Vol. 117, № 2. P. 325–338.

Электрическая активность кардиомиоцитов предсердий при стимуляции NPY-рецепторов

Искаков Н.Г.^{1,2*}, Аникина Т.А.¹, Зверев А.А.², Насартдинова Р.Р.², Зефилов Т.Л.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет ;;

²Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма;
nikitaiskakov1992@mail.ru

Нейропептид Y (NPY) - это высоко консервативный пептид, который впервые был обнаружен в головном мозге свиньи. NPY представляет собой пептид состоящий из 36 аминокислот, который действует через семейство рецепторов, связанных с G-белком, и связан с многочисленными физиологическими процессами, включая питание, циркадные ритмы, стресс, страх, беспокойство и регуляцию кровяного давления. В настоящее время обнаружены восемь подтипов рецепторов, чувствительных для NPY (Y1-Y8). Действие NPY реализуется с помощью различных типов рецепторов которые имеют, как пре -, так и постсинаптическое расположение. Все типы рецепторов, по крайней мере, у млекопитающих, используют одни и те же сигнальные пути. В первую очередь – это Gi/o-сигнальный путь, приводящий к ингибированию образования цАМФ, мобилизации внутриклеточного Ca²⁺ и модуляции состояния Ca²⁺- и K⁺-каналов. NPY связывается преимущественно с Y1, Y2, и Y5 рецепторами.

Исследование проводилось на белых беспородных крысах 21-суточного возраста, которые характеризуются пиком частоты сердечных сокращений и высоким уровнем симпатических влияний на сердце (n=18). Из сердца готовились полоски миокарда правого предсердия с сохраненным синусным узлом и спонтанной активностью. Регистрацию потенциала действия (ПД) проводили в соответствии с классической методикой внутриклеточных отведений. Стекланные электроды изготавливались в день эксперимента на специальном горизонтальном пуллере P-1000 (Sutter Instruments, США) из боросиликатных стекланных капилляров BF 120-60-10 (Sutter Instruments, США) с внешним диаметром 1,2мм, внутренним – 0,6мм. Кончик микроэлектрода, заполняется раствором 3М KCl. Начальное сопротивление на кончике электрода составляло 30-80 МΩ. Регистрирующая часть установки включала в себя усилитель для внутриклеточных отведений с высоким входным сопротивлением (Neuroprobe 1600, A-M Systems, США) и устройства, визуализирующие и записывающие экспериментальные данные. Держатель микроэлектрода подключается к предусилителю головке усилителя. Выходной сигнал усилителя передавался к подключенному к персональному компьютеру аналогово-цифровому преобразователю E14 - 140 (L-card, Россия), осциллографу и затем регистрировался на компьютере с помощью программы Elph 3.0. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы "PowerGraph Professional 3.3" (Disoft). Рассчитывали изменения параметров потенциала действия в ответ на нейропептид Y в процентах от исходного. Достоверность различий рассчитывали по парному t критерию Стьюдента (p < 0,05). Использовали химические реактивы фирмы "Сигма". На одном препарате изучали эффект NPY в последовательно возрастающих концентрациях. Все растворы готовились в день эксперимента.

Целью нашего исследования явилось изучение роли нейропептида Y в электрической активности кардиомиоцитов 21-суточных животных.

Аппликация NPY в концентрации 10-8М вызывала уменьшение частоты возникновения потенциала действия на 13% (p<0.05). Длительность потенциала действия на уровне 20%, 50% и 90% реполяризации (ДПД20, ДПД50, ДПД90) увеличивалась с 17.4±1.3 до 19.3±1.1 мс, с 44.4±3.1 до 49.9±2.2 мс, с 99.1±5.1 до 108.9±4.2, что составляет 10%; 11%; 9%, соответственно (p<0.05; n=9). Остальные исследуемые параметры достоверно не изменялись. Увеличение концентрации на один порядок (NPY 10-7М) не приводило к достоверным изменениям исследуемых параметров (n=9). NPY в концентрации 10-6М вызывал уменьшение частоты возникновения потенциала действия на 21% (p<0.05) Длительность потенциала действия на уровне 20% реполяризации (ДПД20) увеличивалась с 19.0±1.9 до 19.9±2.0 мс, что составляет 5%, соответственно (p<0.05; n=9). Остальные исследуемые параметры достоверно не изменялись.

Таким образом, максимальный эффект наблюдался в концентрации 10-8М. Наблюдаемые изменения мы связываем с тем, что NPY через альфу субъединицу G-белка действует на If токи. В результате происходит уменьшение частоты возникновения потенциала действия и затягивание длительности ПД.

Электрическая активность рабочих миокардиоцитов крысы при стимуляции альфа2-адренорецепторов

Галиева А.М.^{1*}, Зефирова А.Л.², Зиятдинова Н.И.¹, Крылова А.В.¹, Зефирова Т.Л.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия;

galieva_alina94@mail.ru

Известно, что изолированный миокард крысы содержит бета1-адренорецепторы, бета2-адренорецепторы, бета3-адренорецепторы, бета4-адренорецепторы, а также альфа1-адренорецепторы и альфа2-адренорецепторы. [1]

Исследования показывают, что изоформы $\alpha 2$ -AR ($\alpha 2A$ -, $\alpha 2B$ - и $\alpha 2C$) экспрессируются в сердечных миоцитах с потенциалом защиты сердечной мышцы при адренергическом всплеске, регулируя внутриклеточную обработку Ca^{2+} и сократимость. Регулируя баланс между активностью протеинкиназы и фосфатазы, сарколеммальные $\alpha 2$ -AR способны уравнивать сигнальные каскады, провоцирующие гипертрофическое ремоделирование сердца при хронической активации адренергической и ангиотензинергической передачи сигналов. В этом отношении терапия на основе перепрограммирования генов или клеток, направленная на специфическое для сердца восстановление или усиление передачи сигналов $\alpha 2$ -AR, может представлять будущие терапевтические направления для профилактики или лечения сердечной недостаточности. [2]

Целью нашего исследования стало выявление эффекта стимуляции альфа2-АР на электрическую активность сердца взрослых крыс.

В работе были использованы белые беспородные крысы в возрасте 3,5-4 месяца. Эксперименты выполняли с использованием перфузируемого препарата (р-р Тироде, 37°C, pH=7.4) правого предсердия крысы в условиях ритмической стимуляции (5 Гц). Влияние клонидин гидрохлорида (10⁻⁶ М) на длительность потенциала действия (ПД) на уровне 50 и 90% реполяризации (ДПД50%, ДПД90%) оценивали с помощью стандартной микроэлектродной техники. В ходе экспериментов были соблюдены все требования этических норм работы с лабораторными животными. Показано, что клонидин гидрохлорида вызывает статистически значимое снижение ДПД50% и ДПД90%.

Модуляция адренергической активности с помощью фармакологических подходов играет важную роль в широком спектре сердечных расстройств. Электрофизиологический метод с использованием постоянного навязанного ритма позволяет сделать вывод о существенной роли $\alpha 2$ -АР в регуляции электрической активности рабочих кардиомиоцитов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-15-00121, <https://rscf.ru/project/21-15-00121/>.

Список литературы:

1. Коротаева Ю.В. Отрицательный инотропный эффект адреналина не связан с активацией бета1-, бета2-, альфа1- и альфа2-адренорецепторов/ Ю.В. Коротаева, В.И. Циркин // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, 2014, № 4 (1), с. 193–197.
2. Alekseev Alexey E. Sarcolemmal $\alpha 2$ -adrenoceptors in feedback control of myocardial response to sympathetic challenge Pharmacol Ther 2019 May;197:179-190.

Электрические поля на межфазных границах липидных мембран

Ермаков Ю.А.^{1*}

¹Институт Физической Химии и Электрохимии им. А.Н.Фрумкина РАН, Москва, Россия;

yury.a.ermakov@gmail.com

Липосомы, плоские бислоиные липидные мембраны (БЛМ) и монослои Ленгмюра многие годы используются для моделирования поверхностных характеристик биомембран, наиболее важные в той их части, которая определяется наличием липидного матрикса в окружении мембранных белков. В наших исследованиях мы акцентировали внимание на электрических явлениях, сопряженных с адсорбцией биологически значимых ионов, органических молекул и полипептидов на поверхности мембран, доступных для регистрации различными биоэлектрохимическими методами (1). Существенные сведения о структурных изменениях мембран, вызванных мембрано-активными соединениями, получены при регистрации дипольной компоненты граничного потенциала (2). В частности, удалось экспериментально доказать, что фазовое состояние заряженных компонент липидного окружения белков оказывает непосредственное влияние на функционирование многих процессов в клеточных

мембранах, опосредованных специфическими транспортными и сигнальными системами в биомембранах клеток (3;4). Ключевые вопросы, возникающие при интерпретации экспериментальных данных, относятся к выяснению той роли, которую играет состояние гидратации полярных групп фосфолипидов в распределении электрического поля на границах липидных мембран. Экспериментальные факты указывают на существенный вклад количества, ориентации молекул воды и их участие в образовании водородных связей с фосфатными группами фосфолипидов (5). Сочетание электрохимических методов, рентгеновской рефлектометрии и количественного анализа симуляций липидных систем методами молекулярной динамики позволяют раскрыть многие детали физико-химических процессов, связанных с зарядением межфазных границ (6). В докладе представлены основные факты, полученные при изучении адсорбции многовалентных неорганических ионов и молекул полилизиннов разного размера на поверхности липидных мембран.

1. Ермаков, Ю. А., Соколов, В. С., Акимов, С., Батищев, О. В. (2020) Журнал Физ.Химии 94, 342-348.
2. Ермаков, Ю. А. (2011) Биол. мембраны 28, 408-414.
3. Ermakov, Yu., Kamaraju, K., Dunina-Barkovskaya, A., Vishnyakova, K., Egorov, Y., Anishkin, A., and Sukharev, S. (2017) Biochemistry 56, 5457-5470.
4. Ermakov, Y. A., Kamaraju, K., Sengupta, K., and Sukharev, S. (2010) Biophys J. 98, 1018-1027.
5. Марукович, Н. И., Нестеренко, А. М., Ермаков, Ю. А. (2014) Биол. мембраны 31, 401-409.
6. Ermakov, Yu. A., Asadchikov, V. E., Roshchin, B. S., Volkov, Yu. O., Khomich, D. A., Nesterenko, A. M., and Tikhonov, A. M. (2019) Langmuir 35, 12326-12338

Электрофизиологические исследования влияния фотоконтролируемых производных азобензола и стильбена на клетки неонатальных кардиомиоцитов крыс

Фролова Ш.Р.^{1,2}, Коваленко С.Г.^{1,2}, Агладзе К.И.^{1,2*}

¹Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского;

²Московский физико-технический институт;
agladze@yahoo.com

Известно, что азоТАБ (азобензол триметиламмоний бромид) и с-ТАБ (стильбен триметиламмоний бромид)[1], производные азобензола и стильбена, соответственно, способны фотоконтролируемо изменять возбудимость культуры клеток неонатальных кардиомиоцитов. Энергетически устойчивая транс-форма азоТАБа и с-ТАБа способна подавлять спонтанную активность и скорость распространения волн возбуждения. Восстановления возбудимости культуры кардиомиоцитов можно добиться отмытием данных веществ. Изомеризация транс-азоТАБа в цис-азоТАБ, получаемая в результате облучения мягким ультрафиолетом ($\lambda \sim 365$ нм), возбудимость культуры кардиомиоцитов восстанавливается. В то время как цис-форма сТАБа, получаемая в тех же условиях, закрепляет блокаду возбудимости культуры клеток. Было проведено исследование влияния транс- и цис-форм азоТАБа и сТАБа на потенциалзависимые ионные каналы, участвующие в формировании потенциала действия. Целью работы было понять: является ли изменение проводимости кардиомиоцитов под действием фотоконтролируемых веществ (азоТАБа и с-ТАБа) опосредованным через модуляцию потенциалзависимых ионных каналов, отвечающих за формирование потенциала действия. Действие транс- и цис-форм азоТАБа и с-ТАБа на потенциалзависимые быстрый натриевый (INav), кальциевый L-типа (ICav) и калиевые (IKv) токи исследовались на изолированных неонатальных кардиомиоцитах с помощью метода пэч-кламп в конфигурации whole-cell. В результате выяснили, что действительно под действием вышеуказанных веществ быстрый натриевый и кальциевый ток L-типа подавляется, а вот медленные калиевые токи, наоборот, увеличиваются. Причем полное подавление в случае азоТАБа происходит при концентрации 100 μ M [2], а в случае с-ТАБа при меньшей концентрации - 60 μ M. По данным исследования токсичности азоТАБа и с-ТАБа на кардиомиоциты в нашей лаборатории было выявлено, что токсичность на клетки с-ТАБа меньше азоТАБа, и у с-ТАБа она начинается при концентрации больше 100 μ M. Результаты подтверждают наше предположение о том, что подавление возбудимости культуры клеток кардиомиоцитов происходит в результате подавления потенциалзависимых натриевого и кальциевого токов, которые отвечают за формирование потенциала действия в кардиомиоцитах. Так как процесс этот обратимый, а в случае с-ТАБа еще и варьированный в зависимости от того, какой эффект мы хотим закрепить (отмыть и восстановить возбудимость культуры клеток кардиомиоцитов или облучить мягким ультрафиолетом и закрепить блок проводимости в кардиомиоцитах), то эти вещества представляют интерес, например, для абляции.

Финансирование:

Работа поддержана Государственное задание по разделу наука №55 тема «Разработка персонализированных методов клеточных технологий в кардиохирургии» Правительства Московской области и

при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание) №075-03-2023-106

1) Patent: MIPT, RU Pat., RU 2515502 C1, 2012

2) Sheyda R. Frolova, Olga Gaiko, Valeriya A. Tsvelaya, Oleg Y. Pimenov, Konstantin I. Agladze Photocontrol of Voltage-gated ion channel activity by azobenzene trimethylammonium bromide in neonatal rat cardiomyocytes // PLoS ONE 2016 V. 3

Механизмы трансформации энергии. Биоэнергетика.

Молекулярные моторы

Вариабельность Н⁺/О стехиометрии комплексов электрон-транспортной цепи при различных функциональных состояниях митохондрий. Методы исследования, модифицирующие агенты и возможное физиологическое значение

Самарцев В.Н.¹, Семенова А.А.¹, Белослудцев К.Н.^{1,2}, Дубинин М.В.^{1*}

¹Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия;

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

Dubin1989@gmail.com

В митохондриях транспорт электронов комплексами электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) сопряжен с переносом Н⁺ из матрикса в межмембранное пространство. Это приводит к запасанию энергии в виде выраженной в вольтах протон-движущей силы (Δp). Энергия Δp расходуется на синтез и транспорт АТР и частично рассеивается вследствие пассивной утечки протонов [1]. В отсутствии синтеза АТР (в состоянии 4) пассивная утечка протонов рассматривается как один из механизмов потребления кислорода митохондриями. Это, так называемое, свободное дыхание (окисление) имеет важное физиологическое значение [1]. Для характеристики генерации Δp комплексами ЭТЦ митохондрий применяются стехиометрический коэффициент Н⁺/О (Н⁺/2e⁻) [1, 2]. Методы определения коэффициента Н⁺/О (Н⁺/2e⁻) для комплексов ЭТЦ изолированных митохондрий основаны на регистрации количества перенесенных через мембрану протонов в обмен на проникающий катион (К⁺ в присутствии валиномицина) [2]. Такой энергозависимый транспорт К⁺ делает невозможным непосредственное определение значений коэффициента Н⁺/О (Н⁺/2e⁻) при окислительном фосфорилировании и свободном дыхании. Теоретически обосновано, что значения коэффициента Н⁺/2e⁻ при окислительном фосфорилировании составляют 4, 2, 4 для комплексов I, III и IV соответственно [1]. В отличие от этого, как предполагалось нами ранее [3], при свободном дыхании митохондрий значения коэффициента Н⁺/О составляют 4, 4 и 2 для комплексов I, III и IV соответственно.

Для определения значений коэффициента Н⁺/О (Н⁺/2e⁻) комплексов III и IV при свободном дыхании митохондрий предлагается новый метод, основанный на избирательном отключении одного из них. Так при окислении митохондриями сукцината избирательное отключение комплекса III приведет к снижению коэффициента Н⁺/О (Н⁺/2e⁻) до значения характерного для комплекса IV. В настоящей работе в качестве агентов, осуществляющих такое отключение, применены N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин (ТМФД), способный шунтировать комплекс III ЭТЦ [4], и α,ω -гексадекандикарбоновая кислота (ГДК), переключающая этот комплекс на холостой режим работы [5].

Опыты проводили на митохондриях, выделенных из печени белых крыс общепринятым методом дифференциального центрифугирования. Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом. Протонофорную активность исследуемых соединений определяли путем индукции набухания дезэнергизованных митохондрий в изотоническом растворе ацетата калия в присутствии валиномицина.

Установлено, что ТМФД и ГДК стимулируют дыхание митохондрий: а) не оказывают существенного влияния на эффективность окислительного синтеза АТР, б) не усиливают пассивную утечку протонов и в) не влияют на трансформацию энергии комплексом IV (цитохром с оксидазой). Следовательно, при окислении сукцината митохондриями печени в условиях свободного дыхания ТМФД и ГДК избирательно отключают комплекс III ЭТЦ от трансформации энергии. Скорость пассивной утечки протонов в состоянии 4 может быть определена как произведение скорости дыхания и коэффициента Н⁺/О [6]. Нами теоретически обосновано, что при этих условиях коэффициент Н⁺/О может быть определен из отношения скоростей дыхания в отсутствии и присутствии ТМФД и ГДК. Основываясь на этой модели, рассмотрено изменение коэффициента Н⁺/О в зависимости от стимуляции ТМФД и ГДК дыхания митохондрий в состоянии 4. Установлено, что при окислении сукцината митохондриями в процессе стимуляции свободного дыхания ТМФД и ГДК коэффициент Н⁺/О уменьшается и достигает минимального значения – 2. Аналогичного значения коэффициент Н⁺/О достигает при максимальной стимуляции ТМФД в присутствии ГДК и ГДК в присутствии ТМФД. Следовательно, действие ТМФД и ГДК при достижении их максимальных эффектов неаддитивное. Вполне вероятно, что при совместном действии ТМФД и ГДК до максимального уровня происходит полное отключение комплекса III от генерации Δp . При этих условиях в генерации Δp будет принимать участие только комплекс IV, и, характеризующий работу этого комплекса, коэффициент Н⁺/О равен 2.

Таким образом, в митохондриях печени при свободном дыхании, в отличие от окислительного синтеза АТР, значения коэффициента Н⁺/О составляют 4 и 2 для комплексов III и IV соответственно. Известно, что в

процессе синтеза и транспорта АТФ перемещение протонов из межмембранного пространства в матрикс сопряжено с совершением работы [1]. В отличие от этого свободное дыхание митохондрий осуществляется путем простой диффузии протонов через внутреннюю мембрану без совершения работы. Очевидно, что скорость такой диффузии зависит от общего количества протонов освобождаемых комплексами ЭТЦ в межмембранное пространство. Индукция свободного дыхания в митохондриях печени путем отключения комплекса III ЭТЦ от трансформации энергии рассматривается как один из «путей спасения» гепатоцитов при различных патологических состояниях сопровождающихся нарушениями метаболизма углеводов и липидов и усилением окислительного стресса.

1. V. P. Skulachev, A. V. Bogachev, F. O. Kasparinsky, Principles of Bioenergetics. (Springer-Verlag, Berlin. 2013).

2. S. Papa, F. Guerrieri, M. Lorusso, et al., Biochem. J. 192, 203 (1980).

3. V. N. Samartsev, A. A. Semenova, M. V. Dubinin, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 606, 163 (2022).

4. L. F. Chien, and M. D. Brand, Biochem. J. 320, 837 (1996).

5. A. A. Semenova, V. N. Samartsev, M. V. Dubinin, Biochimie. 181, 215 (2021).

6. R. K. Porter, and M. D. Brand, Nature. 362, 628 (1993).

Взаимодействие протонофорных разобщителей с митохондриальными ферментами

Котова Е.А.¹, Хайлова Л.С.¹, Краснов В.С.¹, Кирсанов Р.С.¹, Фирсов А.М.¹, Коршунова Г.А.¹,
Антоненко Ю.Н.^{1*}

¹Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова ;

antonen@belozersky.msu.ru

Разобщители нарушают запасание энергии в энергопреобразующих мембранах клеток, а именно: внутренней мембране митохондрий, тилакоидных мембранах хлоропластов высших растений и плазматической мембране бактерий, в виде трансмембранной разности электрохимических потенциалов протонов, называемой протон-движущей силой. Разобщители привлекли к себе внимание как возможные средства против ожирения еще до открытия основного механизма их действия, а именно: их протонофорной активности, т.е. способности осуществлять циклический перенос протонов через бислойную липидную мембрану, приводящий к диссипации протон-движущей силы. В последние 10-15 лет наблюдается всплеск интереса к разобщителям как перспективным соединениям для создания лекарств от многих болезней, в том числе противораковых, противовирусных, нейро-, нефро- и кардиопротекторных препаратов. В настоящее время поиск и изучение механизма действия новых разобщителей остается по-прежнему актуальной и интересной задачей. Данная работа о производных 7-гидроксикумарина сложилась на основе нашей предыдущей успешной серии работ по созданию флуоресцирующих разобщителей на основе известного синтетического красителя флуоресцеина. У этого соединения имеется способная к депротонированию при физиологических pH гидроксильная группа и карбоксильная группа, к которой можно присоединять алкильные заместители для повышения липофильности, а, как известно, чтобы быть эффективным протонофорным разобщителем, соединение должно иметь депротонируемую группу с подходящим pK и обладать достаточной для взаимодействия с мембраной липофильностью. Липофильные производные флуоресцеина, а именно, его октиловый и додециловый эфиры, оказались вполне эффективными разобщителями с умеренной токсичностью [1].

По той же схеме были синтезированы разобщители на основе 7-гидроксикумарина. В отличие от флуоресцеина, это природный pH-зависимый флуорофор, который содержится в лекарственных растениях семейства зонтичных (отсюда его второе название – умбеллиферон) и ряда других семейств. Его гидроксильная группа имеет pK 7,5. Проблема присоединения липофильных заместителей была решена путем поиска производных этого соединения с карбоксильной группой. В результате были синтезированы две серии сложных эфиров: умбеллиферон-3-карбоновой и умбеллиферон-4-уксусной кислот. Соединения обеих серий обладали выраженной разобщающей активностью, но эта активность удивительным образом исчезала в минутной шкале, в отличие от классических разобщителей DNP и CCCP, а также упомянутого октилового эфира флуоресцеина. Поскольку на модельных мембранах ничего подобного не происходило, логично было предположить, что активность производных умбеллиферона в митохондриях исчезает вследствие ферментативного гидролиза сложноэфирной связи. И действительно, проведенный с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) анализ показал, что за 10 минут инкубации в присутствии выделенных митохондрий печени крысы эфиры обеих серий практически полностью превращались в исходные кислоты, тогда как с октиловым эфиром флуоресцеина при этом ничего подобного не происходило. Мы предположили, что ферментом, катализирующим гидролиз сложноэфирных производных умбеллиферона, является альдегиддегидрогеназа митохондрий ALDH2, эстеразная активность которой хорошо известна. Причем эта активность чувствительна к тем же ингибиторам, что и

основная активность фермента – окисление ацетальдегида. Известный ингибитор альдегиддегидрогеназы, дисульфирам, вызвал подавление спада разобщающей активности эфиров умбеллиферон-содержащих кислот. Параллельно по данным ТСХ было видно подавление гидролиза этих эфиров. Мы проверили действие еще одного ингибитора митохондриальной альдегиддегидрогеназы дайджина и пришли к заключению, что исчезновение разобщающей активности эфиров умбеллиферон-содержащих кислот связано с эстеразной активностью ALDH2. В пользу этого заключения говорят и данные статьи [2] о взаимодействии разнообразных производных кумарина с альдегиддегидрогеназой.

Известно, что в печени ALDH2 содержится в избытке по сравнению с другими органами. Поэтому можно было ожидать, что в митохондриях, выделенных из других органов, разобщающая активность эфиров умбеллиферон-содержащих кислот не будет быстро исчезать. Эксперименты на митохондриях сердца и почек подтвердили это предположение. Следовательно, сложные эфиры умбеллиферон-содержащих кислот оказались тканеспецифичными разобщителями. Стабильность разобщающей активности этих эфиров в митохондриях сердца позволила нам сравнить их действие на скорость дыхания. Оказалось, что сложные эфиры 3-карбоновой кислоты проявляют на порядок более высокую разобщающую активность, чем эфиры 4-уксусной кислоты.

Была также исследована зависимость разобщающей активности производных 7-гидроксикумарина от активности переносчика адениновых нуклеотидов ANT1. Оказалось, что снижение мембранного потенциала митохондрий сердца крысы под действием эфиров 3-карбоновой и 4-уксусной кислот частично обращается при добавлении специфического ингибитора ANT1 карбоксиатрактилозида [3,4]. Был сделан вывод о том, что подобно жирным кислотам, производные 7-гидроксикумарина осуществляют разобщающее действие в митохондриях с участием ANT1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ 21-14-00062).

1. M.M. Shchepinova et al., Biochim. Biophys. Acta 1837 (2014) 149-158.
2. C.D. Buchman, T.D. Hurley, J. Med. Chem. 60 (2017) 2439-2455.
3. V.S. Krasnov et al., Bioelectrochemistry 145 (2022) 108081.
4. V.S. Krasnov et al., Arch. Biochem. Biophys. 728 (2022) 109366.

Влияние комплекса мутаций митохондриальной ДНК на содержание и продукцию АТФ в клетках

Казаков М.С.^{1*}, Шитикова Е.Ю.¹, Винокуров А.Ю.¹
¹Орловский государственный университет им. И.С.Тургенева ;
kms898@mail.ru

Казаков М.С.(1), Шитикова Е.Ю.(1), Винокуров А.Ю.(1)

(1) Лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники ОГУ имени И.С. Тургенева

Число заболеваний, связанных с мутациями митохондриальной ДНК (мтДНК) сегодня близится к 400 [1]. Возможность проявления патологии зависит от локализации, уровня гетероплазмии и сочетания мутаций. Мутации в мтДНК могут негативно сказаться на синтезе АТФ из-за нарушений в работе электронтранспортной цепи (ЭТЦ), инициируя появление и развитие ряда заболеваний [2]. В связи с этим целью данной работы является исследование влияния сочетаний мутаций мтДНК на содержание и синтез АТФ.

Материалы и методы

Объектами изучения выступали линии цитоплазматических гибридов (цибридов) (TCP, TCN, TCI, HSM1, HSM2, LSM1, LSM2, MAM1, MAM2, MAM3, 520, 521, 522) на основе клеток ТНР, каждая из которых имеет от 5 до 10 мутаций мтДНК с разным уровнем гетероплазмии, затрагивающих гены первой (m.3336T>C) (в зависимости от линии уровень гетероплазмии меняется от 0% до 37%), второй (m.5178C>A) (от 0% до 22%), пятой (m.13513G>A) (от 10% до 68%), шестой (m.14459G>A) (от 0% до 61%) субъединиц I комплекса, цитохрома b (m.15059G>A) (от 0% до 38%), (m.14846G>A) (от 0% до 55%), 12S рРНК (del652G) (от 0% до 44%), (m.1555A>G) (от 0% до 28%) и тРНКЛей (m.c3256C>T) (от 0% до 50%), (m.12315G>A) (от 0% до 44%). Для анализа физиологического уровня АТФ применяли люциферазный метод с применением набора определения АТФ (Life Technologies, США). Контроль уровня люминесценции вели на планшетном флуориметре FLUOstar Omega. Измерение времени истощения запасов клеточного АТФ проводили методом флуоресцентной микроскопии при помощи зонда magFura-2 на длинах волн возбуждения 340 нм (Mg-связанная форма) и 380 нм (свободная форма). Перед исследованием клетки инкубировали в 3 мкМ растворе зонда. Синтез АТФ блокировали добавлением олигомицина А (2 мкг/мл) и йодуксусной кислоты (100 мкМ). Момент резкого увеличения отношения флуоресценции 340 нм/ 380 нм являлся сигналом истощения запаса АТФ. Для оценки сопряженности окислительного фосфорилирования провели исследование дыхания полярографическим методом

с помощью респирометра Oxytherm+R. В качестве среды измерения использовали HBSS с содержанием глюкозы 10 мМ. В ходе изучения выполняли анализ базовой скорости потребления кислорода и после внесения ингибитора АТФ-синтазы олигомицина А (2 мкг/мл).

Результаты и их обсуждение.

Почти во всех линиях цибридов отмечено статистически достоверное снижение содержания АТФ относительно линии ТНР (от 1,9-кратного для ТСН до 19-кратного для LSM1). Такое изменение может быть следствием как нарушений синтеза АТФ, так и повышенного потребления макроэрга.

Для подтверждения теории о повышенном потреблении АТФ были проведены исследования с использованием ратиометрического флуоресцентного зонда magFura-2. Результаты измерений показали, что большая часть исследуемых линий имеет не меньшее время истощения запасов АТФ, чем ТНР (от 3,8 ч. у LSM2 до 7,3 ч. у LSM1 и 4,9 ч. у ТНР). Данный параметр не коррелирует с данными по содержанию АТФ. Одной из причин может быть высокий уровень разобщения в клетках, для оценки которого было проведено исследование скорости дыхания клеток. Все линии цибридов имеют сниженную скорость дыхания в сравнении с ТНР (от 33 нг(O₂)/(мин*10⁶ клеток) у LSM1 до 54 нг(O₂)/(мин*10⁶ клеток) у MAM2 и 64 нг(O₂)/(мин*10⁶ клеток) у ТНР). Статистически значимый ответ на олигомицин А наблюдался для линий ТНР, MAM1 и MAM2 (23%, 15% и 18% соответственно). Таким образом, скорость потребления кислорода, сопряженного с синтезом АТФ, в случае всех клеточных линий относительно невелика (среднее изменение около 14%) из-за возможного разобщения, которое может быть инструментом снижения негативных последствий митохондриальной дисфункции, связанных с мутациями генов рРНК (del652G), тРНК (m.3256C>T, m.12315G>A) и комплексов ЭТЦ (m.15059G>A, m.14846G>A, m.5178C>A) в мтДНК [3]. В тоже время данные линий MAM1 и MAM2 показывают более высокий уровень митохондриальной функции, несмотря на значительную мутационную нагрузку. По нашему мнению, это может быть связано с высоким уровнем гетероплазмы мутаций 5 субъединицы I комплекса (m.13513G>A) и 12S рРНК (m.1555A>G), для которых в ряде работ показана отрицательная корреляция с развитием атеросклероза [4, 5]. Вероятно, это связано с тем, что мутация m.1555A>G препятствует синтезу дефектных белков ЭТЦ из-за нарушения работы рибосом, а мутация m.13513G>A приводит к увеличению функциональности комплекса I.

Таким образом, нарушение метаболизма АТФ, и дальнейшее развитие патологии является результатом не только уровня гетероплазмы отдельных мутаций, но также их взаимным влиянием, которое может иметь как негативный, так и компенсационный характер.

Литература

1. Naviaux R.K. Developing a systematic approach to the diagnosis and classification of mitochondrial disease // Mitochondrion. - 2004. - V. 4. - P. 351-61.
2. McInnes J. Mitochondrial-associated metabolic disorders: foundations, pathologies and recent progress // Nutr Metab (Lond). - 2013. - V. 10(1). - 63.
3. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Khasanova Z.B., Postnov A.Y., Yarygina E.I., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Role of Mitochondrial Genome Mutations in Pathogenesis of Carotid Atherosclerosis // Oxid Med Cell Longev. - 2017. - 6934394.
4. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Barinova V.A., Ryzhkova A.I., Zhelankin A.V., Postnov A.Y., Sobenin I.A., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Mosaicism of mitochondrial genetic variation in atherosclerotic lesions of the human aorta // Biomed Res Int. - 2015. - 825468.
5. Sazonova M.A., Chicheva M.M., Zhelankin A.V., Sobenin I.A., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Association of mutations in the mitochondrial genome with the subclinical carotid atherosclerosis in women // Experimental and Molecular Pathology. - 2015. - V. 99. - P. 25-32.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00317.

Влияние кратковременного белково-углеводного дефицита в питании на показатели памяти

Бахшалиева А.Я.^{1*}

¹*Институт физиологии имени академика Абдуллы Караева Министерства науки и образования
Азербайджанской Республики, г.Баку. ;
afetfarm@mail.ru*

Известно, что энергия, необходимая для жизнедеятельности организма, является субстратом процессов распада метаболитов, поступающих в кровь в процессе пищеварения, которое обеспечивает обмен веществ, структурную и функциональную активность клетки. Метаболиты, поступающие в кровь в процессе

пищеварения, выступая в роли стимулов, ускоряют выработку энергии за счет интенсификации функций внутриклеточного обмена, что в свою очередь, активизирует генетический аппарат и обеспечивает его функциональную активность. Наряду с белками как важнейшими факторами генетической экспрессии имеют значение и углеводы, которые в качестве сигнальной молекулы регулируют набор генов и стимулируют реализацию различных физиологических процессов.

Учитывая, что клеточная пластичность зависит от взаимодействия белков и углеводов, представляется целесообразным изучение изменения адаптационных свойств организма, рефлекторной деятельности и функций памяти на фоне дефицита как белков, так и углеводов в питании. Целью нашей исследовательской работы было наблюдение за изменениями процессов обучения и памяти, а также общего поведения экспериментальных животных на фоне 60% белковой и 40% углеводной недостаточности в корме в течение 20 дней.

Исследования проводились на 15 белых крысах-самцах 3-месячного возраста. Подопытные животные по 5 крыс были разделены на 3 группы: I – интактная группа, получавшая питание в условиях вивария; II – группа откорма с 60% дефицитом белка (Б/Д) по рецепту Никонорова (Никоноров М. и др., 1973); III – группа откорма с дефицитом белка 60% и дефицитом углеводов 40% по рецепту Никонорова (Б/Д+У/Д). На 20-й день кормления все три группы животных обучали и тестировали условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) (Jarvik M.E., Коор А. 1967). В ходе исследований регистрировались следующие поведенческие показатели: время обучения, латентный период, груминг, вертикальная двигательная активность, горизонтальная двигательная активность и количество актов дефекации.

Поведенческие результаты показали, что время обучения крыс, которых кормили с дефицитом белка (Б/Д), сократилось на 20,2% ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой. Но в группе, получавшей питание с дефицитом белков и углеводов (Б/Д+У/Д), этот показатель увеличился на 11,7% ($P < 0,01$).

После выработки условного рефлекса у крыс обеих групп наблюдалось уменьшение латентного периода по сравнению с интактной группой, причем у крыс Б/Д уменьшение составило 20,8% ($p < 0,01$), а у крыс Б/Д+У/Д 41,5% ($p < 0,001$). По сравнению с интактной группой (100%) у Б/Д группы вертикальная двигательная активность на 16,7% ($p < 0,05$) и груминг — на 22,9 % ($p < 0,01$) выше, что свидетельствует об активном состоянии и сохранении рефлекса. При этом, снижение горизонтальной двигательной активности на 19,5% ($p < 0,01$) и увеличение дефекации на 28,1% ($p < 0,01$) указывают на эмоциональное напряжение у крыс.

При белково-углевододефицитном питании отмечается снижение активности вертикальных движений крыс на 22,9% ($p < 0,01$) и груминга на 25% ($p < 0,01$) по сравнению с интактной группой. На фоне этих показателей снижение горизонтальной двигательной активности на 63% ($p < 0,001$) считается показателем эмоционального напряжения и малоподвижности крыс. Кроме того, снижение количества дефекаций у крыс на 12,5% ($p < 0,05$) может указывать на относительное снижение общего метаболизма.

Из сравнительного анализа результатов поведения можно сделать вывод, что показатели крыс, которых кормили 60% дефицитом белка в течение 20 суток, незаметно отличаются от показателей интактной группы. Однако у крыс, получавших 60% дефицит белка и 40% дефицит углеводов, наблюдались слабо выраженные задержки функций памяти, а в общем поведении животных проявлялась малоподвижность из-за слабого эмоционального стресса.

Известно, что в реализации основных механизмов сложных нейрогуморальных функций, рефлекторной деятельности, процессов обучения и памяти участвуют нейромедиаторы, ферменты, гормоны белковой и пептидной природы. С другой стороны, метаболический гомеостаз всегда находится под контролем транскрипции, и на регуляцию транскрипции могут влиять метаболиты промежуточного обмена (глюкоза, аминокислоты, липиды, холестерин). В условиях длительного белкового голодания во всех окислительных процессах ЦНС происходят обратимые и необратимые изменения, которые иногда приводят к разрушению нейронов. В этом случае сигналы транскрипционных факторов интегрируются и используют альтернативные регуляторные. Однако при недостаточном обеспечении организма полисахаридами гипогликемия оказывает негативное влияние на нервную ткань, вызывая деструктивные изменения в нейронах и связанные с этим нарушение функций нервов и возникновение гликемической энцефалопатии.

Если учесть, что глюкоза является пластическим и энергетическим субстратом нервных клеток, то на фоне белкового дефицита неизбежно негативное влияние углевододефицитного питания и связанного с ним возникновения гипогликемии на нарушение метаболического гомеостаза, общих обменных процессов и энергообеспечения нейронов в нервной ткани. Резкое снижение энергообеспечения нервной клетки может со временем привести к дисфункции нейронов и связанному с этим нарушению условно-рефлекторной деятельности.

Изменение уровня митохондриального мембранного потенциала при дисфункции дыхательной цепи, вызванной мутациями мтДНК

Попов Д.Ю.^{1*}, Погонялова М.Ю.¹, Винокуров А.Ю.¹
¹ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»;
rennda@yandex.ru

Введение. Мутации митохондриальной ДНК могут оказывать различное воздействие на биоэнергетику клеток, в частности на величину митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), снижение или увеличение которого негативно сказывается на клеточной жизнеспособности и может быть причиной развития патологий [1]. Снижение $\Delta\Psi_m$ приводит к конденсации матрикса и попаданию цитохрома c в межмембранное пространство, запуску апоптоза [2]. Увеличение $\Delta\Psi_m$ приводит к гиперпродукции активных форм кислорода, которые вызывают повреждения не только в митохондриях, но и во всей клетке в целом [3].

Целью настоящего исследования являлось определение влияния мутаций митохондриальной ДНК на изменение и механизм поддержания $\Delta\Psi_m$.

Материалы и методы. Объектами исследования выступали линии цитоплазматических гибридов на основе клеток ТНР-1, каждая из которых имеет от 5 до 10 мутаций мтДНК.

Изучение величины $\Delta\Psi_m$, а также состояние митохондриального ФАД проводили на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 900. Для оценки уровня $\Delta\Psi_m$ клетки инкубировали в 25 нМ растворе TMRM в среде Хенкса в течение 45 мин при 37 °С без отмывки. Регистрацию интенсивности флуоресценции TMRM во времени проводили с записью базового сигнала с последующим добавлением СССР (2 мкМ). Величину $\Delta\Psi_m$ оценивали по изменению интенсивности флуоресценции. Общее митохондриальное содержание, скорость восстановления ФАД, а также отношение ФАДН₂/ФАД оценивали на основании автофлуоресценции при использовании длины волны возбуждения 488 нм. Для перевода кофермента в полностью окисленную или восстановленную форму использовали СССР (2 мкМ) и азид натрия (10 мМ) соответственно.

Исследование состояния НАДН проводили на широкопольном флуоресцентном микроскопе с флюоритовым иммерсионным объективом x20 с использованием возбуждающего излучения ксеноновой дуговой лампы. Регистрацию автофлуоресценции осуществляли в интервале длин волн 430-480 нм при использовании возбуждающего излучения с длиной волны 340 нм. Для оценки митохондриального содержания, скорости восстановления НАД, а также соотношения НАДН/НАД были использованы СССР (10 мкМ) для максимального увеличения дыхания и раствор ротенона (10 мМ), блокирующего комплекс I дыхательной цепи. Числовые данные представлены в виде (медиана [Q1;Q3], число проанализированных клеток). Приведенные в % значения нормированы на медиану ТНР-1.

Результаты. Снижение $\Delta\Psi_m$ относительно ТНР-1 (100% [86%; 119%], N=45) в мутантных клетках линий HSM1 (76% [55%; 108%], N=48) и MAM3 (72% [56%; 91%], N=60) может быть результатом увеличенного уровня гетероплазмии мутации в гене тРНК_{Лей} (44 и 32% соответственно). Снижение $\Delta\Psi_m$ объясняется тем, что мутации в гене тРНК_{Лей} нарушают конформацию и стабильность тРНК, эффективность реакции аминокислирования. Мутации тРНК могут приводить к нарушениям механизма трансляции и, соответственно, к изменению синтеза митохондриального белка, что ведет к снижению активности комплексов I и V дыхательной цепи [4-6]. Однако в линиях MAM1 (120% [95%; 156%], N=44) и MAM2 (117% [76%; 257%], N=54) наблюдается повышение уровня $\Delta\Psi_m$ при степени гетероплазмии мутации гена тРНК_{Лей} 23 и 25% соответственно. Это может объясняться включением компенсаторных механизмов поддержания $\Delta\Psi_m$, которые в зависимости от набора мутаций и уровня гетероплазмии могут отличаться. В случае линии MAM2 таким механизмом поддержания $\Delta\Psi_m$ выступает более активная работа комплекса II ЭТЦ, что подтверждается сниженным соотношением FADH₂/FAD (0,66 [0,44; 1,99], N=48) соотношением и высокой скоростью образования FADH₂ (253% [121%; 372%], N=99). В гибридной линии MAM1 обнаружено высокое соотношение FADH₂/FAD (2,65 [1,28; 3,91], N=36), сниженное содержание митохондриального FAD (70% [58%; 91%], N=59), а также низкая скорость образования FADH₂ (110% [56%; 156%], N=49), что свидетельствует о сниженной работе комплекса II ЭТЦ. В этой линии механизм поддержания $\Delta\Psi_m$ может быть связан с большим вкладом комплекса I ЭТЦ (NADH/NAD (0,28 [0,18; 0,38], N=102)), что может объясняться высоким уровнем гетероплазмии (68%) мутации в 5 субъединице комплекса I, которая, по литературным данным, отрицательно коррелирует с развитием атеросклероза [7, 8].

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда фундаментальных исследований № 22-15-00317.

1. Zorova L. D. et al. Mitochondrial membrane potential //Analytical biochemistry. – 2018. – Т. 552. – С. 50-59.
2. Gottlieb E. et al. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis //Cell Death & Differentiation. – 2003. – Т. 10. – №. 6. – С. 709-717.

3. Zorova L. D. et al. Functional significance of the mitochondrial membrane potential //Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2018. – Т. 12. – С. 20-26.
4. Lin Y. et al. A mitochondrial myopathy-associated tRNA^{Ser} (UCN) 7453G> A mutation alters tRNA metabolism and mitochondrial function //Mitochondrion. – 2021. – Т. 57. – С. 1-8.
5. Martín-Jiménez R. et al. Clinical and cellular consequences of the mutation m. 12300G> A in the mitochondrial tRNA^{Leu} (CUN) gene //Mitochondrion. – 2012. – Т. 12. – №. 2. – С. 288-293.
6. Zhou M. et al. A hypertension-associated mitochondrial DNA mutation alters the tertiary interaction and function of tRNA^{Leu} (UUR) //Journal of Biological Chemistry. – 2017. – Т. 292. – №. 34. – С. 13934-13946.
7. Sazonova M. A. et al. Association of mutations in the mitochondrial genome with the subclinical carotid atherosclerosis in women //Experimental and Molecular Pathology. – 2015. – Т. 99. – №. 1. – С. 25-32.
8. Sazonova M. A. et al. Mosaicism of mitochondrial genetic variation in atherosclerotic lesions of the human aorta //BioMed research international. – 2015. – Т. 2015.

Изучение механизмов митохондриального разобщения аналогами бутил(трифенил)фосфония с заместителями в фенильных кольцах

Рокицкая Т.И.^{1*}, Хайлова Л.С.¹, Коршунова Г.А.¹, Антоненко Ю.Н.¹

¹*НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Московский государственный университет
им. М.В.Ломоносова;
rokitskaya@genebee.msu.ru*

В последние годы активно синтезируются и изучаются конъюгаты биологически важных молекул с липофильными катионами для увеличения электрофоретического накопления таких соединений в митохондриях клеток. Одними из наиболее известных митохондриально-направленных соединений являются конъюгаты трифенилфосфония с антиоксидантами убихиноном или пластохиноном ковалентно сшитые с помощью углеводородного децильного линкера, MitoQ и SkQ1, соответственно. Было обнаружено, что кроме антиоксидантного действия MitoQ, SkQ1 и не содержащие хинон алкил(трифенил)фосфониевые катионы вызывают разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования на митохондриях, благодаря протонофорному действию ионной пары: липофильный катион – анион жирной кислоты [1] или индукции неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий [2].

Ранее мы показали, что константа скорости флип-флопа аналогов додецил(трифенил)фосфония [3] и проницаемость аналогов бутил(трифенил)фосфония (C4TPP-X) значительно зависят от заместителей в фенильных кольцах [4]. Поэтому можно ожидать значительных различий в протонофорной активности ионной пары - аналога бутил(трифенил)фосфония и жирной кислоты в модельных и биологических липидных системах.

На выделенных митохондриях печени крысы C4TPP-X катионы приводили к увеличению скорости дыхания и уменьшению потенциала внутренней мембраны. Эффективность этих процессов значительно увеличивалась в присутствии пальмитата и коррелировала с коэффициентом распределения в системе октанол – вода для липофильных катионов. Способность C4TPP-X катионов индуцировать протонный транспорт через липидную мембрану липосом, нагруженных рН-чувствительным флуоресцентным красителем пиранином, также возрастала с увеличением их липофильности и зависела от присутствия пальмитиновой кислоты в мембраноформирующем составе. Из всех изученных катионов только бутил [три(3,5-диметилфенил)]фосфоний (C4TPP-diMe) оказался способным индуцировать транспорт протонов через плоские бислоиные липидные мембраны и липосомы по механизму образования ионной пары (катион – жирная кислота). Скорость потребления кислорода митохондриями при добавлении C4TPP-diMe увеличивалась до максимальных значений, характерных для обычных разобщителей. В присутствии остальных катионов скорость дыхания митохондрий была существенно меньше. Наиболее липофильные катионы ряда C4TPP-X в высоких концентрациях приводили к набуханию выделенных митохондрий печени крысы в средах, содержащих хлорид калия или сахарозу. Мы предполагаем, что изученные C4TPP-X катионы, за исключением C4TPP-diMe в низких концентрациях, вызывают неспецифическую утечку неорганических ионов через модельные липидные и биологические мембраны, которая увеличивается в присутствии жирных кислот. Таким образом, разобщение дыхания и фосфорилирования митохондрий происходит в основном по механизму, подобному детергентному.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ №23-24-00038.

[1] Severin, F.F. et al. Penetrating Cation/Fatty Acid Anion Pair As a Mitochondria-Targeted Protonophore. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2010, 107, 663-668.

[2] Trendeleva, T. A. et al. Interaction of Tetraphenylphosphonium and Dodecyltriphenylphosphonium With Lipid Membranes and Mitochondria. Biochemistry (Moscow). 2012, 77, 1021-8.

[3] Rokitskaya, T.I. et al. Effect of Methyl and Halogen Substituents on the Transmembrane Movement of Lipophilic Ions. Phys. Chem. Chem. Phys. 2019, 21, 23355-23363.

[4] Rokitskaya, T.I. et al. Membrane Permeability of Modified Butyltriphenylphosphonium Cations. J. Phys. Chem. B. 2022, 126, 412-422.

Изучение молекулярного механизма перекачивания протонов в гем-медных дыхательных оксидазах в режиме реального времени

Силецкий С.А.^{1*}

¹*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова;
siletsky@genebee.msu.ru*

Для выяснения организации и механизма сопряженного переноса протонов в гем-медных терминальных оксидазах проведено предстационарное исследование с адекватным временным разрешением цитохромоксидазы aa3 типа из *R.sphaeroides* с мутацией по ключевому остатку в протон-проводящем D канале. Изученная мутантная оксидаза сохраняет в стационарных измерениях функциональную кислород-редуктазную активность в значительной степени. Исследование кинетики генерации мембранного потенциала встроенным в протеолипосомы мутантным ферментом свидетельствует о замедлении стадий переноса протонов, при сохранении в целом способности к перекачиванию протонов через мембрану. В кинетике генерации мембранного потенциала мутантного фермента выявлен ряд важных отличий от дикого типа, указывающих на иную артикуляцию этапов сопряженного перекачивания протонов в каталитическом цикле, несмотря на сохранение функциональной активности. Исследование позволяет сделать выводы о существенных изменениях в электрогенном механизме перекачивания протонов в мутантном ферменте, указывает на значительную устойчивость организации элементов в механизме и дает новую информацию об организации переноса протонов в D-канале в мутантной оксидазе и в диком типе.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00104.

Исследование влияния хронического введения уридина на развитие митохондриальной дисфункции в ткани миокарда мышей линии C57BL/6 при экспериментальном сахарном диабете

Белослудцева Н.В.^{1,2*}, Старинец В.С.¹, Михеева И.Б.¹, Дубинин М.В.², Миронова Г.Д.¹, Белослудцев К.Н.^{1,2}

¹*ИТЭБ РАН;*

²*ФГБУ ВО Марийский государственный университет;
nata.imagination@gmail.com*

Сахарный диабет (СД) представляет собой группу эндокринных и метаболических нарушений различной этиологии, которые связаны с недостаточной секрецией инсулина β -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы и различной степенью периферической резистентности к инсулину, приводящей к гипергликемии. Поиск новых подходов к лечению СД является одним из наиболее серьезных глобальных вызовов, стоящих перед современной наукой и системой здравоохранения во всем мире. Осложнения диабета включают повреждение многих органов-мишеней, в том числе сердца как одного из наиболее энергозатратных органов. Диабетическая кардиомиопатия сопровождается значительными нарушениями как структуры, так и функций кардиомиоцитов, что в конечном итоге может привести к развитию ишемического повреждения миокарда, сердечному приступу и смерти. Клеточные и молекулярные механизмы патогенеза диабетической кардиомиопатии включают повреждение кардиомиоцитов от конечных продуктов гликирования и гиперпродукции АФК, нарушение утилизации субстратов и энергетического метаболизма, изменение ионного гомеостаза и развитие митохондриальной дисфункции в ткани миокарда.

Уридин – это пиримидиновый нуклеозид, который играет важную роль в поддержании клеточной функции и энергетического метаболизма. Как предшественник УТФ, уридин может активировать синтез гликогена. Метаболизм уридина тесно связан с гомеостазом глюкозы, метаболизмом липидов и обменом аминокислот путем регулирования ключевых ферментов и продуктов их реакции, таких как УТФ, дигидрооротатдегидрогеназа и уридинфосфорилаза, которые затем участвуют в системном метаболизме. Уридин

и его производные широко используются для снижения цитотоксичности, подавления лекарственно-индуцированного стеатоза печени и улучшения нейрофизиологических функций. Наши более ранние исследования показали, что введение уридина предотвращает повреждение миокарда на моделях острой ишемии и ишемии/реперфузии у крыс путем восстановления активности систем антиоксидантной защиты и активации митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала. Последние данные свидетельствуют о том, что уридин может регулировать работу комплексов дыхательной цепи митохондрий. Следовательно, уровень уридина в плазме и тканях может влиять на функционирование митохондрий и системный энергетический гомеостаз. Однако эффекты уридина при сахарном диабете и инсулинорезистентных состояниях остаются малоизученными.

В настоящей работе был исследован противодиабетический потенциал уридина и его влияние на митохондриальный гомеостаз в ткани сердца на модели сахарного диабета второго типа у мышей линии C57BL/6, вызванного высокожировой диетой. Обнаружено, что хроническое введение уридина (30 мг/кг) диабетическим животным приводило к значительному снижению уровня глюкозы и триглицеридов в плазме, а также увеличению скорости утилизации глюкозы из крови в соответствии с тестом на толерантность к глюкозе. Анализ электронных микрофотографий показал, что уридин предупреждал нарушение ультраструктурной организации и снижение количества митохондрий в кардиомиоцитах при диабете. Оценка уровня экспрессии генов *Pparg1a*, *Pink1*, *Parkin*, *Drp1* и *Mfn2* в ткани миокарда с помощью метода ОТ-ПЦР показала, что введение уридина приводило к восстановлению митохондриального биогенеза и стимулированию процесса митофагии. Это может способствовать снижению количества поврежденных митохондрий и поддержанию пула функциональных митохондрий в кардиомиоцитах диабетических мышей, получавших уридин. Параллельно, уридин предотвращал вызванное диабетом окислительное повреждение митохондрий сердца и снижение параметров окислительного фосфорилирования, но не оказывал существенного влияния на способность этих органелл удерживать ионы кальция и скорость транспорта калия в митохондриях. Полученные данные позволяют нам охарактеризовать действие уридина как средства метаболической терапии, способного уменьшать системные последствия сахарного диабета и предотвращать нарушения митохондриального гомеостаза в сочетании с биоэнергетическими дефектами и окислительным стрессом в сердце мышей с экспериментальным диабетом.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-15-00120.

Магнитно-изотопные эффекты и ядерный спиновый катализ в живых клетках и биомолекулярных моторах: экспериментальные факты и перспективы

Кольтовер В.К.^{1*}

¹*Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии, РАН, Черноголовка, Московская область, Российская Федерация;*
koltover@icp.ac.ru

Некоторые химические элементы имеют два вида стабильных изотопов: магнитные и немагнитные. В физике и химии магнитно-изотопные эффекты (МИЭ) давно известны для изотопов углерода, кислорода, кремния, серы, ртути и ряда других химических элементов, включая уран [1]. Не так давно были открыты МИЭ в живой природе. В экспериментах с бактериальными клетками *E. coli*, обогащенными различными изотопами магния, активность антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы в клетках, выращенных на питательной среде, обогащенной магнитным изотопом магния, Mg-25, на 40 % ниже (в стационарной фазе роста), чем в клетках, выращенных на среде, обогащенной немагнитным изотопом магния, Mg-24.[2]. Кроме того, адаптация клеток к среде, обогащенной магнитным изотопом магния, происходит существенно быстрее по сравнению со средой, обогащенной немагнитным изотопом [3]. МИЭ были обнаружены и в экспериментах с дрожжевыми клетками *S. cerevisiae*, обогащенными различными изотопами магния. Константа скорости пост-радиационного восстановления клеток, облученных рентгеновскими лучами или коротковолновым УФ-излучением, в два раза выше в клетках, обогащенных магнитным Mg-25, по сравнению с клетками, обогащенными немагнитным Mg-24 [4]. Более того, каталитические эффекты магнитного изотопа магния были выявлены в реакции гидролиза АТФ, катализируемой миозином. Этот важнейший молекулярный мотор биоэнергетики использует Mg(II) как кофактор для гидролиза АТФ с использованием химической энергии гидролиза для выполнения механической работы. Скорость ферментативного гидролиза АТФ в среде с магнитным изотопом, Mg-25, в два раза выше, чем в средах с немагнитными изотопами, Mg-24 или Mg-26 [5-6]. Аналогичный эффект ядерного спинового катализа был обнаружен в экспериментах с цинком в качестве кофактора миозина. Скорость ферментативного гидролиза АТФ в реакционной среде с магнитным изотопом цинка, Zn-67, выше на 40-50 % по сравнению со скоростями в средах с немагнитными изотопами цинка, Zn-64 или Zn-68. Каталитические эффекты ядерного спина изотопа

Mg-25 обнаружены также в экспериментах с АТР-азой, выделенной из митохондрий дрожжей, и Mg-зависимой АТР-азой плазматической мембраны миомерия. МИЭ однозначно свидетельствует о том, что в хеомеханическом процессе, катализируемом молекулярным мотором, имеется лимитирующая стадия, которая зависит от электронного спинового состояния реагентов, и эта стадия ускоряется ядерным спином магнитного изотопа. Можно предположить, что в условиях электронно-конформационного возбуждения макромолекулы электронная плотность в активном центре фермента переносится, например, от гидроксильной группы связанной молекулы воды на ADP или Mg(II)/Zn(II) с образованием ион-радикальной пары. Затем окси-анион ADP нуклеофильно атакует неорганический фосфат с образованием АТР. Стабильное электронно-спиновое состояние АТР, как продукта этой обратной реакции, должно быть синглетным ($S = 0$). Ядерный спин Mg-25/Zn-67 посредством сверхтонкого взаимодействия с неспаренным электроном ион-радикальной пары, связанной с миомином, переводит эту пару в триплетное состояние ($S = 1$), создавая при этом спиновый запрет для нежелательной обратной реакции синтеза АТР и, соответственно, стимулируя прямую реакцию гидролиза АТР. Гипотеза о ключевой роли виртуальной ион-радикальной пары в синтезе АТР при окислительном фосфорилировании была предложена впервые в работе [7]. Возможны альтернативные объяснения ядерного спинового катализа в реакциях гидролиза АТР катализируемых молекулярными моторами [8-10]. Энергия, выделяемая при гидролизе АТР ($\sim 0,54$ эВ), недостаточна для электронно-конформационного перевода макромолекулы фермента в синглетное возбужденное состояние ($S = 0$). Этой энергии достаточно для перехода в более низкое триплетное состояние ($S = 1$), но такой переход из основного состояния ($S = 0$) запрещен законом сохранения спина. Ядерный спин изотопа магния (цинка) устраняет этот запрет, тем самым ускоряя хеомеханический цикл в ферментативной реакции. Альтернативно, ядерный спин Mg-25/Zn-67, воздействуя на ядерные спины протонов воды, способен ускорить конверсию орто-изомеров (параллельная ориентация спинов водорода) и пара-изомеров (антипараллельная ориентация спинов водорода), необходимую для реализации конформационной перестройки макромолекулы фермента, сопровождающей ферментативный гидролиз АТР. Детальные механизмы ядерного спинового катализа в биомолекулярных моторах и применение стабильных магнитных изотопов в радиационной биомедицине, магнитобиологии и других областях медицинской физики – задачи дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (тема АААА-А19-119092390041-5).

1. Зельдович А.Б., Бучаченко А.Л., Франкевич Е.Л. Успехи физ. наук, 1988, 155, 3-45.
2. Богатыренко Т.Н., Кудряшова Е.А., Туманова Л.В., Кольтовер В.К. Тез. докл. V Междунар. конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», Санкт-Петербург, 2009, с. 92.
3. Кольтовер В.К., Шевченко У.Г., Авдеева Л.В., Ройба Е.А., Бердинский В.Л., Кудряшова Е.А. Докл. АН, 2012, 442, 272-274.
4. Avdeeva L.V., Evstyukhina T.A., Koltover V.K., Korolev V.G., Kutlakhmedov Y.A. Nucl. Phys. Atom. Energy, 2019, 20 (3), 271-277.
5. Koltover V.K., Labyntseva R.D., Kosterin S.O. In: Myosin: Biosynthesis, Classes and Function (ed. D. Broadbent), Nova Science Publ., New York, 2018, p. 135-158
6. Кольтовер В.К., Лабынцева Р.Д., Карандашев В.К. Биофизика, 2020, 65, 493-503.
7. Блюменфельд Л.А., Кольтовер В.К. Мол. биол. 1972, 6, 161-166.
8. Koltover V.K. In: Horizons in World Physics, vol. 286 (ed. A. Reimer), Nova Science Publ., New York, 2015, pp. 65-78.
9. Koltover V.K. J. Mol. Liquids. 2017, 235, 44-48.
10. Кольтовер В.К. Изв. АН. Сер. хим., 2021, № 9, 1633-1639.

Митохондриальная биоэнергетика, основанная на транспорте протонов и щелочноземельных металлов

Зоров Д.Б.^{1*}

¹МГУ, НИИ ФХБ им. Белозерского;
zorov@belozersky.msu.ru

Хемиосмотическая концепция окислительного фосфорилирования в сопрягающих мембранах, включая внутреннюю мембрану митохондрий, первично базировалась на циклическом переносе протона, за что было получено две Нобелевских премии (1978 и 1997 г.г.). В соответствии с этой концепцией протонные помпы (здесь мы будем говорить лишь о митохондриальных мембранах), представляющие собой по крайней мере три суперкомплекса дыхательной цепи (комплексы I, III и IV) переносят протоны из матрикса митохондрий во внемитохондриальную среду, приводя к генерации трансмембранного потенциала ионов водорода,

представленного электрической и концентрационной компонентами. Этот потенциал является движущей силой вращения компонентов АТФ синтазы, также находящейся во внутренней мембране митохондрий (комплекс V) с последующими конформационными перестройками в этом комплексе, сопряженными с синтезом АТФ. Такой циклический транспорт протона был признан исключительным и наверно единственным в организации биоэнергетики, которая была названа протонной. Надо отметить, что немного неуместным и не очень понятным было сочетание в названии химической и осмотической компонент (с самого начала и до сих пор теория называется хемиосмотической), ибо при подробном рассмотрении в циклическом переносе протонов осмотических перестроек не предполагалось.

Но основным диссонансом глобального принципа протонной энергетики было открытие возможности существования еще одного типа энергетики, т.н. натриевой, характерной для бактерий, среда обитания которых характеризовалась высоким содержанием ионов натрия, при этом были охарактеризованы как натриевые помпы находящиеся в сопрягающей мембране прокариот, так и натриевая АТФ синтаза.

Эти логические и фактические аргументы послужили теоретической основой для предположения о наличии в митохондриях другого, нежели протонного, типа биоэнергетики, а именно основанного на транспорте ионов калия, сопряженный с синтезом АТФ в комплексе V. Это предположение следовало из громадного преувеличения ионов калия в цитозоле клетки над протонами. Действительно, протонов в цитозоле ≈ 100 нМ (рН 7,2–7,4), а ионов калия в миллионы раз больше (≈ 140 мМ), и принимая крайнюю избирательность канала F_0 по протону, допустить возможность транспорта ионов калия через него было достаточно логичным.

Эти основы требовали экспериментального подтверждения, которые последовали. Для этого был проведен целый ряд исследований, который включал работу на бислойных фосфолипидных мембранах, липосомах со встроенного АТФ синтазой, выделенных митохондриях и интактных кардиомиоцитах.

На бислойных мембранах базовые уровни проницаемости АТФ-синтазного канала для протона и K^+ (PH^+ и PK^+) были соответственно оценены как $5,2 \pm 0,9 \times 10^{-11}$ и $8,7 \pm 2,9 \times 10^{-17}$ м³/с, и которые увеличивались примерно в 3,5 раза после добавления диазоксида, активатора митохондриального АТФ-зависимого K^+ -канала соответственно, таким образом поддерживая селективность F_0 -канала $\sim 10^6 : 1$ с сильным предпочтением транспорта протона над ионами калия.

После встраивания АТФ синтазы в липосомы и наложения градиента рН и ионов калия был отмечен направленный транспорт ионов калия, чувствительный к ингибиторам АТФ синтазы. Количественная оценка показала, что при физиологических концентрациях ионов калия на каждый транспортируемый H^+ митохондриальная АТФ-синтаза проводит 3,7 K^+ , причем оба эти процесса были сопряжены с синтезом АТФ. Важным являлось и то, что диазоксид в равной мере усиливал транспорт K^+ и H^+ через синтазу, что явилось одним из доказательств того, что протон и K^+ идут по одному и тому же пути в АТФ синтазном комплексе.

Одним из самых важных вопросов был в том, какова же движущая сила для направленного транспорта K^+ через АТФ синтазу, учитывая то, что в митохондриях на внутренней мембране практически нет градиента K^+ . Оказалось, что в таких условиях при эффективно работающей протонной помпе, движущей силой является наличие электрического поля через мембрану, то есть именно мембранный потенциал является той искомой движущей силой транспорта ионов калия. Предполагалось, что вызванное повышение содержания K^+ в матриксе устраняется за счет активации K^+/H^+ -антипортера. Однако, небольшое несоответствие двух разнонаправленных потоков K^+ приводит к небольшому и временному накоплению этого иона в матриксе. В этом случае самое главное отличие ионов водорода и калия состоит в том, что ионы калия в отличие от протонов осмотически активны, в результате чего накопление K^+ в матриксе сопровождается поступлением в матрикс воды, т.е. происходит набухание митохондрий. Учитывая то, что небольшое (регуляторное) набухание митохондрий, не сопровождаемое падением трансмембранного потенциала, приводит к активации дыхания митохондрий, это приводит к увеличению сопряженного синтеза АТФ, в результате чего переключение с протонной на калиевую энергетику ведет к увеличению синтеза АТФ, что и было продемонстрировано как на реконструированных системах, так и на изолированных митохондриях.

Литература

1. Juhaszova M, Koblinsky E, Zorov DB, Nuss HB, Yaniv Y, Fishbein KW, de Cabo R, Montoliu L, Gabelli SB, Aon MA, Cortassa S, Sollott SJ. ATP Synthase K^+ - and H^+ -Fluxes Drive ATP Synthesis and Enable Mitochondrial K^+ - "Uniporter" Function: I. Characterization of Ion Fluxes. *Function (Oxf)*. 2021; 3(2):zqab065.
2. Juhaszova M, Koblinsky E, Zorov DB, Nuss HB, Yaniv Y, Fishbein KW, de Cabo R, Montoliu L, Gabelli SB, Aon MA, Cortassa S, Sollott SJ. ATP Synthase K^+ - and H^+ -fluxes Drive ATP Synthesis and Enable Mitochondrial K^+ - "Uniporter" Function: II. Ion and ATP Synthase Flux Regulation. *Function (Oxf)*. 2022; 3(2):zqac001.
3. Juhaszova M, Koblinsky E, Zorov DB, Aon MA, Cortassa S, Sollott SJ. Setting the Record Straight: A New Twist on the Chemiosmotic Mechanism of Oxidative Phosphorylation. *Function (Oxf)*. 2022 Apr 19;3(3):zqac018.
4. Cortassa S, Aon MA, Juhaszova M, Koblinsky E, Zorov DB, Sollott SJ. Computational modeling of mitochondrial K^+ - and H^+ -driven ATP synthesis. *J Mol Cell Cardiol*. 2022;165:9-18.

О прямом участии ионов водорода в функционировании фактора F1 АТФ-синтазы

Нестеров С.В.^{1,3*}, Ягужинский Л.С.^{2,3}

¹НИИ Курчатовский институт, Москва, Россия;

²НИИ им. Белозерского МГУ, Москва, Россия;

³Московский физико-технический институт, Москва, Россия;

semen.v.nesterov@phystech.edu

Анализ экспериментальных данных, тесно связанных с работами нашего научного коллектива, показывает, что в работе фактора F1 АТФ-синтазы митохондрий и хлоропластов принимают участие трансмембранно-перенесенные ионы водорода. После трансмембранного переноса через F₀ протоны попадают на фактор F1 при участии гамма-субъединицы, передающей также крутящий момент на каталитические центры АТФ-синтазы. Показано также существование кинетических барьеров для переноса протона на обеих сторонах внутренней мембраны митохондрий. Механическое перемешивание межфазной границы при вращении ротора АТФ-синтазы обеспечивает эффективное преодоление барьера для переноса протона от поверхности мембраны на фактор F1. Предложена и обсуждена модель, согласно которой при работе F1-F₀ АТФ-синтазы при механическом движении гамма-субъединицы параллельно с конформационной перестройкой активного центра фермента (схема Бойера) происходит замещение иона магния ионами водорода, за счёт чего достигается эффективное вытеснение молекулы АТФ.

Спектральные изменения родопсина *S. raucimobilis* в присутствии и в отсутствие Zn²⁺ в зависимости от pH

Загрядская Ю.А.², Цыбров Ф.М.², Чижов И.В.¹, Охрименко И.С.^{2*}

¹Институт биофизической химии, Ганноверская медицинская школа, Ганновер, Германия;

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), МФТИ,

Физтех, Долгопрудный, Россия;

ivan.okhrimenko@phystech.edu

Представители рода *Sphingomonas* обладают гибким метаболизмом и, таким образом, могут перерабатывать большое разнообразие как природных органических соединений, так и синтетических, к примеру, загрязнителей окружающей среды. Это вызвало обширный научный интерес к метаболическим путям этих организмов, свойствам ферментов, вовлеченных в эти пути, и генетике их катаболических процессов (Balkwill, 2006). Благодаря уникальным биоразлагающим и биосинтетическим способностям, сфингомонады имеют ряд биотехнологических применений, таких как, например, переработка веществ, загрязняющих окружающую среду (Cheng, 2021), увеличения продуктивности сельскохозяйственных растений (Saeed, 2021), как бактерии увеличивающие усвояемость цинка растениями (Kamran, 2017; Saxena, 2015). Некоторые сфингомонады (особенно *Sphingomonas raucimobilis*, в геноме которого был выявлен ген интересующего нас родопсина (Okhrimenko, 2016, 2017, 2018)) также могут быть причиной заболеваний человека (Woo, 2014; Hardjo, 2016).

Максимум поглощения ретиналя основания Шиффа (RSB) родопсина *S. raucimobilis* (SpaR), солюбилизованного в n-додецил-β-D-мальтопиранозиде, соответствует 540 нм при pH 7,5 и не зависит от pH в диапазоне от 2,5 до 11. При значениях pH ниже 2,5 максимум спектров поглощения смещается в область 570 нм за счёт титрования протоноакцепторной группы Asp 73 (соответствует Asp 85 в бактериородопсине *H. salinarum*). Значение pK протоноакцепторной группы SpaR составило ~ 1,03. Это значение намного ниже, чем у известных протеородопсинов (Friedrich, 2002; Mowery, 1979), например, pK бактериородопсина *H. salinarum* составляет ~ 2,7. SpaR имеет три аминокислотных остатка гистидина и хелатирует ионы цинка, но изменения спектра поглощения RSB при титровании при низких значениях pH и pK(D73) в присутствии 10 или 5 mM Zn²⁺ почти такие же, как и без Zn²⁺, а именно в присутствии цинка pK(D73) ~ 0,98. Спектральные изменения при снижении pH обратимы, но при инкубации белка наблюдается незначительная денатурация SpaR при совсем низких значениях pH. Максимальные изменения OD в ответ на изменение pH наблюдались при 515 нм и 615 нм. Было проведена глобальная фитирование изменений OD на этих длинах волн, полученные числа были нормализованы и представлены в виде доли протонированного состояния. Фитирование зависимостью описывающую бимолекулярную реакцию (протон+D73) дало указанные выше значения pK в точке перегиба сигмоидной кривой. Эти значения отражают pK(D73) акцепторной группы протонов Asp 73, которая пространственно близка к RSB. pK протоноакцепторной группы D73 родопсина SpaR имеет рекордно низкое

значение и практически не зависит от концентрации Zn^{2+} . Исследование выполнено при поддержке проекта РНФ 23-14-00160.

Использованная литература:

Balkwill, D. L., Fredrickson, J. K. & Romine, M. F. *Sphingomonas* and Related Genera. in *The Prokaryotes* 605–629 (Springer New York, 2006). doi:10.1007/0-387-30747-8_23.

Cheng, C., Wang, R., Sun, L., He, L. & Sheng, X. Cadmium-resistant and arginine decarboxylase-producing endophytic *Sphingomonas* sp. C40 decreases cadmium accumulation in host rice (*Oryza sativa* Ciangyou 513). *Chemosphere* 275, 130109 (2021).

Friedrich, T. et al. Proteorhodopsin is a Light-driven Proton Pump with Variable Vectoriality. *J. Mol. Biol.* 321, 821–838 (2002).

Hardjo Lugito, N. P., Cucunawangsih & Kurniawan, A. A Lethal Case of *Sphingomonas paucimobilis* Bacteremia in an Immunocompromised Patient. *Case Rep. Infect. Dis.* 2016, 1–4 (2016)

Mowery, P. et al. Effect of acid pH on the absorption spectra and photoreactions of bacteriorhodopsin. *Biochemistry*. 18.19, 4100–4107. (1979)

Kamran, S. et al. Contribution of Zinc Solubilizing Bacteria in Growth Promotion and Zinc Content of Wheat. *Front. Microbiol.* 8, (2017)

Okhrimenko, I., Popov, P., Pakhomova, S., Zyulina, V., Legkun, G., Malyar, N., ... & Gordeliy, V. (2016, September). Search of new optogenetics tools by means of structural and functional characterization of novel microbial rhodopsins which reproduce mutations of already known ones. In *FEBS JOURNAL* (Vol. 283, pp. 219–219). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY-BLACKWELL.

Охрименко И.С., Мальяр Н.Л., Алексеев А.А., Петровская Л.Е., Попов П.А., Чижов И.В., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Бюльшт Г.Д., Горделий В.И. Микробный родопсин *S. Paucimobilis*: физикохимические свойства и функции. Спецвыпуск *Acta Naturae*, 2017. ISBN 978-5-906988-33-1, p. 73

Okhrimenko, I., Popov, P., Malyar, N., Petrovskaya, L., Lyubaikina, N., Soloviov, D., ... & Gordeliy, V. (2018). Properties of new unexplored microbial rhodopsins. VI International Conference “Chemistry, structure and function of biomolecules”, Minsk, 22–25 May. p. 52.

Saeed, Q. et al. Rhizosphere bacteria in plant growth promotion, biocontrol, and bioremediation of contaminated sites: A comprehensive review of effects and mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22 (2021)

Saxena, S. *Applied Microbiology*. (Springer India, 2015). doi:10.1007/978-81-322-2259-0.

Woo, K.-S. et al. Outbreak of *Pseudomonas Oryzihabitan* Pseudobacteremia Related to Contaminated Equipment in an Emergency Room of a Tertiary Hospital in Korea. *Infect. Chemother.* 46, 42 (2014)

Структура протонных полуканалов FoF1-АТФсинтазы в различных типах модельных мембран

Ивонцин Л.А.^{1*}, Машковцева Е.В.^{1,2}, Нарциссов Я.Р.^{1,3}

¹НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, Россия ;

²Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;

³Группа биомедицинских исследований, БиДиФарма ГмбХ, Зик, Германия;

ivontsin@icmph.ru

Важную роль в обмене веществ и энергии в живых организмах играет аденозинтрифосфат (АТФ), макроэргическое соединение, которое является универсальным источником энергии для многих биохимических процессов. В клетке образование АТФ осуществляется белковым комплексом FoF1-АТФсинтазой с использованием электрохимического градиента ионов водорода. Одним из важнейших процессов в каталитическом цикле фермента является перенос протонов через мембранный фактор Fo по двум несоосным полуканалам. Однако, несмотря на наличие большого числа pdb-структур с высоким разрешением, расположение и структура полуканалов все еще неизвестны, и оценка параметров протонного транспорта затруднена.

Для анализа возможных областей движения протона, а также исследования структурной динамики радикалов аминокислот и гидратации белка, было проведено молекулярно-динамическое моделирование мембранной части FoF1-АТФсинтазы из *E. Coli* [PDB ID: 6VWK], встроенной в липидный бислой и водную среду. Универсальность молекулярного механизма работы фермента позволяет получать информацию о процессе при изучении белка из различных организмов. Были рассмотрены мембраны с различным липидным

составом, в частности, разным уровнем содержания кардиолипидов, которые играют существенную роль в процессах передачи энергии, поддерживая структуру и функциональную активность дыхательных комплексов.

Во входном полуканале были обнаружены две водные полости, через которые протон может проникать внутрь фермента, и по высококонсервативной цепи переноса протона, включающей существенные полярные аминокислотные остатки, достигать Asp61 с-субъединицы. Однако непосредственно прямой переход между аминокислотами был возможен не всегда из-за их значительной удаленности друг от друга. С помощью анализа геометрии взаимного расположения аминокислотных остатков белка и растворителя были установлены критические для протонного транспорта консервативные области локализации трех структурных кластеров молекул воды (W1-W3), необходимых для существования непрерывной цепи переноса. При этом наличие в мембране кардиолипидов оказывало существенное влияние на гидратацию полуканалов, а также наблюдалось увеличение вероятности прямого переноса протона между некоторыми парами полярных аминокислот.

Кроме того, при моделировании во всех типах мембран мы обнаружили стабильные пространственные положения радикалов некоторых аминокислот а-субъединицы, характеризующиеся постоянным набором параметров и получивших названия SP1, SP2, SP3. Установлено, что aAsn214 работает подобно ключу в электрической цепи, в состоянии SP1 замыкая цепь переноса протона на aHis245, а в положении SP3 на cAsp61. Таким образом цепь переноса протона всегда незамкнута и вероятность нахождения aAsn214 в положении SP1 или SP3 будет определять время протонного транспорта [1].

При этом выходной полуканал представлял собой водную полость и содержал большое количество гидрофильных аминокислотных остатков, которые вместе с молекулами воды образовывали большие разветвленные сети водородных связей, по которым протон мог перемещаться от ключевого cAsp61 в цитоплазму.

Таким образом, описанные результаты дают представление о влиянии фосфолипидного состава мембраны на расположение и структуру обоих полуканалов в АТФсинтазе. Полученная в работе сеть полярных аминокислотных остатков и молекул воды позволит провести моделирование траекторий движения протона через мембранную часть белка, а также оценить параметры протонного транспорта, которые сложно измерить экспериментальными методами.

1. Ivontsin L.A., Mashkovtseva E.V, Nartsissov Y.R. Insights on the proton translocation pathways in FoF1-ATP synthase using molecular dynamics simulations // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2022. V. 717. P. 109135.

Терминальная оксидаза цитохром bd-II Escherichia coli участвует в разложении перекиси водорода

Борисов В.Б.^{1*}, Настаси М.Р.², Форте Е.²

¹НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия;

²Римский университет Сапиенца, кафедра биохимических наук, I-00185 Рим, Италия;
viborborbor@yahoo.com

Цитохром bd-II - терминальная оксидаза электрон-транспортной цепи Escherichia coli. Фермент восстанавливает молекулярный кислород до воды, используя электроны, полученные от хинола, и сопрягает эту окислительно-восстановительную реакцию с созданием протон-движущей силы. Последняя используется бактериями для производства АТФ и выполнения других видов работы. Цитохром bd-II состоит из субъединиц AppB, AppC и AppX. AppB содержит сайт для связывания хинола и три гема - низкоспиновый b-558 и высокоспиновые b-595 и d [1]. Оксидаза bd-II до сих пор плохо охарактеризована. Ее физиологическая роль не ясна, но, по-видимому, отличается от роли других терминальных оксидаз E. coli, таких как цитохром bd-I и цитохром bo. Примечательно, что в присутствии перекиси водорода (H₂O₂) цитохром bd-II обеспечивает преимущество в приспособляемости E. coli во время анаэробного роста в воспаленном кишечнике мыши и Salmonella - в обработанном стрептомицином кишечнике [2]. Мы решили установить, играет ли оксидаза bd-II роль в метаболизме H₂O₂ и толерантности к этому соединению, в дополнение к ее вкладу в сохранение и преобразование энергии мембранами E. coli. С помощью респирометрии высокого разрешения и спектродиффузии показано, что препараты солюбилизованного детергентом цитохрома bd-II, выделенного из E. coli, способны к быстрому разложению H₂O₂. Реакция протекает с образованием половины моля O₂ на моль H₂O₂. Скорость реакции растет с увеличением [H₂O₂] до 0,5 mM, однако при более высокой [H₂O₂] стремится к насыщению. Наблюдаемая активность нечувствительна к N-этилмалеимиду, что исключает участие в реакции тиоловых групп белка. Отсутствие ингибирующего действия антимицина А и убихинона-1 свидетельствует о том, что хинолсвязывающий сайт фермента также не участвует в реакции. CO и NO, взаимодействующие с восстановленным гемом d, также не влияют на активность. Кроме того, добавление H₂O₂

в присутствии дитиотреитола и убихинона-1 не ингибирует O₂-редуктазную активность цитохрома bd-II и не приводит к его инактивации. Эти данные свидетельствуют о том, что гем d, на котором происходит четырехэлектронное восстановление O₂, едва ли участвует в разложении H₂O₂. Напротив, реакция ингибируется цианидом (IC₅₀ = 4,5 мкМ) и азидом, которые обычно нацелены на высокоспиновый окисленный гем. Поскольку оксидаза bd-типа имеет два высокоспиновых гема - b-595 и d, но участие последнего в наблюдаемой реакции маловероятно, в качестве сайта в ферменте, ответственного за каталитическое разложение H₂O₂, мог бы служить гем b-595. Способность оксидазы bd-II эффективно удалять H₂O₂, возможно, играет роль в физиологии бактерий, наделяя их устойчивостью к окислительному стрессу.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00045; <https://rscf.ru/project/22-24-00045/>).

[1] Friedrich T., Wohlwend D., Borisov V.B. (2022) Int. J. Mol. Sci. 23(6):3166. doi: 10.3390/ijms23063166.

[2] Borisov V.B., Siletsky S.A., Paiardini A., Hoogewijs D., Forte E., Giuffre A., Poole R.K. (2021) Antioxid. Redox Signal. 34(16):1280-1318. doi: 10.1089/ars.2020.8039.

Электрогенез в корнеобитаемой среде различных сортов салата

Кулешова Т.Э.^{1*}, Гасиева З.А.¹, Галушко А.С.¹, Панова Г.Г.¹

¹Агрофизический научно-исследовательский институт;

www.piter.ru@bk.ru

Возникновение разности потенциалов в живых системах обусловлено комплексом физико-химических процессов, обеспечивающих поддержание неравномерного распределения ионов на клеточном, тканевом и организменном уровнях. В процессе развития растений вдоль всего организма возникает градиент электрического потенциала, обусловленный диффузией ионов, концентрационными эффектами и различиями в интенсивностях биохимических процессов.

Биоэлектрохимические системы на основе электроактивных процессов в корнеобитаемой среде растений и сопутствующих микроорганизмов – растительно-микробные топливные элементы, представляют собой новый перспективный экологически чистый источник возобновляемой энергии. Хотя возможность практического использования биоэнергетических ресурсов уже показана во многих исследованиях, природу электрогенеза, включая его зависимость от генетически обусловленных физиологических особенностей растений и их состояния на протяжении развития, еще предстоит раскрыть.

Цель данного исследования заключалась в изучении динамики формирования разности потенциалов в корнеобитаемой среде различных сортов салата.

Измерение электрических характеристик осуществляли путем размещения биосовместимых коррозионностойких электродных систем в корнеобитаемой среде, что обеспечивало поверхностный электрический контакт с корневой системой и прикорневой зоной. Мониторинг изменения разности потенциалов проводили с помощью аппаратной платформы Arduino каждые 15 минут в течение всего вегетационного периода (28-32 дня). Опыты проводили в регулируемых условиях агробиополигона.

Для выявления роли растений в формировании электрогенных реакций в корнеобитаемой среде были измерены изменения разности потенциалов в биоэлектрохимической системе, содержащий питательный раствор без растений (контроль) и с растениями на примере салата сорта Тайфун. На начальном этапе эксперимента в питательном растворе наблюдалась генерация разности потенциалов порядка 70-100 мВ, по-видимому, являющееся следствием различий в концентрациях составляющих питательного раствора на верхнем и нижнем электродах. Можно сказать, что питательный раствор выступает аналогом электролита в гальваническом элементе. С течением времени напряжение в контрольной ячейке спадало, скорее всего, вследствие выравнивания концентраций. При выращивании растений разность потенциалов наоборот увеличивалась до ~200 мВ и была стабильна на протяжении всего вегетационного периода для салата. Вероятно, увеличение напряжения в биоэлектрохимической системе при размещении в нем растительных объектов связано с развитием корневой системы, жизнедеятельностью ризосферных микроорганизмов, транспортом минеральных веществ и, как следствие, усилением диффузионных процессов.

Для выбора растений, наиболее перспективных с точки зрения получения электроэнергии в ходе выращивания растительной продукции, было проведено исследование электрофизиологических свойств следующих сортов листового салата, различающихся эффективностью работы фотосинтетического аппарата: Solos F1, китайский курчавый, китайский красно-зеленый, Меркурий, Дубрава, Балет, Робин, Кокарда. Растения выращивали в торфяном грунте (Агробалт С, Россия) в разработанных нами вегетационно-облучательных установках в контролируемых условиях агробиополигона ФГБНУ АФИ.

Динамика разности потенциалов для исследованных сортов была схожая – наблюдали рост значений с ~200 мВ от начала вегетационного цикла до более 300 мВ к 15-ым суткам и затем стабилизацию. Среднее значение разности потенциалов в системе корнеобитаемая среда-растения составило 281 ± 32 мВ для Solos F1, 221 ± 42 мВ для Китайский курчавый, 206 ± 47 мВ для Китайский красно-зеленый, 306 ± 32 мВ для Меркурий, 291 ± 35 мВ для Дубрава, 289 ± 27 мВ для Балет, 286 ± 31 мВ для Робин, 272 ± 37 мВ для Кокарда.

Наибольшее значение разности потенциалов в системе корнеобитаемая среда-растения было характерно для салата сорта Меркурий – оно достигало 430 мВ. При этом электрические характеристики растений напрямую не коррелировали с показателями биомассы. Масса надземной части растений в одной ячейки составила $47,8 \pm 8,6$ г для Solos F1, $48,1 \pm 13,5$ г для Китайский курчавый, $58 \pm 15,3$ г для Китайский красно-зеленый, $71 \pm 9,3$ г для Меркурий, $42,6 \pm 13,3$ г для Дубрава, $113,1 \pm 25,8$ г для Балет, $54,6 \pm 11,6$ г для Робин, $82 \pm 26,4$ г для Кокарда.

На основе полученных данных были сформированы представления об электрических характеристиках в корнеобитаемой среде различных сортов салата и предложена конструкция фитотопливного элемента – биоэлектрохимической системы на базе электрогенных процессов в системе корнеобитаемая среда-растения.

Таким образом, была показана возможность использования электрогенеза в системе корнеобитаемая среда-растения в качестве нового зеленого источника электроэнергии. Потенциал использования охарактеризованных выше биоэлектрохимических систем включает обеспечение электропитанием датчиков окружающей среды, источников света, беспроводных сенсорных сетей, интернета вещей, систем фитомониторинга в естественных условиях и защищенном грунте, удаленных районах, частичное энергоснабжение устройств поддержки жизнедеятельности растений в искусственных агроэкосистемах.

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

Биомеханика. Биологическая подвижность

Автономная активность постуральной мышцы при функциональной разгрузке: компенсация деструктивных процессов или их углубление?

Шенкман Б.С.^{1*}, Шарло К.А.¹, Тыганов С.А.¹, Сергеева К.В.¹, Калашников В.Е.¹, Туртикова О.В.¹,
Львова И.Д.¹

¹ГНЦ РФ ИМБП РАН;
bshenkman@mail.ru

Атрофия мышечных волокон, снижение экспрессии мРНК медленной изоформы тяжелых цепей миозина (ТЦМ) МуНС1 (β), повышение экспрессии быстрых изоформ МуНС1α/х и МуНСβ, нарушения функции митохондрий часто наблюдается в m. soleus грызунов при функциональной разгрузке с применением модели вывешивания задних конечностей [Booth et al, 1990] и рассматриваются как последствия прекращения сократительной активности. Однако если разгрузку применяют дольше 3 суток, камбаловидную мышцу нельзя считать находящейся в состоянии полного покоя. В 1987 году Alford et al показали, что, начиная с 3 суток вывешивания крыс, значения интегральной ЭМГ оказываются повышенными и продолжают непрерывно повышаться вплоть до 14 суток воздействия. Этот феномен, который можно назвать «автономной» нервно-мышечной активностью, был воспроизведен в аналогичных условиях и другими авторами [Kawano et al, 2002, 2004; и другие]. Эта активность вопреки ожиданиям, не препятствует развитию атрофических событий и изменениям паттерна экспрессии мРНК медленной и быстрых изоформ МуНС. На модели спинальной трансекции было показано, что автономная активность является результатом значительного снижения экспрессии калий-хлоридного ко-транспортера КСС-2 в нейронах поясничного отдела спинного мозга с последующим изменением направления хлоридного тока и инверсией мембранного потенциала, приводящего к резкому повышению возбудимости мотонейронов [Boulangez et al., 2010]. Снижение экспрессии КСС-2 может быть предотвращено введением нейролептика прохлорперазина. Нами недавно было показано достоверное снижение содержания КСС-2 в спинном мозге крыс, подвергнутых 7-суточной функциональной разгрузке (на модели вывешивания задних конечностей) [Kalashnikov et al., 2021]. У этих животных с помощью имплантированных электродов уже после 2 суток разгрузки была зарегистрирована автономная электрическая активность камбаловидной мышцы. С помощью администрации прохлорперазина удалось предотвратить снижение содержания КСС-2 в спинном мозге и значительно снизить автономную активность мышцы. Эти результаты дают нам возможность дальнейшего изучения внутримышечных последствий снижения автономной активности мышцы в условиях разгрузки. Нами были проведены исследования влияния прохлорперазина, существенно снижающего уровень ЭМГ-активности камбаловидной мышцы при функциональной разгрузке, на миоинозый фенотип и сигнальные маркеры биогенеза митохондрий и протеостаза мышцы.

Значительное снижение автономной активности камбаловидной мышцы под действием прохлорперазина на фоне 7-суточной функциональной разгрузки привело к закономерному углублению уже сниженной экспрессии регуляторов митохондриального биогенеза (COX1, COX2, COX4, PGC1α). Этот факт свидетельствует о том, что маркеры митохондриального биогенеза находятся в прямой зависимости от мышечной активности. Значительное снижение экспрессии митохондриальных маркеров у животных, получавших прохлорперазин и характеризовавшихся пониженной ЭМГ камбаловидной мышцы, сопровождалось достоверным уменьшением содержания супероксидных анионов (по флуоресценции дигидроэтидия) и пониженным уровнем фосфорилирования МАРкиназ p38 и JNK в мышце по сравнению с животными, получавшими физиологический раствор на фоне разгрузки. В то же время снижение автономной активности камбаловидной мышцы на фоне функциональной разгрузки под действием прохлорперазина обусловило поддержание контрольного уровня экспрессии мРНК изоформ ТЦМ, сопровождающееся отсутствием экспорта NFATc1 из мышечных ядер. Этот феномен можно связать со снижением в этих условиях уровня фосфорилирования МАПК p38, которая может фосфорилировать NFAT и способствовать его экспорту из ядер [Sharlo et al., 2019]. Сохранение контрольного уровня экспрессии изоформ ТЦМ отразилось и на соотношении мышечных волокон быстрого и медленного типов, которое под действием прохлорперазина на фоне разгрузки сохранилось на уровне виварного контроля по сравнению с вывешенными животными, получавшими плацебо и демонстрировавшими достоверный сдвиг соотношения в «быструю» сторону. При анализе маркеров анаболических и катаболических сигнальных путей было обнаружено, что снижение основных маркеров анаболических путей (включая параметры рибосомального биогенеза) и повышение экспрессии основных катаболических маркеров мышечных Е3-убиквитин лигаз было полностью или частично предотвращено введением прохлорперазина.

Таким образом, можно предположить, что автономная тоническая активность камбаловидной мышцы, способствуя накоплению активных форм кислорода и, возможно, других сигнальных мессенджеров (например, ионов Ca^{2+}), усиливает дисбаланс протеостаза мышцы и приводит к трансформации ее миозинового фенотипа в быструю сторону.

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда № 22-15-00151.

Алгоритм построения метамодели для прогнозирования гемодинамики в аортах детей с врожденными пороками сердца

Кучумов А.Г.^{1,2}, Голуб М.В.^{1*}, Ракишева И.О.², Дорошенко О.В.¹

¹ *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кубанский государственный университет";*

² *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»;*
m_golub@inbox.ru

Обструктивные поражения выводного тракта правого желудочка, изолированные или сочетающиеся с другими врожденными пороками сердца, составляют 25–30% врожденных аномалий сердца. Биомедицинская инженерия является относительно новой и быстро прогрессирующей областью современной науки, в которой биомеханические модели могут повышать эффективность принятия решений при лечении. Около половины пациентов с врожденными пороками сердца на первом году жизни нуждаются в хирургическом лечении. Прорывным решением в хирургическом лечении цианотических врожденных пороков сердца, таких как тетрада Фалло, атрезия клапана легочной артерии и некоторых других, оказалось создание межсистемного шунта (в частности, модифицированного шунта Blalock–Taussig). Однако установка модифицированного шунта Blalock–Taussig имеет высокие риски (смертность от 2,3% до 16%). Основные осложнения модифицированного шунта Blalock–Taussig связаны с развитием тромбоза при выборе шунта малого диаметра и гиперволемией малого круга при шунте большого диаметра. Так как на настоящий момент подбор диаметра и места установки шунта осуществляется чисто эмпирически, то выбор оптимального диаметра шунта остается актуальной задачей, которая не решена по настоящее время и решение которой необходимо в повседневной работе хирурга.

Одним из эффективных подходов к решению этой проблемы может стать построение персонализированной модели кровотока, которая позволит анализировать эффективность хирургического лечения. Возможности вычислительной гидродинамики как мощного инструмента для исследования физиологических течений могут позволить произвести комплексную неинвазивную оценку для диагностики и лечения заболеваний, а также послужить для проектирования новых устройств для клинических испытаний. Однако из-за уникальных особенностей каждого пациента, такое персонализированное моделирование является достаточно длительным (время анализа для одного пациента может занимать от нескольких часов до нескольких дней или недель), трудоемким и вычислительно дорогостоящим процессом (необходимо решение трехмерных задач вычислительной гидродинамики). Более того, определение параметров модели является еще одним сложным вопросом. К тому же, обработка и оценка большого объема собранных данных является не только трудоемким и длительным процессом, но и достаточно субъективным (например, при анализе медицинских изображений).

Потенциальным решением данной проблемы, которое предлагается в данной работе, является применение алгоритмов машинного обучения как для ускорения вычислений, так и для принятия решений. В данном сообщении предлагается алгоритм построения метамодели, т.е. модели, построенной на ограниченном числе симуляций с помощью сложной гидродинамической модели, для описания гемодинамики в аорте ребенка с врожденным пороком сердца на основе использования данных, полученных из моделей течения в персонализированных геометриях. Причем такая метамодель для детей с врожденными пороками сердца строится впервые.

На первом этапе алгоритма на основе изображений, полученных с помощью мультиспиральной компьютерной томографии, были собраны данные о геометрии аортальных клапанов. Это позволяет импортировать срезы в ITK-SNAP и после этого в систему анализа методом конечных элементов ANSYS для создания трехмерной модели. Решение задачи о гемодинамике осуществляется с использованием Ansys Fluent для нахождения основных гемодинамических параметров (скорости).

С каждой моделью ассоциированы данные о диагнозе и распределении объемного расхода кровотока конкретного пациента, которые используются в качестве граничных условий при расчете гемодинамики в аортальном клапане. На основе трехмерной геометрической модели были выделены основные геометрические характеристики аорт (расстояния между местами выхода артерий, диаметры, кривизна и пр.), которые в

дальнейшем необходимы для настройки метамодели и обучения нейронных сетей. На настоящий момент база данных моделей аорт состоит из более чем 500 трехмерных моделей. Это позволяет решать задачу классификации характерных видов аорт по ключевым геометрическим характеристикам и особенностям гемодинамики с применением методов анализа данных и машинного обучения.

Учитывая геометрию аорты в качестве входных данных, обученные нейронные сети смогут выводить требуемые распределения в течение короткого времени, что в разы быстрее, чем при CFD-симуляции. В дальнейшем будут протестированы различные алгоритмы, включая свёрточные нейронные сети, которые способны моделировать сложные, нелинейные отношения между входными и выходными переменными. Таким образом, при накоплении достаточного объема адекватных данных для обучения, включающих анатомические модели и гемодинамические данные, в режиме реального времени нейронные сети для конкретного пациента будут подсказывать потенциальные хирургические решения на основе экспертных решений ведущих специалистов и вычислительного моделирования гемодинамики в аортах. В дальнейшем планируется проанализировать и классифицировать более 1000 различных геометрий и результатов моделирования (распределения гемодинамических параметров).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № 20.1/12.

Анализ пострурального баланса спортсменов-бадминтонистов при реализации позно-тонического рефлекса на повороты головы

Егорова В.К.^{1*}, Балтин М.Э.^{1,2}, Федянин А.О.^{1,2}, Яфарова Г.Г.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет ;

²Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма;
veronikatsyupa@gmail.com

Позно-тонические рефлексы обеспечивают сохранение равновесия при изменении положения тела. У взрослого человека эти рефлексы находятся под тормозным контролем со стороны надстволовых структур. Актуальным является исследование реакции поструральной системы при реализации рефлексов положения у профессиональных спортсменов. Цель работы – определить изменение подошвенного давления при реализации рефлекса на повороты головы у спортсменов-бадминтонистов.

В исследовании приняли участие 12 спортсменов и 12 субъектов, не занимающихся никаким видом спорта (контрольная группа), в возрасте от 19 до 23 лет. Было проведено плантографическое исследование длительностью по 20 секунд в стандартной стойке, а также при поворотах головы направо и налево. Рассчитывался коэффициент латеральной асимметрии (Кл) по соотношению среднего подошвенного давления правой стопы к левой; также был проведен тест на определение функциональной моторной асимметрии.

В группе спортсменов у 83 % (n=10) выявилась перекрестная моторная асимметрия: ведущей ногой является левая, ведущая рука – правая. В контрольной группе только у 25 % испытуемых (n=3) была выявлена перекрестная моторная асимметрия; у 58 % (n=7) – правосторонняя моторная латерализация, а у 17 % (n=2) – левосторонняя.

По Кл в стандартной стойке (голова прямо) каждая группа разделилась на 3 категории по выраженности опорной латерализации: 1) правая опорная латерализация (ПОЛ), Кл>1,15; 2) левая опорная латерализация (ЛОЛ), Кл<0,85; 3) амбидекстры по опорной асимметрии, Кл = 0,85 - 1,15. В группе спортсменов ПОЛ регистрировалась у 3 испытуемых, у них ведущей моторной конечностью являлась левая; у 2 из 3 спортсменов с ЛОЛ ведущей ногой была левая и у 1 – правая. 6 спортсменов являлись амбидекстрами по опорной латерализации, при этом у 5 из них отмечалось левосторонняя моторная асимметрия, и лишь у 1 – правосторонняя.

В контрольной группе у 3 исследуемых наблюдалась ПОЛ, ведущей моторной конечностью у 2 из 3 являлась правая, 1 – левая; аналогичное распределение было у испытуемых с ЛОЛ (n=3, 2 с правосторонней моторной асимметрией, 1 – левосторонней). 6 человек контрольной группы являлись амбидекстрами по опорной латерализации, при этом у 4 из них отмечалось правосторонняя моторная асимметрия, у 1 – левосторонняя, 1 испытуемый являлся амбидекстром по моторной асимметрии.

В группе спортсменов с ПОЛ при повороте в сторону опорной конечности (направо) выявлялась тенденция к увеличению давления контралатеральной конечности (Кл снизился в среднем на 2 %). У спортсменов с ЛОЛ поворот налево вызвал усиление давления ипсилатеральной конечности в среднем на 6 %. Поворот в противоположную от опорной конечности сторону у спортсменов с ПОЛ не приводил к изменению Кл, а у испытуемых с ЛОЛ поворот головы в правую сторону привел к некоторому снижению давления опорной конечности, Кл увеличился в среднем на 11 % и составил 0,78±0,07. У спортсменов-амбидекстров по опорной

латерализации поворот головы как направо, так и налево вызвал усиление давления левой конечности в среднем на 9 и 6 %, соответственно.

В контрольной группе у испытуемых с ПОЛ повороты головы также привели к перераспределению подошвенного давления: однако при повороте в сторону опоры Кл увеличился в среднем на 4 %, что свидетельствует о повышении давления ипсилатеральной конечности; а при повороте головы налево у этих испытуемых также увеличивалось давление правой стопы (Кл увеличился в среднем на 8 %), тогда как у спортсменов мы не наблюдали изменения подошвенного давления при повороте головы в противоположную от опорной конечности сторону. У испытуемых контрольной группы с преобладанием ЛОЛ повороты головы привели также к усилению давления правой конечности: при повороте в сторону опорной стопы Кл увеличивался в среднем на 16 %, при повороте направо – на 14 %. В этой группе аналогичная картина наблюдалась и у амбидекстров: усиление давления правой ноги при поворотах направо и налево составило в среднем 6 и 5 %, соответственно.

Таким образом, в группе спортсменов преобладала перекрестная моторная и опорная асимметрия (10 из 12 испытуемых), тогда как в контрольной группе испытуемые с перекрестной асимметрией составили лишь 25 %. У спортсменов с ЛОЛ при повороте в сторону опоры наблюдалась тенденция к увеличению давления на ипсилатеральную конечность, а у испытуемых, не занимающихся спортом, при повороте налево наблюдали перенос опорного давления на контралатеральную конечность, что свидетельствует о том, что спортсмены с ЛОЛ сохраняют опорную латерализацию при повороте в сторону опоры. У испытуемых с ПОЛ (как у спортсменов, так и у контрольной группы) при повороте в сторону опоры сохранялась правосторонняя опорная латерализация.

Поворот в противоположную от опорной конечности сторону у спортсменов с ПОЛ не вызвал никаких изменений, тогда как у контрольных испытуемых поворот налево привел к увеличению давления ипсилатеральной конечности. Как у спортсменов, так и в контрольной группе у испытуемых с ЛОЛ поворот головы в противоположную от опоры сторону вызвал увеличение давления контралатеральной конечности.

Таким образом, преобладание у спортсменов перекрестной моторной/опорной асимметрии может позволить улучшать их возможности при инициации моторного акта нижних конечностей. У спортсменов выявляется более выраженное сохранение опорной латерализации при поворотах головы, тогда как у контрольной группы в аналогичных условиях чаще встречается дестабилизация опорной латерализации. Данные результаты могут свидетельствовать о перестройках моторной системы у профессиональных спортсменов, в том числе и проявляющихся в сохранении постурального баланса при реализации шейно-тонических рефлексов.

Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета» (ПРИОРИТЕТ-2030).

Биомеханические аспекты оценки мощности мышц плечевого пояса у борцов

Зверев А.А.^{1*}, Мавлиев Ф.А.¹, Абдрахманова А.Ш.¹

¹*Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма;
Aleksei5@rambler.ru*

Мощность мышц является важным показателем, который необходим во многих видах спорта, где требуется демонстрация силы и скорости, в частности в борьбе. Для оценки мощности мышц часто используют тест Вингейта, который позволяет оценить анаэробную производительность мышц и оценить результаты с существующими стандартами (Popadic, 2009). Результаты данного теста могут быть представлены как в абсолютных значениях (Вт), так и относительных (Вт/кг), что позволяет более точно оценить физическую подготовленность спортсмена. Другие показатели, рассчитываемые в ходе теста, согласно мнению исследователей менее надежны и не всегда воспроизводятся. Не решенным остается вопрос, связанный с тем, что мощность, как объединение скорости и силы, в ходе выполнения теста, будет зависеть и от длины и диаметра конечностей, который может вносить свой вклад в конечный результат. При этом диаметр конечностей, при одинаковом уровне подкожного жира и диаметра костей, будет косвенно определять величину рабочих мышц, а длина конечностей – определять длины тех рычагов, через которые будить реализовываться эта мощность. Следовательно, при неизменной длине ручек эргометра, может возникать существенная разница между испытуемыми в результате тестирования лишь из-за разниц длин конечностей.

Для оценки возможного влияния на мощность антропометрических параметров, было проведено тестирование борцов, занимающихся корэш, дзюдо, вольная борьба, самбо и имеющих 1 разряд и выше. Были измерены рост, вес, диаметр и длина плеча, длина предплечий (см). Длина тела исследуемых 176,9 ± 8 см, вес 76 ± 7,8 кг, окружность плеча 30 ± 2 см, длина плеча 32,8 ± 2 см, предплечья 27,6 ± 1,4 см. Возраст обследуемых на момент тестирования 19,8 ± 1,5 лет. В ходе короткого теста Вингейта продолжительностью 5 секунд на ручном

эргометре Monark 891 E оценена пиковая абсолютная и относительная мощность (вт, вт/кг), а также скорость оборотов ручки эргометра (об/мин). Все исследуемые делали разминку и пробный тест перед началом тестирования, для нивелирования технических аспектов выполнения теста тестирование проводилось 3 раза по 5 секунд с отдыхом между попытками. Нагрузка на эргометре дозировалась как 3,75% от веса тела.

В ходе анализа показано, что окружность плеча не коррелирует с показателями как абсолютной, так и относительной мощности, что, по всей видимости определяется тем, что мощность достигается суммарной активностью не только мышц плеча, но и мышцами туловища (грудные мышцы и широчайшие), которые активно участвуют в ходе теста сгибая и разгибая руки в плечевых суставах, а также согласованностью их работы.

Длина плеча, также, как и длина предплечья имела положительные корреляции с результатами теста: с абсолютной пиковой мощностью $r=0.61-0.068$ ($p<0.006-0.044$), так же коррелировала с абсолютной пиковой мощностью и длина предплечья $r=0.61-0.074$ ($p<0.025-0.008$), кроме этого длина плеча и предплечья коррелировала со скоростью оборотов ручки эргометра – $r=0.68-0.073$ ($p<0.01-0.02$). Корреляций с относительными показателями мощности не было обнаружено.

Эти данные говорят о необходимости учета не только массы исследуемого, но и показателей длины конечностей, которые, при прочих равных условиях могут влиять на показатели мощности у спортсменов. Влияние длины плеч и предплечий на демонстрируемую мощность, по всей видимости реализуется через большую скорость оборотов ручки эргометра у атлетов, более длинными конечностями. Данные влияния могут существенно исказить показатели мощности мышц плечевого пояса, в частности у детей подросткового возраста, биологическая зрелость которых, а соответственно и длина тела в целом, при одинаковом паспортном возрасте будет различной.

1. Popadic Gacesa, Jelena Z; Barak, Otto F; Grujic, Nikola G. Maximal Anaerobic Power Test in Athletes of Different Sport Disciplines. Journal of Strength and Conditioning Research 23(3):p 751-755, May 2009. | DOI: 10.1519/JSC.0b013e3181a07a9a

Влияние вязкости среды на возникновение открытых состояний в молекуле ДНК

Дорохова А.А.^{1,2*}, Дроботенко М.И.², Свидлов А.А.^{1,2}, Джимаков С.С.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук";

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кубанский государственный университет";
013194@mail.ru

Стабильность молекулы ДНК обеспечивается за счет рассеивания тепловой энергии, обусловленного двумя основными факторами:

1. Возникновение открытых состояний и пузырьков денатурации.

Известно, что открытые состояния (ОС) необходимы для реализации процессов транскрипции и репликации, но их роль в рассеивании энергии механических движений также важна.

2. Другим фактором, позволяющим рассеивать энергию механических движений молекулы ДНК, является взаимодействие с окружающей водной средой.

Отмеченные факторы 1 и 2 связаны с механическими деформациями ДНК, поэтому для количественного анализа их влияния на динамику молекулы ДНК необходимо использовать механические модели ДНК. Моделирование механических деформаций ДНК является мощным исследовательским методом для описания ее нелинейной динамики.

В нашей работе методом математического моделирования механических деформаций ДНК исследуется влияние вязкости внешней среды на ее внутреннюю динамику и стабильность. Ранее [1] были проведены исследования для малых значений внешних силовых воздействий, которые не приводили к возникновению открытых состояний (ОС). В данной работе рассматриваются силовые воздействия, приводящие к их появлению.

Математическая модель угловых движений азотистых оснований опирается на аналогию между молекулой ДНК и механической системой, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников. При этом вращающимся маятникам соответствуют азотистые основания, а упругой нити, к которой прикреплены эти маятники, - сахаро-фосфатные цепочки молекулы ДНК; водородной связи пары комплементарных азотистых оснований соответствует упругая связь соответствующей пары маятников [2-4]. Исследования проводились на примере гена, кодирующего интерферон alpha 17 [5].

Численные исследования, проведенные в нашей работе, показывают, что возникновение и динамика ОС в молекуле ДНК зависит не только от величины внешнего воздействия (в нашем случае это торсионный момент), но и в значительной степени от вязкости окружающей среды.

Установлено, что динамика зон ОС может иметь скачкообразный характер при малом изменении величины торсионного момента.

При воздействии торсионного момента на все 980 пар оснований гена интерферона альфа 17 наблюдается следующий эффект: увеличение вязкости среды приводит к увеличению значения торсионного момента, необходимого для возникновения ОС и расплетения ДНК, т.е. вязкость играет важную стабилизирующую роль в динамике ДНК.

Известно, что внешнее воздействие на молекулу ДНК, как правило, имеет локальный характер, поэтому в работе было проведено исследование влияния локализованного торсионного момента на различные (по содержанию А-Т и Г-С пар, а также по расположению) участки гена интерферона альфа 17. Обнаружено, что при локализованном воздействии величина внешнего торсионного момента, необходимого для возникновения ОС при всех расчетных значениях вязкости зависит от нуклеотидного состава.

При воздействии торсионного момента на участки, близкие к границам гена, наблюдается четкая зависимость величины торсионного момента, необходимого для возникновения ОС, от вязкости. При этом значимость конечного эффекта, ослабляющего ДНК, снижалась с увеличением вязкости среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - кандидатов наук проект МК-2366.2022.1.4 и государственного задания ЮНЦ РАН № 122020100351-9.

1. Svidlov A., Drobotenko M., Basov A., Gerasimenko E., Elkina A., Baryshev M., Nechipurenko Y., Dzhimak S. Influence of Environmental Parameters on the Stability of the DNA Molecule // Entropy. 2021. Vol. 23(11). P. 1446. <https://doi.org/10.3390/e23111446>

2. Yakushevich L.V. Nonlinear Physics of DNA; JohnWiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2007; 252p.

3. Svidlov A., Drobotenko M., Basov A., Gerasimenko E., Malyshko V., Elkina A., Baryshev M., Dzhimak S. DNA dynamics under periodic force effects // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol.22. №15. P. 7873. <https://doi.org/10.3390/ijms22157873>;

4. Dzhimak S., Svidlov A., Elkina A., Gerasimenko E., Baryshev M., Drobotenko M. Genesis of Open States Zones in a DNA Molecule Depends on the Localization and Value of the Torque // International Journal of Molecular Sciences. 2022; 23(8):4428. <https://doi.org/10.3390/ijms23084428>

5. Basov A, Drobotenko M, Svidlov A, Bezhenar M, Gerasimenko E, Moiseev A, Malyshko V, Dorohova A, Drozdov A, Baryshev M, Dzhimak S. Influence of Single Deuterium Replacement on Frequency of Hydrogen Bond Dissociation in IFNA17 under the Highest Critical Energy Range // International Journal of Molecular Sciences. 2022; 23(24):15487. <https://doi.org/10.3390/ijms232415487>

Влияние изменения уровня эстрадиола на сократительную функцию кардиомиоцитов предсердий и желудочков

Мячина Т.А.^{1*}, Бутова К.А.¹, Симонова Р.А.¹, Кочурова А.М.¹, Копылова Г.В.¹, Щепкин Д.В.¹, Хохлова А.Д.^{1,2}

¹Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук;

²УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина;

myachina.93@mail.ru

Эстрадиол – основной и наиболее активный гормон из группы эстрогенов, вырабатывающийся в яичниках, коре надпочечников, периферических тканях. Баланс эстрадиола играет важную роль в регуляции структуры и сократимости миокарда. Повышенный уровень эстрадиола является причиной развития аритмий. Его дефицит во время менопаузы связан с более высоким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний по сравнению с женщинами в пременопаузе. Известно, что эстрадиол оказывает существенное влияние на регуляцию сократительной функции желудочков [1], но его влияние на механическую функцию предсердий до сих пор плохо изучено.

Работа направлена на изучение влияния повышенного и пониженного уровней β-эстрадиола на сократительную способность миокарда предсердий и желудочков на клеточном и молекулярном уровнях их организации.

Эксперименты выполнены на самках крыс линии Вистар возрастом 23-24 недели в соответствии с Директивой 2010/63/EU. Для оценки дефицита эстрадиола проводили операцию по удалению яичников (группа OVX). Контрольная группа (Sham) была подвергнута ложному оперированию. Через 6 недель после операции одиночные клетки миокарда из левого желудочка (ЛЖ) и левого предсердия (ЛП) были получены методом ретроградной перфузии изолированного сердца по Лангендорфу с модификациями [2].

Для анализа влияния повышенного уровня 17β-эстрадиола на функциональные характеристики кардиомиоцитов и сократительных белков суспензии кардиомиоцитов предсердий и желудочков

инкубировались с 10 нМ 17β-эстрадиола (Sigma-Aldrich, США) в растворе Тирод в течение 10 минут. Дальнейшие измерения выполняли в течение 5 минут после окончания инкубации при 36 ± 1°C и частоте электрической стимуляции 1 Гц.

Изменения концентрации цитозольного Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) и динамики укорочений саркомеров регистрировали при помощи системы лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (LSM 710, Carl Zeiss). Для регистрации [Ca²⁺]_i использовали Ca²⁺-чувствительный флуорофор Fluo 8-AM (AAT Bioquest, Inc., США).

Для анализа актин-миозинового взаимодействия миозин выделялся из суспензии кардиомиоцитов после их инкубации с 17β-эстрадиолом или из миокарда ЛЖ и ПП групп OVX и Sham. Далее регистрировали скорость скольжения тонких филаментов, реконструированных из актина, тропонина и тропомиозина, по миозину в *in vitro* подвижной системе. Степень фосфорилирования сократительных и регуляторных белков определяли в экстракте саркомерных белков, полученном из суспензии кардиомиоцитов, гель-электрофорезом с окрашиванием Pro-Q Diamond и SYPRO Ruby (Thermo Fisher Scientific, США) [3].

В группе Sham значения конечно-диастолической длины саркомеров (КДДС) и укорочения саркомера были выше для кардиомиоцитов ЛЖ, а амплитуда изменения [Ca²⁺]_i – ниже по сравнению с кардиомиоцитами ЛП. Временные характеристики укорочения саркомеров и время спада [Ca²⁺]_i были меньше для кардиомиоцитов ЛП по сравнению с ЛЖ. При OVX КДДС и амплитуда укорочения саркомеров достоверно увеличились в ЛП, но не изменились в ЛЖ по сравнению с группой Sham. У животных с OVX значительно увеличивалась амплитуда [Ca²⁺]_i в клетках ЛЖ. Дефицит эстрадиола приводил к снижению времени достижения максимума укорочения (ВДМ) и времени достижения 50% расслабления (ВДР50) для кардиомиоцитов ЛЖ, но не для кардиомиоцитов ЛП. После OVX в миокарде отмечалось увеличение экспрессии альфа-тяжелой цепи миозина. В ЛЖ и ЛП по-разному изменилась степень фосфорилирования белков толстой и тонкой нитей. Мы полагаем, что увеличение кинетики поперечного мостика в миокарде ЛП может способствовать сохраненной сократительной функции кардиомиоцитов ЛП при OVX. При этом нарушение сократительной функции кардиомиоцитов ЛЖ после OVX можно объяснить снижением Ca²⁺-чувствительности тонкого филамента.

При исследовании влияния высоких концентраций 17 β-эстрадиола на суспензию кардиомиоцитов отмечалось уменьшение амплитуды укорочений саркомеров и увеличение амплитуды изменения [Ca²⁺]_i в миоцитах желудочков. Инкубация с 17β-эстрадиолом не оказала значительного влияния на КДДС или временные параметра сокращения-расслабления саркомеров кардиомиоцитов предсердий или желудочков, однако отмечалось увеличение времени достижения пика [Ca²⁺]_i в кардиомиоцитах предсердий. Анализ фосфорилирования белков саркомера позволил предположить, что уменьшение амплитуды сокращений саркомеров кардиомиоцитов желудочков может быть связано с уменьшением степени фосфорилирования сердечного миозин-связывающего белка С.

Таким образом, как дефицит 17 β-эстрадиола, так и прямое действие высоких концентраций оказывают наибольшее воздействие на сократительную функцию кардиомиоцитов желудочков по сравнению с кардиомиоцитами предсердий.

Эксперименты выполнены на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН при поддержке гранта РНФ № 22-75-10134.

1. Bell J. R., Mellor K. M., Wollermann A. C., Ip W. T., Reichelt M. E., Meachem S. J., Simpson E. R., Delbridge L. M. Aromatase deficiency confers paradoxical postischemic cardioprotection // *Endocrinology*. 2011. V. 152, № 12. P. 4937–47.

2. Butova, X. A., Myachina, T. A. and Khokhlova, A. D. A combined Langendorff-injection technique for simultaneous isolation of single cardiomyocytes from atria and ventricles of the rat heart // *MethodsX*. 2021.

3. Khokhlova A, Myachina T, Volzhaninov D, Butova X, Kochurova A, Berg V, Gette I, Moroz G, Klinova S, Minigalieva I, Solovyova O, Danilova I, Sokolova K, Kopylova G, Shchepkin D. Type 1 Diabetes Impairs Cardiomyocyte Contractility in the Left and Right Ventricular Free Walls but Preserves It in the Interventricular Septum // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. V. 23, № 3, 1719.

Изучение структуры агрегатов титина скелетных и гладких мышц *in vitro*

Урюпина Т.А.^{1*}, Бобылёв А.Г.¹, Бобылёва Л.Г.¹, Вихлянцев И.М.¹

¹ИТЭБ РАН;

bobylev1982@gmail.com

Агрегация белков является достаточно распространённым процессом в клетках живых организмов. Известно, что нативный белок вследствие разных причин может изменять свою нативную конформацию и образовывать нефункциональные агрегаты. При агрегации происходят изменения в структуре белка, а также

происходит процесс перераспределения связей из внутримолекулярных на межмолекулярные. Объектом нашего исследования является гигантский мышечный белок титин (тайтин/коннектин), открытый в конце 70-х гг. прошлого века. К настоящему времени показано, что альтернативный сплайсинг гена титина (ttn) приводит к образованию разных по длине изоформ этого белка с м.м. ~2000–3900 кДа в поперечнополосатых мышцах животных; в гладких мышцах позвоночных обнаружены изоформы титина с молекулярной массой 500–2000 кДа.

Исследования *in vitro*, проведённые нами на препаратах титина изолированных из гладких (м.м. 500 и 1500 кДа) и скелетных (м.м. 2000–2200 кДа) мышц, выявили способность разных изоформ этого белка формировать олигомеры и агрегаты. В частности, по данным электронной и атомно силовой микроскопии все исследуемые изоформы титина формировали аморфные агрегаты в условиях 0.15 М Глицин–КОН, pH 7.0–7.5. Скелетномышечная изоформа титина также формировала пучки линейных фибрилл в растворе 0.1 М KCl, 10 mM имидазол, pH 7.0. Агрегаты титина связывались с красителем тиюфлавином Т, что указывает на их амилоидную природу. Методом рентгеновской дифракции у агрегатов титина обнаружены рефлексы ~10 Å и ~4.8 Å, что указывает на наличие четвертичной кросс β-структуры свойственной всем амилоидным фибриллам. Поэтому, агрегаты разных изоформ титина можно назвать амилоидными. Отличительной особенностью амилоидной агрегации титина является отсутствие изменений во вторичной структуре белка в процессе агрегации, что выявлено методами кругового дихроизма и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье. Полученные результаты свидетельствуют о незначительных изменениях в структуре титина при формировании этим белком амилоидных агрегатов.

Результаты наших исследований расширяют представления об особенностях процесса амилоидной агрегации разных белков и структуры амилоидных агрегатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (№ 22-24-00805).

Комбинация разномасштабных методов для исследования биомеханических свойств трёхмерных клеточных конструкций

Ефремов Ю.М.^{1*}, Преснякова В.П.¹, Зурина И.М.¹, Котенева П.И.¹, Кошелева Н.В.¹, Тимашев П.С.¹

¹*Институт регенеративной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) ;
yu.efremov@gmail.com*

Трёхмерные многоклеточные конструкции, полученные *in vitro*, можно рассматривать как промежуточный уровень организации между отдельными клетками и сложными тканевыми структурами, представленными *in vivo*. Многоклеточные структуры всё чаще используются как для фундаментальных исследований, так и для практических приложений [1, 2]. Так, клеточные пласты являются многослойными плоскими, а сфероиды – сферическими самоорганизующимися многоклеточными структурами и простейшими моделями клеточных агрегатов, которые обладают развитыми межклеточными взаимодействиями и паракринной передачей сигналов, а также частично воссоздают структурную сложность нативных тканей, содержащих внеклеточный матрикс (ВКМ). И сфероиды, и клеточные пласты могут использоваться в тканевой инженерии в качестве бескаффолдных конструкций, материала для биопечати, или в сочетании с различными скаффолдами [1, 2].

Многие предыдущие исследования были сконцентрированы на биологии многоклеточных структур, однако, очень мало данных доступно об их механических свойствах [3]. Понимание механического поведения таких структур является необходимым шагом для установления фундаментальных принципов тканевой биомеханики, тесно связанных с механизмами образования новых тканей, регенерации и развития патологий. Механические взаимодействия влияют на формирование клеточных агрегатов, процессы их перестройки и слияния, а также на жизнеспособность и функционирование отдельных клеток в их составе. Настройка механических свойств является многообещающим путем для управления данными процессами.

Одним из доступных методов изучения механических свойств клеток и ВКМ является атомно-силовая микроскопия (АСМ) [4], которая позволяет оценивать локальные вязкоупругие свойства материалов на наноразмерном масштабе. Однако, метод АСМ ограничен поверхностным слоем клеток, тогда как оценка вклада элементов ВКМ в механику сформировавшихся клеточных конструкций требует методов с большей степенью деформации материала. К таким макроскопическим методам относятся сдавливание или растяжение конструкта как целого. Объединение данных, полученных разномасштабными методами, требует применения определенных механических моделей, способных описать биомеханическое поведение конструкций на разных масштабах.

В данной работе использовали линии фибробластов мыши и крысы, а также мезенхимальные стромальные и эпителиальные клетки человека. С помощью одновременного наблюдения за морфологией и механикой на уровне единичных клеток и многоклеточных конструкций с помощью АСМ, были получены данные, свидетельствующие о релаксации напряжений в цитоскелете в процессе открепления клеток от субстрата и

формирования пласта. Был также применен метод микроиндентации, показавший, что роль ВКМ может расти с увеличением времени культивирования клеточного пласта.

Для изучения сфероидов, помимо АСМ, был применен метод сжатия между пластинами. Сравнение данных двух этих методов позволило установить эффективное поверхностное натяжение сфероида, а также роль ВКМ при макроскопической деформации. Для описания биомеханики сфероидов были использованы механические модели упругого тела с поверхностным натяжением, вязкоупругого и порозластичного тел, чья комбинация позволила описать разницу в механическом поведении сфероидов из двух различных типов клеток, мезенхимальных и эпителиальных. Сфероиды из мезенхимальных клеток имели большее поверхностное натяжение и более плотную укладку ВКМ во внутренней части, что проявлялось в более высокой жесткости поверхности по данным АСМ и больших временах релаксации при сжатии между пластинами [5]. Полученные результаты будут способствовать более детальному описанию биомеханики клеточных пластов, сфероидов и тканей, а также могут найти применение в моделировании процессов формирования клеточных пластов, слияния сфероидов и для управления их механическими свойствами.

Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ 21-15-00349.

Литература

1. I.M. Zurina, V.S. Presniakova, D. V. Butnaru, A.A. Svistunov, P.S. Timashev, Y.A. Rochev, Tissue engineering using a combined cell sheet technology and scaffolding approach, *Acta Biomater.* 113 (2020) 63–83.
2. X. Cui, Y. Hartanto, H. Zhang, Advances in multicellular spheroids formation, *J. R. Soc. Interface.* 14 (2017) 20160877.
3. Y.M. Efremov, I.M. Zurina, V.S. Presniakova, N. V. Kosheleva, D. V. Butnaru, A.A. Svistunov, Y.A. Rochev, P.S. Timashev, Mechanical properties of cell sheets and spheroids: the link between single cells and complex tissues, *Biophys. Rev.* 13 (2021) 541–561.
4. P.K. Viji Babu, C. Rianna, U. Mirastschijski, M. Radmacher, Nano-mechanical mapping of interdependent cell and ECM mechanics by AFM force spectroscopy, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–19.
5. Kosheleva, N. V., Efremov, Y. M., Koteneva, P. I., Ilina, I. V., Zurina, I. M., Bikmulina, P. Y., ... & Timashev, P. S. (2022). Building a tissue: Mesenchymal and epithelial cell spheroids mechanical properties at micro-and nanoscale. *Acta Biomaterialia*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.09.051>

Математическая модель управления глазным яблоком, реализуемого глазодвигательными мышцами

Миняйло Я.Ю.¹, Кручинина А.П.^{1*}
¹Москва, МГУ имени М.В.Ломоносова;
a.kruch@moids.ru

Аннотация.

В работе представлен алгоритм восстановления моментов сил шести глазодвигательных мышц по окулографической информации. Вычисления проведены на основе построения геометрической трехмерной модели каждой мышцы в отдельности исходя из данных о координатах начала мышцы и точки крепления мышцы к глазу. Проведенные расчеты применены для построения математической модели вестибулоокулярного рефлекса.

Введение

Вращение глазного яблока обеспечивают шесть глазодвигательных мышц: латеральная, медиальная, верхняя и нижняя прямые, верхняя и нижняя косые. Латеральная и медиальная мышцы обеспечивают вращение глаза в горизонтальной плоскости. Оставшиеся четыре мышцы работают в парах прямая плюс косая. Нижняя прямая и верхняя косая обеспечивают вращение глазного яблока вниз, а верхняя прямая и нижняя косая — вверх. Кроме того, косые мышцы отвечают за торсионные вращения глаза. Комбинированное сокращение глазодвигательных мышц реализует поворот глазного яблока в нужном направлении.

Описание и анализ движений глаз важная задача для многих исследований. Современные технологии позволяют с высокой точностью отслеживать движения глаз. Чаще всего для этого используются видеоокулографы или электроокулографы. Однако, с помощью этого оборудования регистрируется лишь результат: в каком направлении и на сколько градусов повернулось глазное яблоко. Открытым и важным остается другой вопрос: какие глазодвигательные мышцы обеспечили наблюдаемое движение.

Цель данной работы в построении математического алгоритма для описания управления глазным яблоком, реализуемого глазодвигательными мышцами. К полученной оценке уже могут применяться сравнения с вестибулярной информацией, зрительными задачами. В частности подобная модель полезна для замыкания математического описания вестибуло-окулярного рефлекса.

Методы

Глаз и глазодвигательные мышцы представляют из себя механическую систему. Для того, чтобы построить математическую модель глазодвигательного аппарата мы ввели ряд упрощений:

- глазное яблоко — абсолютно твердое тело, идеальный шар с радиусом $R = 12.43$ мм;
- центр вращения глаза совпадает с его геометрическим центром и остаётся неподвижной точкой при любых движениях глазного яблока;
- глазодвигательные мышцы представлены упругими нитями, которые могут активно сокращаться.

В такой постановке задача заключается в описании вращений шара с неподвижным центром, в результате приложения касательных сил к его поверхности. Для задания вращений удобнее всего использовать ось вращения и угол поворота.

Для глаза точка приложения силы — это точка касания направляющего вектора силы мышцы и поверхности глазного яблока, направленного вдоль волокон мышцы в сторону её крепления. Так как в упрощении мышцы представлены нитями, вектор силы направлен вдоль мышцы. Радиус-вектор направлен из начала системы координат, связанной с глазом к точке касания. Векторное произведение вектора силы на радиус-вектор даёт вектор момента силы, который направлен вдоль оси вращения тела. Следовательно, единичный вектор момента силы совпадает с единичным вектором, задающим ось вращения. Тогда, зная радиус-вектор точки касания и направляющий вектор силы для каждой мышцы, мы можем вычислить момент силы этой мышцы и ось вращения, которую она обеспечивает. В данной задаче применим принцип суперпозиции.

В основу расчета моментов легли геометрические параметры глазодвигательных мышц, представленные в работе [1]. Для каждой мышцы заданы координаты (x, y, z) начал и координаты крепления к главному яблоку, относительно начала координат, расположенного в неподвижном геометрическом центре сферы.

Для каждой мышцы мы в отдельности решено три подзадачи:

- 1) вычисление координат единичного радиус-вектора;
- 2) вычисление координат единичного вектора силы;
- 3) вычисление вектора момента силы мышцы.

Для апробации модели была проведена серия экспериментов с вращением испытуемых в трёх плоскостях, соответствующих функциональным парам полукружных каналов. Вращения проводились на специализированных креслах-центрифугах по синусоидальному закону. Во время вращений регистрировался вектор угловой скорости головы и ответные движения глаз. Поле зрения испытуемых при этом было перекрыто, чтобы минимизировать влияние визуальной информации на движения глаз. Таким образом, в проведённых экспериментах в управлении глазом участвовала преимущественно вестибулярная информация.

Из работы [2] известно, что каждый полукружный канал активирует строго одну глазодвигательную мышцу каждого глаза. В таком случае, чем больше проекция углового ускорения головы на ось чувствительности канала, тем больший вклад вносит соответствующая ему мышца в движение глазного яблока. Из экспериментальных данных мы можем оценить проекцию угловой скорости на полукружные каналы и сформировать управление глазодвигательными мышцами, а затем результирующую ось вращения глаза найти как линейную комбинацию осей активированных мышц. Вычисляя ось вращения в каждый момент времени записи мы можем смоделировать движение глазного яблока и сравнить его с записью глаз из эксперимента.

Результаты.

Для шести глазодвигательных мышц получены координаты единичных векторов моментов сил, они же направляющие вектора осей вращения. Предложена модель управления глазным яблоком в виде линейной комбинации осей вращения активированных глазодвигательных мышц. Применение модели для описания вестибулоокулярного рефлекса позволяет достоверно оценить линейную компоненту на медленных фазах нистагма и восстанавливать коэффициенты степени активации мышц. Коэффициент активации каждой мышцы полагается равным проекции нормированного единичного вектора угловой скорости головы на канал, активирующий данную мышцу.

Литература

- [1] Hongmei Guo, Zhipeng Gao, Weiyi Chen The biomechanical significance of pulley on binocular vision // BioMedical Engineering OnLine 2016
- [2] Szhenagothai J. - Das Rolle Der Einzelnen Labyrinthrezeptoren Bei Der Orientation Von Augen Un Kopf Im Raume. // Academiai Kiado, Budapest,—1952

Методика получения и анализа функциональных особенностей кардиомиоцитов миокарда легочных вен

Симонова Р.А.^{1*}, Бутова К.А.¹, Мячина Т.А.¹, Копылова Г.В.¹, Хохлова А.Д.^{1,2}, Щепкин Д.В.¹

¹Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук;

²Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина;
raisa.simonova@mail.ru

Известно, что кардиомиоциты легочных вен могут проявлять спонтанную активность и быть источником эктопической и триггерной активности. В связи с этим изучение функции миокарда легочных вен играет важную роль в понимании развития фибрилляции предсердий. Кардиомиоциты легочных вен пронизывают толщу сосудов, и экстракардиальный миокард отличается по функциональным характеристикам от миокарда предсердий и желудочков [1]. В основном изучаются электрофизиологические особенности кардиомиоцитов легочных вен в сравнении с кардиомиоцитами левого предсердия [2]. Цель исследования заключалась в оптимизации методики выделения механически активных одиночных кардиомиоцитов легочных вен и анализе характеристик сокращения их саркомеров.

Манипуляции выполнены на морских свинках в соответствии с международными правилами обращения с лабораторными животными (Директива 2010/63/EU) и одобрены этическим комитетом ИИФ УрО РАН.

Одиночные кардиомиоциты получали методом ретроградной перфузии сердца по Лангендорфу с модификациями [3]. Перед выделением одиночных кардиомиоцитов животным вводилась внутримышечно инъекция гепарина натрия (5000 МЕ/кг) для предотвращения развития тромбоза коронарных артерий. После эвтаназии сердце в открытой грудной клетке промывалось охлаждённым (15-16°C) раствором Solution A, затем помещалось на установку Лангендорфа, где подвергалось ретроградной перфузии (4.0–4.5 мл/мин) последовательной сменой трёх растворов при 35°C. На первом этапе сердце в течение 5 минут промывалось содержащим гепарин натрия раствором Solution A для очищения коронарных сосудов от крови и стабилизации сердечных сокращений в *in vitro* условиях. Далее для снижения возбудимости и ингибирования сократительной функции сердце перфузировалось раствором с высоким содержанием K⁺ и низким содержанием Ca²⁺ в течение 10 минут с момента полной остановки сокращений. Для успешной изоляции одиночных кардиомиоцитов из миокардиальных «рукавов» легочных вен был осуществлен подбор оптимального времени перфузии и концентраций ферментов. Межклеточный каркас ферментативно расщеплялся коллагеназой II (0.5 мг/мл, Worthington, США) и протеазой XIV (0.05 мг/мл, Sigma-Aldrich, США). При достижении признаков промежуточного расщепления межклеточного каркаса в виде прогрессирующей бледности эпикардиальной поверхности сердца и появления вязких капель, ретроградная перфузия прекращалась. Предсердия и миокард легочных вен подвергались дополнительным инъекциям раствором с высоким содержанием коллагеназы (0.5 мг/мл, 6–7 мл/мин) в течение 20 минут, после чего процедура получения клеток была аналогична описанной [3]. Готовая суспензия изолированных миоцитов хранилась в HEPES-содержащем буфере Тирод при 22–24 °C и использовалась в течение 6-8 часов.

Измерения сократительной функции изолированных кардиомиоцитов были выполнены при 35-37°C и частоте электрической стимуляции 1 Гц на специализированном оборудовании (IonOptix Corporation, USA). Показано, что амплитудные и временные характеристики сокращения саркомеров кардиомиоцитов легочных вен отличаются от характеристик сокращения кардиомиоцитов левого предсердия.

В результате работы оптимизирована методика выделения механически активных одиночных кардиомиоцитов из миокардиальных «рукавов» легочных вен сердца морских свинок и получены первые данные о характеристиках сокращения кардиомиоцитов экстракардиального миокарда.

Эксперименты выполнены на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН при поддержке гранта РНФ № 23-24-00356.

1. Takahara A, Hagiwara M, Namekata I, Tanaka H. Pulmonary vein myocardium as a possible pharmacological target for the treatment of atrial fibrillation. J Pharmacol Sci. 2014;126(1):1-7.

2. Potekhina VM, Averina OA, Razumov AA, Kuzmin VS, Rozenshtaukh LV. The local repolarization heterogeneity in the murine pulmonary veins myocardium contributes to the spatial distribution of the adrenergically induced ectopic foci. J Physiol Sci. 2019;69(6):1041- 1055.

3. Butova, X. A., Myachina, T. A. and Khokhlova, A. D. A combined Langendorff-injection technique for simultaneous isolation of single cardiomyocytes from atria and ventricles of the rat heart // MethodsX. 2021.

Механические и сигнальные ответы функционально-разгруженной *m. soleus* крысы в ответ на хроническое повышение активности β -миозина

Сергеева К.В.^{2*}, Никитина Л.В.¹, Тыганов С.А.², Зарипова К.А.², Шарло К.А.², Шенкман Б.С.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Иммунологии и Физиологии Уральского отделения Российской Академии Наук ИИФ УрО РАН;

²федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем Российской академии наук ГНЦ РФ-ИМБП РАН;

sergeeva_xenia@mail.ru

Известно, что при уменьшении механической активности скелетных мышц млекопитающих происходит их атрофия, при этом наиболее выраженные изменения наблюдаются в постуральной камбаловидной мышце [1, 2], содержащей преимущественно волокна медленной изоформы тяжелых цепей миозина типа I(β). Вместе с тем, в ряде работ было обнаружено наличие автономной нервно-мышечной активности мышц, регистрируемой через 3 суток функциональной разгрузки [3, 4]. В настоящей работе с помощью фармакологической потенциации спонтанной сократительной активности камбаловидной мышцы препаратом омекамтив мекарбил (ОМ) предполагалась активация анаболических сигнальных путей, приводящих к сохранению массы, силы и собственной жесткости мышцы на фоне антигравитационной разгрузки задних конечностей крыс. ОМ является селективным активатором медленного β -миозина. Локализуясь вблизи границы раздела нескольких ключевых консервативных структурных элементов миозина, ОМ стабилизирует плечо рычага в активированном положении, предваряющем рабочий ход, увеличивая число миозиновых головок, способных связаться с актиновой нитью [5]. Такой кинетический эффект, в свою очередь, способствует ускоренному высвобождению фосфата и ингибирует вращение плеча рычага, продлевая время, которое миозин проводит в сильносвязанном с актином состоянии [5, 6, 8]. Для достижения поставленной цели в эксперименте были использованы животные следующих экспериментальных групп: группа виварного контроля (С); группа виварного контроля с введением ОМ в течение 10 суток (С+ОМ); группа, подвергнутая разгрузке задних конечностей на протяжении 14 дней (Н); и группа разгрузки, совмещенная с введением ОМ с 4 дня вывешивания (Н+ОМ) (после появления спонтанной электромиографической активности).

Нами обнаружено, что инъекции препарата ОМ сохранили скорость синтеза белка на уровне контрольных значений, иллюстрируемой частичным предотвращением атрофии волокон скелетных мышц как быстрого, так и медленного типа. Данный эффект является, по-видимому, отражением положительного влияния препарата на показатели трансляционной эффективности мРНК (скорость синтеза белка в расчете на одну рибосому). В группе Н+ОМ наблюдалась инактивация GSK-3 β и последующее дефосфорилирование ее мишени фактора инициации eIF2B- ϵ , активация сигнальных белков p90RSK, p70S6K, а также более высокое содержание IRS-1 по сравнению с группой вывешивания без введения препарата. Кроме того, обнаружено предотвращение снижения силы и собственной жесткости камбаловидной мышцы крысы, изолированной после двух недель экспозиции в условиях безопорности. Между тем, применение препарата не предотвратило активацию протеолиза: в частности, значимое увеличение экспрессии убиквитинлигазы MuRF-1, убиквитина и кальпаина произошло в обеих группах с вывешиванием задних конечностей, а также не оказывало влияния на маркеры трансляционной ёмкости (45S пре-рРНК, 18S рРНК и 28S рРНК). Таким образом, химически-индуцированное увеличение мощности и продолжительности сокращений камбаловидной мышцы на фоне разгрузки создает предпосылки для синтеза белка. При этом, следует полагать, что применение ОМ целесообразно с фармакологическими препаратами, ингибирующими экспрессию убиквитинлигаз.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта №22-25-00602

1. Ohira Y., Yoshigana T., Nomura T., Kawano F., Ishihara A. Nonaka I., Roy R.R., Edgerton V.R. Gravitational unloading effects on muscle fiber size, phenotype and myonuclear number // Adv Space Res. 2002. Vol. 30(4). P. 777-781.

2. Fitts R.H., Riley D.R., Widrick J.J. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity // J Exp Biol. 2001. Vol. 204(Pt 18). P. 3201-3208.

3. Alford E.K., Roy R.R., Hodgson J.A., Edgerton V.R. Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius, and tibialis anterior during hind limb suspension // Exp. Neurol. 1987. Vol. 96. P. 635-649

4. Kawano F., Nomura T., Ishihara A. et al. Afferent input-associated reduction of muscle activity in microgravity environment // Neurosci. 2002. Vol. 114. P. 1133-1138.

5. Planelles-Herrero V. J., Hartman J.J., Robert-Paganin J., Malik F.I., Houdusse A. Mechanistic and structural basis for activation of cardiac myosin force production by omeamtiv mecarbil // Nat. Commun. 2017. Vol. 8(1): 190.

6. Rohde J.A., Thomas D.D., Muretta J.M. Heart failure drug changes the mechanoenzymology of the cardiac myosin powerstroke // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2017. Vol. 114(10). P. 1796-1804.

7. Winkelmann D.A., Forgacs E., Miller M.T., Stock A.M. Structural basis for drug-induced allosteric changes to human β -cardiac myosin motor activity // Nat. Commun. 2015. Vol. 6: 7974.

Модуляция активности АМРК влияет на экспрессию маркеров апоптоза в дифференцирующихся миобластах, выделенных из атрофированных скелетных мышц

Мирзоев Т.^{1*}, Рожков С.¹, Туртикова О.¹, Шенкман Б.¹, Вильчинская Н.¹

¹*Институт медико-биологических проблем РАН;*

tmirzoev@yandex.ru

Различные экологические и патофизиологические стимулы могут вызывать значительную атрофию скелетных мышц у млекопитающих и человека. Восстановление атрофированных мышечных волокон зависит от стволовых (сателлитных) клеток (СК), которые располагаются за пределами сарколеммы. Было показано, что мышечная атрофия, вызванная гипокинезией, приводит к дефициту СК у грызунов и ухудшению процесса регенерации мышечной ткани. Также известно, что мышечная атрофия, вызванная денервацией, может повышать восприимчивость СК к апоптозу. Поскольку мы недавно обнаружили снижение активности АМФ-активируемой протеинкиназы (АМРК) во время «аномально ускоренной» дифференцировки первичных миобластов, полученных из атрофированной камбаловидной мышцы крысы, мы предположили, что может существовать потенциальная связь между активностью АМРК и восприимчивостью дифференцирующихся миобластов к апоптозу. Следовательно, цель исследования состояла в оценке влияния активации АМРК на экспрессию маркеров апоптоза в дифференцирующихся миобластах, полученных из атрофированной камбаловидной мышцы крысы.

Все экспериментальные процедуры были одобрены Комитетом по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН. Тридцать самцов крыс линии Wistar массой 190-210 г были случайным образом распределены на следующие 2 группы: контрольную (С, n=10) и группу животных, которые подверглись 7-суточному вывешиванию задних конечностей (модель атрофии мышц задних конечностей) (НС, n=20). Камбаловидные мышцы контрольных и вывешенных крыс и крыс после НС были хирургически выделены из обеих задних конечностей с использованием стандарт методов препарирования и использованы для выделения пула СК. Эвтаназия животных осуществлялась методом декапитации под изофлурановым наркозом. Миобласты, полученные из камбаловидных мышц вывешенных крыс (НС), были разделены на две части: клетки, которые инкубировались с АICAR (активатор АМРК), и клетки, которые не подвергались действию АICAR. Первичные миобласты, выделенные из камбаловидных мышц контрольных крыс, не обрабатывались АICAR. Уровень фосфорилирования АМРК и ацетил-КоА-карбоксилазы (ACC) оценивали методом Вестерн-блоттинга. Экспрессию мРНК маркеров апоптоза оценивали методом ОТ-ПЦР.

В дифференцирующихся миобластах, полученных из атрофированной камбаловидной мышцы, наблюдалось значительное снижение ($p < 0,05$) фосфорилирования АМРК (Thr172) и ACC (Ser79) по сравнению с контрольными клетками. Это снижение активности АМРК сопровождалось значительным повышением уровня проапоптотических маркеров (каспазы-9, BAX, p53) и понижением уровня экспрессии антиапоптотического белка BCL-2. Инкубация «атрофических» мышечных миобластов с АICAR во время дифференцировки предотвращала снижение фосфорилирования АМРК и ACC. Более того, инкубация с АICAR предотвратило увеличение экспрессии каспазы-9, BAX, p53 и снижение экспрессии мРНК BCL-2.

Таким образом, поддержание активности АМРК с помощью АICAR подавляет повышенную экспрессию мРНК маркеров апоптоза в дифференцирующихся миобластах, полученных из атрофированной камбаловидной мышцы крысы. Исследование поддержано грантом РФФ № 20-75-10080.

Морфофункциональные показатели бадминтонистов с учетом анаэробных возможностей

Чершинцева Н.Н.^{1*}, Назаренко А.С.¹, Федянин А.О.¹, Зверев А.А.¹

¹*Поволжский государственный университет физической культуры спорта и туризма;*

chersinceva@mail.ru

Эффективность спортивной деятельности зависит от реализации в соревнованиях физических качеств силы, скорости, выносливости мышц или их совокупности. Проявление данных физических качеств зависит не только от степени совершенства управления нервно-мышечным аппаратом и вегетативными функциями со стороны ЦНС, но и от максимального использования мощности, емкости, эффективности того или иного механизма энергообеспечения мышечной деятельности [4].

Силловые способности характеризуются большим мышечным напряжением и проявляются в преодолевающем, уступающем и статическом режимах работы мышц. Они определяются физиологическим поперечником мышцы и функциональными возможностями нервно-мышечного аппарата [5].

Величина максимальной силы мышц зависит от многих анатомо-морфологических, нервных, гуморальных, биоэнергетических, биомеханических и других факторов. Показано, что сила мышцы прямо пропорциональна площади ее физиологического поперечника, т.е. чем толще мышца, тем она сильнее. Поэтому силловые возможности человека во многом зависят от его мышечной массы [3].

Сила мышц зависит также от их реактивности, эластических свойств мышечной ткани и вязкости, от структуры мышечных волокон, их морфо-функциональных свойств. Изучение топографии силы различных групп мышц помогает выявить роль различных показателей в развитии тренированности, формировании рациональной техники движений и достижении высоких результатов. Морфологический статус оказывает существенное влияние на проявление силы, скорости, выносливости, реактивности организма и его адаптацию к факторам внешней среды, а также является маркером тренированности [1]. У бадминтонистов показаны различные корреляционные связи отражающие взаиморегулирующее влияние, как в состоянии относительного покоя, так и после активной нагрузки [2].

Исследование с помощью Вингейт-теста было направлено на определение достаточно объективных показателей скоростно-силовых тестов, указывающие на фактическую индивидуальную анаэробную мощность, при максимальных энергозатратах за счет алактатного механизма. Дополнением к фиксации стандартных показателей эргометрии, проводился биоимпедансный анализ состава тела, который позволяет адекватно оценивать применяемые физические нагрузки и прогнозировать спортивные результаты.

Тестирование бадминтонистов 14-22 лет ($n=27$) проводили на ножном велоэргометре «Monark Ergonomic 894 E» и ручном велоэргометре «Monark Ergonomic 891 E». Вес, для ножного и ручного эргометра рассчитывался как 7,5% и 3,5% от массы тела спортсмена. У участников эксперимента отсутствовали медицинские противопоказания к нагрузочным тестированиям. Анализ состава тела проводился на Танита (Body Composition Analyzer MC 980). Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы SPSS 20 с критическим уровнем достоверности $p \leq 0,05$.

Уровень анаэробной производительности бадминтонистов является одним из ведущих показателей определяющий результативность спортсменов. Функциональные возможности как верхнего, так и нижнего пояса тела бадминтонистов изменяется в зависимости стадий тренировок, размера мышечных волокон человека и других факторов. В наших экспериментах пиковая мощность ног и рук составила 12,7 и 9,1 Вт/кг, время достижения максимальной мощности 1,8 и 1,5 сек, относительно средняя мощность 11,5 и 7,2 Вт/кг, а максимальная скорость составила 143,1 и 149,9 оборотов/мин.

Нами выявлены сильные корреляционные связи пиковой мощности, а так же времени достижения максимальной мощности ног с мышцами туловища, рук, ног, основным обменом веществ и содержанием воды в организме. В поясе свободной верхней конечности обнаружены сильные корреляционные связи с параметрами Танита только с временем достижения максимальной мощности.

Таким образом, в наших экспериментах были продемонстрированы сильные связи между различными морфофункциональными параметрами бадминтонистов, что можно будет учитывать при оценке тренированности спортсменов и улучшать показатели физической подготовки в разных этапах тренировочного процесса.

Список литературы

1. Абрамова, Т.Ф. Морфологические критерии – показатели пригодности, общей физической подготовленности и контроля текущей и долговременной адаптации к тренировочным нагрузкам: учебно-методическое пособие / Т. Ф. Абрамова, Т. М. Никитина, Н. И. Кочеткова. – М.: ТВТ Дивизион, 2010. – 104 с.
2. Назаренко, А.С. Статокинетическая устойчивость и электрокардиографические показатели сердца у юных бадминтонистов / А.С.Назаренко, Н.Н.Чершинцева, А.А.Зверев. - Современные вопросы биомедицины. – 2022. - т.6 (3).
3. Савосина, М.Н. С 12 Общая силовая подготовка для конькового хода в лыжных гонках: учебное пособие / М.Н. Савосина. – Нижнекамск: Нижнекамский химико-технологический институт (филиал) ФГБОУ ВПО «КНИТУ», 2012 – 74 с.
4. Семенов, Е.Н. Курс лекций, и их мультимедийное сопровождение, по общей физиологии: учебно-методическое пособие (для самостоятельной работы студентов институтов физической культуры). ВГИФК / Е.Н. Семенов, С.С. Артемьева. – Воронеж, 2010. – 200 с.
5. Семенов, Е.Н. Физиологические и педагогические основы совершенствования биоэнергетики мышечной деятельности / Е.Н. Семенов И.Н. Маслова// Материалы конференции медико-биологические и педагогические основы адаптации, спортивной деятельности и здорового образа жизни, Воронеж, 27 апреля 2016 г. 86-91 с.

О топологической структуре многоклеточных животных

Антонец В.А.^{1,2*}

¹*Институт прикладной физики РАН;*

²*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского;*

antonetsva@gmail.com

В докладе рассматривается влияние общеизвестных физических закономерностей движения атомов и небольших молекул на возникновение и формирование механизмов трофического обеспечения пластических и энергетических процессов у многоклеточных организмов.

По современным представлениям в ходе эволюции многоклеточные возникали и возвращались к одноклеточному существованию многократно. Редкие, промежуточные между одноклеточными и многоклеточными, формы жизни наблюдаются и сейчас.

При появлении многоклеточных механизм дыхания каждой из клеток остался диффузионным, каким и был у одноклеточных. Механизм питания изменился и стал диффузионным, так как встроенные в единый организм клетки не могут поглощать себе подобных, как это происходит у одноклеточных.

Однако энергетическое и пластическое обеспечение каждой из клеток макроскопического организма за счет прямого диффузионного всасывания веществ из окружающей среды через его внешнюю оболочку, невозможно по двум причинам.

Во-первых, время диффузионной доставки вещества на некоторое расстояние R пропорционально квадрату этого расстояния. Поэтому можно утверждать, что существует летальный размер, при котором всё необходимое для питания и дыхания просто не поступит вовремя во внутренние клетки макроскопического многоклеточного организма.

Во-вторых, при увеличении числа клеток гипотетического многоклеточного организма площадь его внешней поверхности увеличивается медленнее, чем его же объем. Число клеток в составе многоклеточного, объективно характеризует его потребность в веществах (пластическом обеспечении) и энергии. Площадь поверхности определяет предельные возможности диффузионной доставки веществ. И так как требования растут быстрее, чем возможности, то неизбежно возникает несовместимый с жизнью дефицит.

Наибольшая часть многоклеточных животных оказалась жизнеспособной перейдя к другому типу питания. Не являясь автотрофами, они стали консументами, употребляющими в пищу сопоставимые с ними по размеру фрагменты других многоклеточных – растений и животных, вплоть до поглощения добычи целиком.

Эта адаптация произошла за счет синхронного формирования в теле первых многоклеточных животных системы деструкции поглощенной пищи до молекулярного уровня (пищеварения), а также структур с развитыми поверхностями, занимающими малый физический объем, но обеспечивающими достаточную площадь контакта для:

- газообмена между организмом и окружающей средой,
- всасывания расщепленной до молекулярного уровня пищи,
- транспортировки к каждой из клеток тела окислителя и молекул пищи.

Для человека это легко узнаваемые легкие с альвеолами, тонкий кишечник с множеством всасывающих ворсинок и система кровообращения с сетью активных артериол и венул, соединяемыми капиллярами. Все три системы имеют фрактальный характер. Легкие и сосудистая сеть имеют ветвящуюся древообразную структуру со сросшимися «кронами», где и происходит кислородообмен. Внутренняя поверхность тонкого кишечника имеет щеткообразную структуру. Через ворсинку белки и углеводы поступают из химуса в венозную сеть, а жиры – в лимфатическую.

Кажется, говорить дальше – это ломится в открытые ворота. Однако вопрос о структуре и транспортной функции кровообращения остается не закрытым.

Следуя давней традиции, в учебниках и анатомических атласах систему кровообращения рассматривают как два контура (круга), обеспечивающих кислородообмен. При этом практически не обсуждается или обсуждается мельком транспорт молекул пищи. Соответственно этому подходу кровь делят на артериальную и венозную, т.е. насыщенную и не насыщенную кислородом.

Если же индексировать кровь и по насыщенности молекулами пищи, то тогда круги кровообращения смотрятся существенно иначе. Потребитель переносимого молекулярного питания остается тот же – клетки организма, а источником становится тонкий кишечник.

При этом, если вход кислорода и выброс углекислого газа сосредоточены в легких, то переход из химуса углеводов и белков в кровь, а жиров в лимфу происходит в тонком кишечнике. Это может быть отсчетной точкой для циркуляции углеводов, белков и жиров в организме. И начинается эта циркуляция не через артериальный сосуд, а через воротную вену. В выбросе же отработанных продуктов всегда участвуют несколько систем. Прежде всего, это печень, почки и толстый кишечник. При больших физических нагрузках в выбросе участвует кожа, а в патологических случаях и легкие.

Геометрическая структура вложения капиллярной сети в легких и в тонком кишечнике представляется вполне понятной – сросшиеся «кроны деревьев». С вложением же капиллярной сети в континуум тканей – мышечной, печени и почек – такой ясности нет.

В капиллярах всасывание молекул происходит довольно быстро. Поэтому и концентрация молекул быстро падает от входа к выходу капилляра, что ограничивает эффективную длину транспорта. Автору не удалось нигде найти сведений, как это вложение устроено геометрически. Однако из ограничений на эффективную длину капилляров создается впечатление, что оно представляет собой вложение совокупности слоев с толщиной равной длине цилиндра Крюга.

При предложенном взгляде возникает не только задача о геометрическом вложении ветвящейся сосудистой сети в континуум тканей, но и задача стехиометрических балансов потоков кислорода, белков и жиров, а также выноса в окружающее пространство потоков тепла, выделяемого при физической работе и химических реакциях, обеспечивающих функционирование организма.

Автор благодарит А.К. Лабуцкого за поддержку и плодотворные обсуждения.

Работа профинансирована Министерством науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ИПФ РАН, проект № FFUF-2021-0014

Особенности постурального баланса у юных бадминтонистов

Назаренко А.С.¹, Чершинцева Н.Н.¹, Зверев А.А.^{1*}

¹*Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма;
[Alekccei5@rambler.ru](mailto:Alekcei5@rambler.ru)*

Введение. Бадминтон относится к ситуационным видам спорта, где спортсмену во время игры приходится постоянно перемещаться по корту и одновременно следить за действиями соперника и волана, что, несомненно, предъявляет высокие требования к функции равновесия спортсмена. Функция равновесия является суммой действий, реализующих постуральный контроль через различные сенсорные системы, и надежность функционирования этих компонентов в определенной мере будет зависеть от степени эффективности каждой, как во время краткосрочного периода адаптации к новому положению тела, так и после долгосрочных адаптационных процессов в результате спортивной деятельности [1]. При этом различные нарушения поддержания функции равновесия, вызванные физическим и сенсорным утомлением, не только влияют на спортивный результат, но также могут увеличить риск травматизма у спортсменов. В свою очередь, наиболее квалифицированные спортсмены обладают лучшими постуральными характеристиками, как в специфических, так и в неспецифических постуральных условиях [2]. В то же время, научные исследования, проведенные на сегодняшний день, лишь в незначительной степени рассмотрели влияние специфических спортивных упражнений на контроль постурального баланса лежащие в его основе механизмы. При этом большинство научных исследований в оценке постурального баланса проводится на взрослых спортсменах, которые уже имеют сформированные механизмы долговременной адаптации организма к мышечной нагрузке и завершённые процессы возрастного развития. Однако динамика совершенствования постуральной функции юных спортсменов в процессе долговременной адаптации к спортивной тренировке остается до конца не изученной.

Целью данного исследования явилось изучение особенностей постурального баланса у юных бадминтонистов в состоянии относительного покоя и после физической нагрузки.

Организация и методы исследования. В исследованиях принимали участие бадминтонисты (n=12) в возрасте 8-10 лет и не спортсмены (n=11). Все исследуемые были здоровы и не имели каких-либо ограничений для занятий спортом. Постуральный баланс оценивали на стабилографическом аппаратно-программном комплексе «Стабилан 01-2» (ЗАО «ОКБ» «Ритм», Россия) путем анализа колебаний центра давления. Испытуемые выполняли стабилографическую пробу Ромберга (тест с открытыми и закрытыми глазами). Далее испытуемые выполняли физическую нагрузку в виде 20 приседаний, после которой вновь оценивали уровень постурального баланса в пробе Ромберга с открытыми глазами. Для анализа постурального баланса юных бадминтонистов были выбраны наиболее информативные стабилографические показатели колебания центра давления: EIS, мм² – площадь доверительного эллипса; VCP, мм/сек – средняя скорость перемещения центра давления; КФР, % – качество функции равновесия. Все исследования проводились с соблюдением основных биоэтических правил и норм проведения экспериментальных работ. Производили проверку выборки на нормальное распределение, а также статистическую значимость эффекта по сравнению с контрольными значениями выявляли с помощью парного и непарного критерия Стьюдента и ANOVA.

Результаты исследования и их обсуждение. По данным пробы Ромберга (открытые глаза) уровень постурального баланса у юных спортсменов и не занимающихся спортом не различался и находился в диапазоне возрастной нормы. Однако показатель площади доверительного эллипса у юных спортсменов был немного ниже (187 мм², p>0,05), чем у не спортсменов (231 мм²), что отражает тенденцию к более высокому контролю баланса

при меньшей площади опоры и разброса центра давления. В пробе Ромберга (закрытые глаза) произошло увеличение скорости колебания центра давления у всех испытуемых, что повлияло на рост стабилографических показателей, снижение интегрального показателя «качество функции равновесия» (до 57-67%) и, в целом, уровня постурального контроля. Однако также не наблюдались межгрупповые различия в показателях постурального баланса у испытуемых. Важно отметить, что отсутствие значимых различий в уровне постурального баланса в пробе Ромберга (тест с открытыми и закрытыми глазами) может объясняться, с одной стороны, генетической детерминированностью способности к высокому уровню сохранения равновесия тела, а с другой, не специфичностью теста. После физической нагрузки у всех испытуемых, также, как и, в условиях отсутствия зрения, большинство стабилографических показателей постурального баланса увеличилось ($p < 0,01$), что неизбежно привело к снижению интегрального показателя «качество функции равновесия» (до 59-69%), лежащего в основе представления о минимальной скорости изменения центра давления: чем выше значение этого показателя, тем выше способность к постуральному контролю. При этом установлено, что постуральная ответная реакция на физическую нагрузку зависит от ее типа, интенсивности, продолжительности, длительности проприорецептивной стимуляции, формы мышечного сокращения и степени активации мышечных волокон. В свою очередь, короткие и интенсивные упражнения общего характера увеличивают влияние на постуральный контроль за счёт повышения гипервентиляции, а не локального утомления.

Заключение. Таким образом, систематичность тренировочного процесса уже в детском возрасте является важной детерминантой адекватного адаптационного эффекта для повышения постурального баланса. При этом следует учитывать исходный уровень постурального контроля, который может быть обусловлен генетической предрасположенностью, предопределяющей соответствующие адаптационные сдвиги в ответ на систематические тренировки.

Список литературы:

1. Nazarenko, A.S. Statokinetic stability and electrocardiographic indicators of the heart in young badminton players / A.S. Nazarenko, N.N. Chershintseva, A.A. Zverev. - Modern issues of biomedicine. - 2022. - v.6 (3).
2. Gratze G., Mayer H., Skrabal F., Sympathetic reserve, serum potassium, and orthostatic intolerance after endurance exercise and implications for neurocardiogenic syncope. Eur Heart J., 2008, vol. 29 (12), pp. 1531-1541.

Оценка постурального баланса спортсменов-бадминтонистов после функциональной нагрузки

Балтин М.Э.^{1,2*}, Федянин А.О.^{1,2}, Мавлиев Ф.А.², Балтина Т.В.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

²Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма;
tvbaltina@gmail.com

Введение. Стабильность осанки и корпуса имеет решающее значение почти для всех движений в спорте [1], особенно при сохранении равновесия на неровной поверхности или при реагировании на внезапные возмущения [2]. Тренировка равновесия улучшает суставную стабильность, способность к прыжкам, скорость и силу сокращения мышц. Превосходный баланс тела имеет решающее значение для развития навыков игры в бадминтон, спортивных результатов [3] и предотвращения травм [4].

Цель исследования. Оценить смещение центра давления во время выполнения спокойной стойки в пробе Ромберга и относительно сложной задачи в тесте «Мишень» до и после выполнения нагрузочного теста у квалифицированных спортсменов-бадминтонистов и молодыми людьми не занимающихся спортом (неспортсменами).

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 12 бадминтонистов (возраст $20,91 \pm 2,03$, время занятий бадминтоном $11,5 \pm 3,7$ лет) и 8 неспортсменов (возраст $21,34 \pm 1,87$ лет). Для оценки постуральной устойчивости проводился тест «Допусковый контроль» до и после функциональной нагрузки (45 приседаний за 1 минуту). Тест «Допусковый контроль» состоял из 3-х этапов: проба Ромберга с открытыми глазами (ОГ), проба Ромберга с закрытыми глазами (ЗГ) и тест «Мишень». В программе МедСтат определяли внутригрупповые различия по T - критерию Вилкоксона и межгрупповые различия по U-критерию Манна-Уитни. Уровень статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты. У неспортсменов общая длина смещений центра давления после нагрузки в пробах ОГ и ЗГ была больше во фронтальной плоскости, чем до нагрузки. У спортсменов после нагрузки длина смещения увеличивалась в сагиттальной плоскости больше, чем во фронтальной. Смещение центра давления у спортсменов было достоверно меньше после нагрузки в пробе ОГ и тесте «Мишень», и достоверно больше в пробе ЗГ. Таким образом, мы показали, что у спортсменов ведущим анализатором в поддержании равновесия является зрительный. После физической нагрузки у неспортсменов наблюдали увеличение смещения тела по

фронтал, что свидетельствует о смене голеностопной стратегии поддержания равновесия на бедренную, менее эффективную. У всех участников показано снижение КФР в пробе ЗГ и в тесте «Мишень». В тесте «Мишень» спортсмены-бадминтонисты показали высокую продуктивность, эффективную стратегию удержания центра тяжести в заданной зоне до и после выполнения нагрузочного теста. Показано, что в целом, регулярная физическая активность улучшает постуральный контроль за счет структурной адаптации мышц-разгибателей нижней конечности, что позволяет использовать спортсменам опережающие стратегии в поддержании баланса.

Заключение. Зрительный анализатор является ведущим в поддержании постурального баланса у бадминтонистов. Сложившаяся активная нервно-мышечная регуляция позы в результате тренировок у спортсменов приводит к стабилизации в сагиттальной плоскости при усложнении постуральных задач.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства спорта РФ 1022040500835–2–3.3.11 (Приказ no.4 от 10.01.2022).

Литература

1.Sharrock C., Cropper J., Mostad J., Johnson M., Malone T. A pilot study of core stability and athletic performance: is there a relationship? Int. J. Sports Phys. Ther. 2011. Vol.6. P. 63–74.

2.Zazulak B. T., Hewett T. E., Reeves N. P., Goldberg B., Cholewicki J. Deficits in neuromuscular control of the trunk predict knee injury risk – a prospective biomechanical-epidemiologic study. Am. J. Sports Med. 2007. Vol.35. P. 1123–1130.

3.Lu Z., Zhou L., Gong W., Chuang S., Wang S. et al. The Effect of 6-Week Combined Balance and Plyometric Training on Dynamic Balance and Quickness Performance of Elite Badminton Players. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2022. Vol. 19. No3. 1605. doi:10.3390/ijerph19031605.

4.Guermont H., Le Van P., Marcelli C., Reboursière E., Drigny J. Epidemiology of Injuries in Elite Badminton Players: A Prospective Study. Clin. J. Sport. Med. 2021. Vol.31, No6. e473-e475. doi: 10.1097/JSM.0000000000000848.

Оценка постуральной устойчивости здоровых людей при чрескожной электрической стимуляции поясничного и шейного отдела спинного мозга с частотой 1 и 5Гц

Желтухина А.Ф.^{1*}, Бикчентаева Л.М.¹, Балтина Т.В.¹

¹Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия;
angelina7385@yandex.ru

Актуальность.

Одним из способов модуляции нейронных цепей спинного мозга был представлен неинвазивный метод чрескожной электрической стимуляции спинного мозга (ЧЭССМ). Метод ЧЭССМ применим как для исследования принципов регуляции локомоторных функций у людей с отсутствием двигательных нарушений, так и для подбора способов реабилитации для больных с нарушенной двигательной функцией [1]. Было показано, что с помощью метода ЧЭССМ становится возможна регуляция локомоторных функций у условно здоровых лиц [2].

Цель работы. Оценить эффективность воздействия чрескожной стимуляции спинного мозга на поясничном (Th11-Th12) и шейном (C5-C6) уровне с частотой 1 и 5 Гц на показатели постуральной устойчивости у условно здоровых лиц.

Материалы и методы. В процессе работы было обследовано 67 человек (7 мужчин и 60 женщин), возраста от 20 до 40 лет. Все исследования были проведены с информированного добровольного согласия участников в соответствии с Хельсинской декларацией. Протокол исследования одобрен Локальным Этическим Комитетом ФГАОУ ВО КФУ (протокол № 34 от 27.01.2022).

Оценка постуральной устойчивости исследуемого до и после ЧЭССМ производилась с применением стабилографической платформы «Стабилан-01» производства ЗАО ОКБ «РИТМ», Таганрог, Российская Федерация.

Организация эксперимента.

На первом этапе была проведена контрольная проба (К), стабилметрическое тестирование в спокойной стойке, с открытыми глазами без стимуляции длительностью одиннадцать минут.

После 10-минутного перерыва производилось стабилметрическое тестирование в свободной стойке, со стимуляцией – 11-минутное обследование, по схеме:

1-я минута: запись без стимуляции с целью адаптации испытуемого к стойке на стабилографической платформе;

Со 2-й по 6-ю минуту (общая сложность 5 минут): со стимуляцией;

С 7-й по 11-ю минуту (общая сложность 5 минут): без стимуляции, запись после стимуляции.

Каждый испытуемый прошел серию 11-минутных обследований, состоящих из 3 проб: контрольная, ЧЭССМ шейного отдела спинного мозга на уровне C5-6 шейных позвонков и поясничная стимуляция на уровне Th11-12 грудных позвонков.

Стимуляция спинного мозга. ЧЭССМ на уровне T11-12 проводилась при помощи стимулятора «Нейрософт МВП-8» (Нейрософт, Иваново, РФ). Катод, стимулирующий самоклеящийся электрод был расположен между остистыми отростками Th11–Th12 позвонков.

Для осуществления ЧЭССМ на уровне шейного отдела спинного мозга использовали пятиканальный стимулятор BIOSTIM-5 (Cosyma Ltd., Москва, Россия). Стимулирующий накожный круглый электрод (катод) с адгезивным слоем диаметром 32 мм располагали на коже между остистыми отростками C5 и C6 позвонков, прямоугольные электроды (анод) с адгезивным слоем размером 45×80 мм располагались симметрично на ключицах.

Стимуляция осуществлялась прямоугольными биполярными импульсами длительностью 1,0 мс, интенсивность стимула варьировала в диапазоне от 50 до 70 мА. Подбор силы стимула осуществлялся индивидуально для каждого испытуемого в зависимости от наличия болевых ощущений. Длительность стимуляции составляла 5 минут. Во время проведения исследования производился контроль показателей состояния сердечно-сосудистой системы (ЧСС, АД).

Статистическая обработка и анализ полученных данных были проведены в программе SigmaPlot 12.0.

Результаты и обсуждение.

При выполнении контрольной пробы было выявлено, что в спокойной стойке со зрительным контролем при стоянии на твердой поверхности испытуемые продемонстрировали способность поддерживать баланс. Так, через одиннадцать минут, по сравнению с первой минутой смещение ЦД по фронтальной оси осталось на исходном уровне, по сагиттальной оси понизилось, длина траектории ЦД по фронтальной и сагиттальной оси, а также угловая средняя скорость не изменились.

При ЧЭССМ на уровне шейного и поясничного отделов спинного мозга было выявлено, что стимуляция с частотой 5 Гц положительно повлияла на изменение стабильностных показателей: увеличилась средняя угловая скорость, уменьшилась площадь эллипса, уменьшилась длина траектории ЦД по сагиттальной оси, при этом стимуляция на уровне Th11-12 была более эффективна. В качестве одного из возможных объяснений улучшения постуральной устойчивости при ЧЭССМ приводится увеличение синаптической проводимости, а также увеличение возбудимости афферентных входов [3]. ЧЭССМ с частотой стимуляции 1 Гц как шейного, так и поясничного отдела спинного мозга ухудшала функцию поддержания вертикальной позы человека.

Результаты наших исследований позволяют предположить, что с помощью метода ЧЭССМ можно положительно влиять на функционирование спинальных нейронных сетей у людей с нарушениями двигательных функций, тем самым увеличивая качество двигательных способностей.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета» (ПРИОРИТЕТ-2030).

Литература

1) Gerasimenko, Y., Gorodnichev R., Puhov A. et al. Initiation and modulation of locomotor circuitry output with multisite transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord in non-injured humans//J. Neurophysiology. – 2015. –V. 113. – P. 834–842.

2) Musienko, P. E., Bogacheva I. N., Savokhin A. A. et al. Facilitation of locomotor activity in decerebrated and spinal cats with non-invasive transcutaneous spinal cord stimulation // Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnalim. I. M. Sechenova. – 2013. – V. 99, № 8. – P. 917–927.

3) Якупов, Р. Н., Балыкин Ю. М., Котова Е. Ю. et al. Изменение силовых показателей мышц нижних конечностей при чрескожной электрической стимуляции спинного мозга//Ульяновский медико-биологический журнал. – 2015. – № 4. – С. 99–103.

Передаточная функция электромеханического сопряжения

Гришин С.Н.^{1*}, Хайруллин А.Е.¹, Габдрахманов А.И.¹, Теплов А.Ю.¹, Ефимова Д.В.¹, Зиганшин А.У.¹

¹Казанский государственный медицинский университет;

sgrishin@inbox.ru

Общеизвестно, что при возбуждении мотонейрона в норме может регистрироваться потенциал действия (ПД) мышечного волокна, а само волокно будет сокращаться. ПД мышечных волокон предшествуют деполяризующие потенциалы концевой пластинки. Они возникают в ответ на поступление импульсов по мотонейронам, названы потенциалами концевой пластинки (ПКП) и относятся к постсинаптическим потенциалам. ПКП имеют максимальную амплитуду в области концевой пластинки, экспоненциально уменьшаются и исчезают по мере удаления от нее.

Классические эксперименты в лаборатории Бернарда Катца показали, что если подействовать на нервно-мышечный препарат ядом кураре (синтетический аналог - d-тубокурарин), блокаторм постсинаптических Н-холинорецепторов, то величина ПКП становится меньше. d-тубокурарин используется для мышечной релаксации при операциях под общей анестезией. Как известно, d-тубокурарин является конкурентным антагонистом ацетилхолина. То есть при определенной концентрации он, полностью вытесняя ацетилхолин, не дает связываться последнему с никотиновыми холинорецепторами. Таким образом, применяя Н-холиноблокаторы, невозможно проследить весь ход коррелирования модуляции амплитуды вызванных токов концевой пластинки и силы сокращения мышцы, так как при определенной концентрации агента постсинаптические потенциалы просто исчезают. Кроме того, блокаторы холинорецепторов не только снижают амплитуду ПКП, но и изменяют их временные характеристики, что вносит свой существенный модулирующий эффект в генерацию ПД в околосинаптической области мышечного волокна.

Постепенное снижение собственно амплитуды постсинаптических ответов можно получить, используя модуляторы величины квантового состава нейромедиатора. Поиск эффективных (чье действие было бы крайне выражено, но обратимо) пресинаптических модуляторов мионевральной передачи идет, не прекращаясь, всю историю синаптологии, то есть более ста лет. В последнее время все больше ученых на основе всесторонних исследований приходят к выводу, что наиболее эффективными модуляторами нервно-мышечной передачи являются пуринергические эндогенные синаптические агенты – комедиатор ацетилхолина аденозинтрифосфат (АТФ) и его самый устойчивый метаболит – аденозин.

Ранее нами получены данные, что эти два пурина в физиологической концентрации имеют выраженный депрессорный эффект как на амплитуду постсинаптических ответов, так и на силу сокращения портняжной мышцы лягушки. Причем запас усиления ингибиторного влияния на эти параметры при увеличении концентрации данных пуринов выражен, как ни у одного другого эндогенного модулятора, так нами показано, что, к примеру, АТФ участвует в аккумуляции высвобождаемых при стрессе и гипертермии мышечных усилий. Исходя из всего этого, для выявления передаточных соотношений в работе двигательной единицы мы задались целью зарегистрировать и сопоставить изменения параметров вызванных ответов концевой пластинки и сокращения скелетной мышцы лягушки под влиянием АТФ и аденозина в концентрациях, различающихся до 5 порядков.

Стандартные электрофизиологические эксперименты проводились на лягушках *Rana radibunda* при комнатной температуре согласно Европейской Конвенции по защите лабораторных позвоночных животных с разрешением Этического комитета КазГМУ.

Статистический анализ данных был проведен с использованием пакета программ OriginPro 8. Нормальность распределения данных была проверена тестом Колмогорова-Смирнова. Результаты экспериментов были нормализованы относительно контроля и представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, в процентах. Был проведен регрессионный анализ на наличие функциональной взаимосвязи, а также тест информационного критерия Акаике, для выбора оптимального уравнения регрессии. Для построения нелинейной кривой зависимости между амплитудой токов концевой пластинки и силы сокращения был использован метод ортогональной регрессии. Статистическая значимость была проверена с анализом дисперсии (ANOVA).

Мы установили, что при ингибировании как аденозином, так и АТФ амплитуды постсинаптических ответов вплоть до 2/3 от начальных значений снижение силы сокращения выражено в меньшей степени – как квадратный корень от значения сниженной амплитуды постсинаптических ответов (при тривиальном нормировании). При дальнейшей вызванной пресинаптическими ингибиторами депрессии эффект на амплитуду постсинаптических ответов становился равным по значению снижению силы сокращений. Полученные соотношения могут быть использованы для пересчета того влияния, которое оказывается на силу сокращения мышцы, когда известен лишь эффект в нервно-мышечном синапсе того или иного модулятора.

Развитие мышечного утомления у теннисистов различной квалификации

Чершинцева Н.Н.^{1*}, Бартова Ю.Д.¹, Тарасова Е.В.¹, Фазлеев Н.Ш.¹, Зверев А.А.¹

¹ *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма";*
chersinceva@mail.ru

На сегодняшний день теннис входит в топ популярных видов спорта по всему миру, что с каждым годом способствует увеличению количества занимающихся. Неуклонный рост спортивных достижений, крайне обострившаяся конкуренция на мировой спортивной арене – это привлекает внимание специалистов с целью совершенствования процесса подготовки спортсменов, которая зависит от большого количества условий, в том

числе, от уровня физических и психологических нагрузок. Все вышеперечисленное может приводить к увеличению степени утомления и перетренированности спортсмена.

В длительных розыгрышах при взаимодействии ракетки и мяча мышцы кисти особенно подвержены нагрузке, и это, в свою очередь, может сказываться на качестве игры: несвоевременные удары с более низкой скоростью полета мяча и измененные движения на корте. Изучение влияния мышечного утомления на квалифицированные результаты в теннисе представляет собой серьезную проблему с точки зрения иностранных исследователей. Тест на определение силы хвата часто используется для оценки комплексной работы мышц путем определения максимальной силы хвата, которая может быть достигнута за одно мышечное сокращение, что в дальнейшем служит маркером общей мышечной силы.

Цель исследования – оценка и анализ показателей силы хвата и развития мышечного утомления у теннисистов различной квалификации.

Методы и организация исследования. Исследование проводилось на базе ФГБОУ ВО «Поволжский ГУФКСиТ». В исследовании приняли участие 10 студентов теннисистов, имеющих спортивный разряд не ниже второго взрослого. Средний возраст испытуемых составил 19.0 ± 1.8 лет. Регистрация показателей силы хвата производилась на установке Power Lab (ADInstruments, Австралия). Эксперимент состоял из следующих этапов: одиночное максимальное сжатие динамометра ведущей рукой, отдых в течение 30 сек., развитие утомления – 15 секунд (5 подходов). Между подходами была пауза длительностью 15 секунд. Испытуемый при этом не видел экран с результатами эксперимента. Все этапы выполнялись вытянутой рукой из положения стоя. Анализ проводили в универсальном модуле «Peak Analysis», где оценивали следующие показатели: Width (мсек), Height (ньютон), APeak (ньютон), TRise (сек), TFall (сек), площадь кривой показателей кистевого динамометра. Полученные данные анализировались в программе Microsoft Excel. Определяли нормальное распределение выборки, средние значения и стандартное отклонение ($M \pm \delta$).

Результаты исследования и их обсуждение.

Кисть теннисиста находится в постоянном напряжении, связанным со спецификой вида спорта, а длительное напряжение мышц кисти и предплечья может привести к быстрому развитию утомления мышц, вследствие этого и к проигрышу очка. В первой серии эксперимента нами были определены амплитудно-временные характеристики изометрического напряжения мышц за одно короткое сжатие динамометра. При оценке взаимосвязи исследуемых показателей с уровнем спортивного мастерства теннисистов было выявлено, что у спортсменов-разрядников максимальная сила сжатия динамометра составила 251.7 ± 58.0 Нт, тогда как у спортсменов, имеющих звание Кандидат в мастера спорта России (КМС) – 359.1 ± 43.9 Нт. Время достижения максимальной силы (0.5 и 0.6 сек) и скорость сокращения (497.5 и 544.1 Нт/сек) у разрядников было меньше, чем у спортсменов КМС, что может быть связано с различием мышечных волокон у спортсменов разной квалификации. По-видимому, у КМС преобладают белые мышечные волокна, которые отличаются высокой силой, но быстрой утомляемостью, а у разрядников – красные, способные на меньшую силу, но с медленной утомляемостью.

Следующая серия экспериментов была направлена на развитие утомления у спортсменов. Нами использовалась классическая схема развития утомления с помощью динамометра. За контроль были взяты значения развития первого 15 секундного утомления. При оценке полученных результатов у исследуемых теннисистов мы выявили различия во всех исследуемых показателях. Основным показателем мышечного сокращения является амплитуда, которая была больше у КМС при всех пяти подходах к динамометру. В среднем данное значение составило 32 %. Площадь под кривой развития утомления также была больше у КМС и составила 37 % при всех подходах. Развитие данной динамики может свидетельствовать об одинаковых энергетических запасах в мышцах. Во время анализа данных в последующих подходах амплитуда и площадь кривой мышечного утомления уменьшались, как у разрядников, так и у кандидатов в мастера спорта, но у КМС показатели были выше. К пятому развитию утомления у кандидатов в мастера спорта регистрировалось повышение амплитуды за счет уменьшения времени достижения максимума по сравнению с остальными подходами, в то время как у разрядников она уменьшалась. Также при 5 подходе у разрядников повысилась площадь кривой мышечного утомления за счет увеличения времени достижения минимума сокращения.

Изменение площади сопровождалось уменьшением времени градиента утомления на 6.5 %, амплитуды утомления на 30 %, силы в конце подхода развития утомления на 32 %, скорости до утомления на 37 %, в то время как скорость сокращения уменьшалась до 3 подхода развития утомления, после чего повысилась у разрядников, а время достижения максимальной силы была выше у КМС только в 1 и 3 подходах.

Таким образом, чем выше уровень спортивной квалификации теннисистов, тем выше показатели силы сжатия динамометра. Во всех подходах развития утомления, кроме первого, у разрядников наблюдали более быстрое время достижения максимальных показателей утомления, чем у теннисистов выше по званию. Также разрядники дольше по времени удерживали средние показатели динамометра, чем кандидаты в мастера спорта России. По-видимому, это обуславливается сформированностью корковых и подкорковых двигательных актов, активирующих работу мышц, а также значительным совершенствованием межмышечных и внутримышечных координационных механизмов управления движением у спортсменов более высокой квалификации.

Региональные особенности нарушения сократительной функции кардиомиоцитов предсердий крыс при пароксизмальной форме фибрилляции предсердий

Бутова К.А.^{1*}, Михрякова П.П.², Мячина Т.А.¹, Симонова Р.А.¹, Щепкин Д.В.¹, Кочурова А.М.¹,
Копылова Г.В.¹, Хохлова А.Д.^{1,2}

¹Институт иммунологии и физиологии УрО РАН;

²Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина;

k.butova@gmail.com

Фибрилляция предсердий (ФП) – наиболее распространенная форма сердечной аритмии, характеризующаяся неупорядоченной деполяризацией предсердий и, как следствие, их нескоординированным сокращением. В классификации ФП выделяют пароксизмальную (купируется самостоятельно или в результате вмешательства в течение 7 суток после ее начала) и персистирующие формы (длительностью более 7 суток) [1]. В отличие от структурных и функциональных последствий, вызванных персистирующими формами ФП, функциональным нарушениям миокарда, возникающим при пароксизмальной форме ФП, уделено мало внимания. Кроме того, структурно-функциональные различия левого и правого предсердия (ЛП, ПП) в норме, и их различная роль в возникновении и поддержании ФП [2], ставит необходимость в дифференциальной оценке изменения сократительной активности предсердных камер при пароксизмальной форме ФП.

Цель исследования заключалась в оценке нарушений сократительной активности ЛП и ПП крыс, а также изменения степени функциональной неоднородности между ними при пароксизмальной форме ФП на клеточном и молекулярном уровнях организации миокарда.

Эксперименты были выполнены на самцах крыс линии Вистар возрастом 10 недель в соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU. Инициация пароксизмальной ФП выполняли внутривенным введением раствора, содержащего 60 мкг/мл AChCl и 10 мг/мл CaCl₂ в дозировке 1.3 мл/кг веса в течение 7 дней [3]. Для выявления пароксизмов регистрировали ЭКГ в 3 отведениях (ECG300G-VET, Китай).

Одиночные кардиомиоциты ЛП и ПП изолировали методом перфузии сердца по Лангендорфу с авторскими модификациями. Измерения активности саркомеров в режиме механически ненагруженного укорочения и ауксотонической силы сокращения кардиомиоцитов при их механическом нагружении 4 карбоновыми волокнами [4] выполняли с помощью программно-аппаратного комплекса MCSYS-02 (IonOptix, США). Регистрацию динамического изменения концентрации ионов Ca²⁺ в цитозоле ([Ca²⁺]_i) выполняли с использованием кальций-чувствительного флюорофора Fluo-8AM (AAT Bioquest, США) на системе лазерной сканирующей конфокальной микроскопии LSM710 (Carl Zeiss, Германия). Все измерения были выполнены при 30 °C и частоте электрической стимуляции 1 Гц.

Выявление альтернансов сокращения саркомеров кардиомиоцитов предсердий (чередования минимальных (MIN) и максимальных (MAX) отклонений амплитуды длительностью более 5 сократительных циклов от псевдостационарного значения амплитуды) и анализ их параметров выполнялось при помощи ПО IonWizard (IonOptix, США). Морфометрические параметры изолированных кардиомиоцитов ЛП и ПП (длина и ширина клетки) оценивали при помощи программного пакета FIJI ImageJ (US National Institutes of Health, США).

Взаимодействие миозина с F-актином и нативными тонкими филаментами, экстрагированными из ЛП и ПП, изучали в *in vitro* подвижной системе. Определение степени фосфорилирования белков саркомера осуществляли при помощи гель-электрофореза с окрашиванием Pro-Q Diamond (Thermo Fisher Scientific, США) и SYPRO Ruby (Thermo Fisher Scientific, США).

При пароксизмальной форме ФП в обоих предсердиях возрастала длина кардиомиоцитов без изменения их ширины. При ФП в кардиомиоцитах ЛП уменьшалась амплитуда укорочения саркомера, а также снижались максимальные скорости достижения пика укорочения и расслабления саркомера. В миоцитах ПП при ФП достоверно возрастали конечно-диастолическая длина и максимальная скорость укорочения саркомера без изменений в амплитуде укорочения саркомера. Альтернансы механической функции саркомера с большей частотой обнаруживались в ЛП и имели большие величины MIN и MAX отклонений амплитуды укорочения саркомера, по сравнению с обнаруженными в ПП. При этом, в группе ФП отмечалось исчезновение различий в величине амплитуды укорочения между ЛП и ПП, которые регистрировались в контрольной группе.

При ФП в кардиомиоцитах ЛП уменьшалась амплитуда [Ca²⁺]_i, тогда как в миоцитах ПП кроме уменьшения амплитуды [Ca²⁺]_i снижались также общая длительность и время достижения 50% спада [Ca²⁺]_i. В группе ФП было отмечено наличие межкамерных различий по временным параметрам [Ca²⁺]_i, которые отсутствовали в контрольной группе.

Сила ауксотонического сокращения кардиомиоцита при ФП уменьшалась относительно значений контрольной группы только в ПП, что вело к появлению различий в уровнях силы между ЛП и ПП, которые отсутствовали в контрольной группе.

Скорости скольжения F-актина и нативного тонкого филамента по миозину не изменялись при ФП относительно значений контрольной группы, однако в группе ФП исчезали различия между предсердными

камерами, обнаруженные в контрольной группе для скорости скольжения F-актина. В ЛП при ФП выявлено уменьшение степени фосфорилирования сMyBP-C и TnI, тогда как в ПП – увеличение степени фосфорилирования RLC по сравнению с контрольной группой, что может обуславливать более выраженное влияние ФП на параметры укорочения саркомеров в ЛП по сравнению с ПП.

Таким образом, пароксизмальная форма ФП вызывает выраженные нарушения в динамике укорочения и фосфорилировании белков саркомера в ЛП, а также в параметрах изменения $[Ca^{2+}]_i$ и аутокотонической силе кардиомиоцита в ПП. Выявленные изменения в геометрии кардиомиоцитов ЛП и ПП свидетельствуют о наличии эксцентрической гипертрофии предсердных камер при пароксизмальной форме ФП. Кроме того, пароксизмальная форма ФП ведёт к изменению исходного паттерна функциональной неоднородности, характерного для миокарда здоровых животных. Такие региональные различия в функциональном ремоделировании предсердий при ФП предполагают различие в возможных путях компенсации данного состояния в ЛП и ПП.

Эксперименты выполнены на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН при поддержке гранта РФФИ № 22-75-10134.

1. Hindricks G., Potpara T., Dagres N., et al. Eur Heart J 2020; 00; 1–126.
2. Chen P.S., Chen L.S., Fishbein M.C. et al. Circ Res 2014; 114; 1500–1515.
3. Zou D., Geng N., Chen Y. et al. Life Sci 2016; 156; 7–14.
4. Iribе G., Kaneko T., Yamaguchi Y. et al. Prog Biophys Mol Biol 2014; 115; 103–114.

Роль белков теплового шока HSP90 α и HSP90 β в миграции клеток фибросаркомы человека HT1080

Петренко В.С.^{1*}, Врублевская В.В.¹, Жмурина М.А.¹, Скарга Ю.Ю.¹, Моренков О.С.¹

¹Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ
РАН, Пущино, Россия;
79182797935@yandex.ru

Миграция клеток является сложным, тонко регулируемым биофизическим процессом, участвующим в различных этапах как нормального, так и патологического функционирования эукариотических организмов. Миграция клеток обеспечивает поддержание тканевого гомеостаза и морфогенеза, участвует в развитии иммунного ответа, процессе заживлении ран, а также в инвазии и метастазировании раковых клеток. Изучение клеточной миграции важно для понимания механизмов метастазирования злокачественных опухолевых клеток и разработки противоопухолевых препаратов антиметастатического действия.

Миграция клеток осуществляется за счёт реорганизации цитоскелета, в которую вовлечены актин и миозин II. Полимеризация актиновых филаментов на периферии клетки приводит к росту ламеллоподий, актин участвует в формировании стрессовых фибрилл, обеспечивающих скольжение актиновых филаментов относительно друг друга за счёт действия моторных белков, в основном миозина II. Возникающее в результате полимеризации актина и сокращения стрессовых волокон механическое напряжение в конечном итоге передается на экстраклеточный субстрат через сайты адгезии, тем самым обеспечивая движение клеток. Регуляция процесса миграции клеток осуществляется системой внутриклеточной сигнализации, в которой принимают участие рецепторы, белки, модифицирующие цитоскелет, киназы, различные адаптерные и сигнальные белки и т.д. Белок теплового шока 90 (Hsp90) является высококонсервативным белком-шапероном, обеспечивающим фолдинг, стабилизацию и деградацию множества внутриклеточных белков (более 700 белков-клиентов), в том числе белков, связанных с клеточной подвижностью. Hsp90 играет важную роль в поддержании клеточного гомеостаза, в выживании и дифференцировке клеток, пролиферации, канцерогенезе, клеточной миграции и других клеточных процессах. Известны две изоформы Hsp90, стресс-индуцируемая изоформа Hsp90 α , кодируемая у человека геном HSP90AA1, и конститутивно экспрессируемая изоформа Hsp90 β , кодируемая у человека геном HSP90AB1. Изоформы Hsp90 имеют высокую гомологию по аминокислотной последовательности (~86%), в связи с чем Hsp90 α - и Hsp90 β изоформы демонстрируют как сходство, так и различия в функционировании в клетке. К настоящему времени специфическая функциональная роль Hsp90 α и Hsp90 β в миграции клеток не определена. Целью нашего исследования являлось определение роли отдельных изоформ Hsp90 в процессах, связанных с клеточной подвижностью.

Для исследования роли одной изоформы Hsp90 в клеточных процессах необходимо подавление активности другой изоформы. К настоящему времени не описаны специфические ингибиторы Hsp90 α и Hsp90 β . Мы пошли по пути создания клеточных линий, нокаутированных по генам, кодирующим разные изоформы Hsp90. На основе никазного Crispr/Cas9 вектора AIO-GFP были созданы две конструкции для мутагенеза 1 экзона генов HSP90AA1 и HSP90AB1 в клетках фибросаркомы человека HT1080. Правильность созданных

плазмид была подтверждена с помощью секвенирования. Проведена трансфекция клеток с помощью электропорации и получены 3 мутантные линии HT1080, не экспрессирующие Hsp90 α , и 3 мутантные линии, не экспрессирующие Hsp90 β , что было доказано методами иммуноблоттинга и проточной цитометрии с использованием Hsp90 α - и Hsp90 β -специфических антител. Секвенирование клонотек всех моноклонов выявило в 1 экзоне генов HSP90AA1 и HSP90AB1 наличие делеций и инсерций в обоих аллелях мутантных клонов, приводящих к сдвигу рамки считывания Hsp90 α и Hsp90 β . В результате, были получены мутантные линии HT1080 с биаллельным нокаутом гена HSP90AA1, кодирующего Hsp90 α , и биаллельным нокаутом гена HSP90AB1, кодирующего Hsp90 β .

Далее мы исследовали как отсутствие Hsp90 α и Hsp90 β в клетках HT1080 влияет на их способность к миграции. Оценку клеточной миграции проводили с помощью метода «заживления раны», нанесенной на монослой клеток. Для создания «раны» использовали силиконовые 2-луночные культуральные вставки (Ibidi, США), обеспечивающие формирование зазора (~500 мкм) на конфлуентном монослое клеток. После формирования «раны» на клеточном монослое через определенные интервалы времени делали фотографирование «раны» и оценивали скорость ее зарастания клетками. При проведении экспериментов использовали клетки, находящиеся в разном физиологическом состоянии (культивирование клеток до начала эксперимента в присутствии или в отсутствии сыворотки), использовали разные условия в процессе миграции (разные концентрации сыворотки, бессывороточная среда). Показано, что скорость миграции исходных клеток HT1080 и всех клеточных моноклонов с нокаутом Hsp90 α или Hsp90 β была сопоставима независимо от условий проведения экспериментов. Стоит отметить, что все клоны сохранили способность к активной пролиферации, которая не отличалась от пролиферации клеток HT1080.

Таким образом, на мутантных линиях с нокаутированными генами HSP90AA1 или HSP90AB1 показано, что отсутствие Hsp90 α или Hsp90 β изоформы практически не влияло на миграцию клеток. Полученные результаты могут свидетельствовать об отсутствии строго Hsp90 α - или Hsp90 β -специфических клиентских белков среди белков, участвующих в процессе миграции клеток. С другой стороны, в полученных моноклонах отсутствовала только одна из изоформ Hsp90. Возможно, одна изоформа компенсирует отсутствие другой изоформы Hsp90, принимая на себя её функции или часть функций. Полученные нами результаты ставят под сомнение общепринятое мнение о критической роли экстраклеточного Hsp90 α в клеточной локомоции. Все клеточные линии HT1080, не экспрессирующие внутриклеточного и, как следствие, внеклеточного Hsp90 α , продолжали мигрировать *in vitro* со скоростью, сопоставимой скорости миграции исходной культуры HT1080. Необходимы дополнительные исследования для детального изучения роли и взаимозаменяемости Hsp90 α и Hsp90 β в различных клеточных процессах, в том числе и в обеспечении клеточной миграции.

Роль гигантских белков саркомерного цитоскелета в мышечной пластичности зимоспящих: факты и предположения

Вихлянцев И.М.^{1*}, Захарова Н.М.²

¹ИТЭБ РАН;

²Институт биофизики клетки РАН;

vikhlyantsev@gmail.com

В докладе будут представлены данные о роли изменений изоформного состава, содержания, уровня фосфорилирования и экспрессии генов гигантских белков титина/тайтина, небулина и обскурина в адаптации поперечно-полосатых мышц зимоспящих (длиннохвостого суслика, сони-полчка, бурого медведя) к условиям гибернации. Будут представлены результаты исследований в поддержку предположения о роли гиперактивации кальций-зависимых протеаз кальпаинов в регуляции содержания гигантских мышечных белков в периоды межбуждательной активности, а также данные о роли РНК-связывающего белка Rbm20 в регуляции альтернативного сплайсинга титина. Результаты исследований расширяют представления об одном из важнейших свойств мышечной ткани – пластичности, позволяющей адаптироваться мышцам и организму в целом к изменению условий функционирования.

Исследование поддержано грантом РФФИ 20-04-00204.

Роль отставленной тонической активности камбаловидной мышцы в перестройке ключевых молекулярных сигнальных процессов при развитии мышечной гипогравитационной атрофии

Сергеева К.В.^{1*}, Шарло К.А.¹, Тыганов С.А.¹, Калашников В.Е.¹, Туртикова О.В.¹, Львова И.Д.¹,
Шенкман Б.С.¹

¹*Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия;*

sergeeva_xenia@mail.ru

Предыдущие исследования продемонстрировали, что на начальной стадии разгрузки задних конечностей (1-2 дня) наблюдается резкое снижение ЭМГ-активности камбаловидной мышцы крысы [1, 2]. Однако мышечная электрическая активность начинает увеличиваться после 48 часов разгрузки, а через 3 дня значительно отличается от значений, зарегистрированных сразу после начала воздействия [2]. Кроме того, было показано, что ЭМГ-активность камбаловидной мышцы крысы прогрессивно возрастает со 2-го по 6-й день функциональной разгрузки [2]. Мы предположили, что автономная активность является результатом значительного снижения экспрессии калий-хлоридного ко-транспортера KCC-2 в нейронах поясничного отдела спинного мозга с последующим изменением направления хлоридного тока и инверсией мембранного потенциала, приводящего к резкому повышению возбудимости мотонейронов [3], что наблюдалось в нашем предыдущем исследовании после 7-дневной функциональной разгрузки [2]. Действительно, ежедневное введение прохлорперазина, предотвращающего снижение KCC2, ослабляло автономную активность камбаловидной мышцы [2]. Целью настоящего исследования было изучение внутримышечных последствий снижения автономной активности мышцы при введении прохлорперазина в течение трех суток моделируемой гравитационной разгрузки. Животные были распределены на следующие группы: группа контроля – С; группа антиортостатического вывешивания 3 суток – 3HS, группа вывешивания 3 суток с ежедневным внутривбрюшинным введением прохлорперазина – 3HS+P.

В ходе 3-суточной экспозиции животных в условиях безопорности введение препарата прохлорперазин не предотвратило снижения изометрической силы, но способствовало сохранению собственной жесткости камбаловидной мышцы крысы. При анализе маркеров анаболических сигнальных путей было обнаружено поддержание уровня фосфорилирования фактора инициации трансляции 4E (4E-BP1) на уровне контроля при использовании прохлорперазина. Фосфорилирование рибосомального белка S6 (S6RP) было повышено на 85% в группе 3HS+P и, при этом, снижено на 58% в группе «чистого» вывешивания 3HS. Таким образом, введение прохлорперазина предотвратило снижение уровней фосфорилирования двух мишеней mTOR. Можно предположить, что на 1-3 суток вывешивания блокирование спонтанной тонической мышечной активности привело к более выраженному снижению активности АМФ-активируемой протеинкиназы (АМПК). Поскольку АМПК находится в реципрокных отношениях с mTOR [4], ее подавление могло вызвать активацию mTOR. Другим возможным механизмом влияния блокирования спонтанной тонической мышечной активности на mTOR-зависимые сигнальные пути может быть предотвращение роста содержания активных форм кислорода (АФК). Известно, что при вывешивании в мышцах, начиная с самых ранних сроков воздействия, возрастает содержание АФК [5], что может приводить к инактивации сигнального пути mTOR/Akt, а также способствовать дефосфорилированию и активации регулятора протеолиза FOXO3 [6]. В настоящем эксперименте активность транскрипционного фактора FOXO3 была статистически значимо снижена в группе 3HS+P по сравнению с группой 3HS. Следует отметить, что ключевую роль в этих эффектах играет АФК-зависимая активация МАП-киназ p38 и JNK. Мы обнаружили, что после 7 суток вывешивания введение прохлорперазина сопровождалось достоверным уменьшением содержания супероксидных анионов (по флуоресценции дигидроэтидия) и пониженным уровнем фосфорилирования МАРкиназ p38 и JNK в мышце по сравнению с животными, получавшими физиологический раствор на фоне разгрузки. Таким образом, предотвращение роста АФК при введении прохлорперазина может способствовать как блокированию роста показателей протеолиза, так и предотвращению инактивации сигнального пути mTOR.

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда № 22-15-00151.

1. Kawano F., Ishihara, A., Stevens, J.L., Wang, X.D., Ohshima, S., Horisaka, M., Maeda, Y., Nonaka, I., Ohira, Y. Tension- and afferent input-associated responses of neuromuscular system of rats to hindlimb unloading and/or tenotomy // American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology. 2004. V. 287. R76-86.

2. Kalashnikov V.E., Tyganov, S.A., Turtikova, O.V., Kalashnikova, E.P., Glazova, M.V., Mirzoev, T.M., Shenkman, B.S. Prochlorperazine withdraws the delayed onset tonic activity of unloaded rat soleus muscle: a pilot study // Life. 2021. Vol. 11. 1161.

3. Boulenguez P., Liabeuf, S., Bos, R., Bras H., Jean-Xavier C., Brocard C., Stil A., Darbon P., Cattaert D., Delpire E., et al. Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury // Nature medicine. 2010. V. 16. P. 302-307.

4. Vilchinskaya N.A., Krivoi I., Shenkman B.S. AMP-Activated Protein Kinase as a Key Trigger for the Disuse-Induced Skeletal Muscle Remodeling // International journal of molecular sciences. 2018. V.19. 3558.

5. Vitadello M., Germinario E., Ravara B., Libera L.D., Danieli-Betto D., Gorza L. Curcumin counteracts loss of force and atrophy of hindlimb unloaded rat soleus by hampering neuronal nitric oxide synthase untying from sarcolemma // J. Physiol. 2014. V. 592. P. 2637–265.

6. McClung J.M., Judge A.R., Powers S.K., Yan Z. p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting // Am J Physiol Cell Physiol. 2010. V. 298. P. 542–9.

Роль саркоплазматических Ca/АТФ-азных каналов SERCA в регуляции сигнализации при трехсуточной функциональной разгрузке мышц крыс

Заринова К.А.^{1*}, Белова С.П.¹, Шенкман Б.С.¹, Немировская Т.Л.¹

¹Институт медико-биологических проблем РАН;

katsu.no.himitsu@gmail.com

При длительной гипокинезии, гравитационной разгрузке, иммобилизации конечности, а также при длительном лишении человека обычной двигательной активности скелетные мышцы подвергаются атрофии в результате нарушающегося баланса между синтезом и деградацией белка. Мы предположили, что АТФ и «медленный» Ca²⁺ могут стимулировать запуск этих процессов. В скелетных мышцах деполяризующие стимулы индуцируют как быстрый сигнал кальция, связанный с сокращением, так и медленный сигнал, который регулирует экспрессию генов. Накапливающийся в цитоплазме мышечных волокон кальций активно откачивается в саркоплазматический ретикулум с помощью «насоса» SERCA. Это активный процесс, т.к. кальций закачивается в саркоплазматический ретикулум против градиента концентрации, и для этого используется кальций-зависимый гидролиз АТФ. Мы предположили, что при функциональной разгрузке SERCA инактивируется, из-за чего кальций может накапливаться в цитоплазме и активировать катаболические сигнальные пути.

Для проверки гипотезы о роли снижения активности SERCA при ограничении функциональной активности мышц в регуляции клеточных сигнальных путей и снижении сократительных характеристик мышц был применён CDN1163 (специфический активатор SERCA) в модели функциональной разгрузки. При моделировании функциональной разгрузки скелетных мышц использовалась методика Ильина-Новикова в модификации Morey–Holton. Для эксперимента были взяты 24 самца крыс линии Wistar, которые были разделены на 3 группы по 8 животных в каждой: С – контроль; HS – трехдневное вывешивание; CDN – трехдневное вывешивание с введением CDN1163 (50 мг/кг веса животного, внутривенно). Эксперимент был одобрен комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ — ИМБП РАН (протокол №584) и соответствует современным нормам и стандартам работы с животными.

После 3 суток вывешивания в группе HS мы обнаружили достоверное снижение веса камбаловидной мышцы относительно группы С, однако в группе CDN снижение было меньше, чем в гр. без препарата HS ($p < 0,05$). Содержание АТФ в группе HS было на 24% выше, чем в гр.С ($p < 0,05$). Введение активатора SERCA в группе 3CDN предотвратило эти изменения. При вывешивании на фоне накопления АТФ наблюдается тенденция к снижению фосфорилирования АМРК. При этом в группе CDN, где предотвращено накопление АТФ, наблюдается увеличение фосфорилирования АМРК в два раза по сравнению с вывешиванием без введения препарата, указывая на корреляцию активности АМРК и накопления АТФ. Так как SERCA регулирует содержание ионов кальция в миоплазме, было определено содержание ведущих маркеров кальций-зависимых сигнальных путей. В группе HS наблюдалось увеличение фосфорилирования CaMKII на 204% и содержания IP3R на 41% относительно группы контроля ($p < 0,05$). Введение CDN на фоне вывешивания предотвращает увеличение фосфорилирования CaMKII и содержания IP3R. Ранее показано, что IP3R-зависимые медленные сигналы Ca²⁺ могут участвовать в активации специфических транскрипционных программ фенотипа медленных и быстрых мышечных волокон.

Мы оценили уровни экспрессии ключевых в атрофическом процессе убиквитина и E3-убиквитинлигаз. Экспрессия мРНК убиквитина и E3-убиквитинлигаз MuRF1, MAFbx и Cbl-b была существенно повышена в группе HS относительно контроля на 158, 37, 136 и 101% соответственно. Введение препарата при 3-х дневном вывешивании предотвратило увеличение экспрессии мРНК MuRF1 (но не MAFbx) и существенно снизило увеличение экспрессии Cbl-b и убиквитина в группе с введением препарата (CDN) ($p < 0,05$). Экспрессия E3-убиквитинлигаз может регулироваться несколькими транскрипционными факторами, например, MYOG, FOXO3. Уровень фосфорилирования FoxO3 был одинаково снижен во всех вывешенных группах (HS и CDN) относительно группы контроля. Экспрессия MYOG была повышена в группе HS на 14% относительно контроля ($p < 0,05$). В группе CDN уровень мРНК MYOG не отличался от группы контроля. Таким образом,

предотвращение экспрессии E3-лигазы MuRF1 при введении активатора SERCA связано со снижением транскрипционной активности миогенина.

Анализ маркеров анаболического сигналлинга показал, что уровень фосфорилирования p-p70S6K не менялся при 3-х дневном вывешивании крыс, а фосфорилирование 4E-BP и P90RSK было одинаково снижено в обеих вывешенных группах – HS и CDN. Однако, фосфорилирование сайтов рибосомного белка S6 (Ser240/244) и (Ser235/236) было снижено только в группе HS на 83 и 55% соответственно по сравнению с контролем ($p < 0,05$), а введение препарата предотвратило это снижение. Уровень фосфорилирования eEF2 растет на 148% в группе HS по сравнению с контрольной группой, что снижает скорость процессов элонгации в ненагруженных мышцах. Введение активатора SERCA полностью предотвратило увеличение фосфорилирования eEF2. GSK-3b может регулировать как анаболические, так и протеолитические процессы, поскольку является эндогенным ингибитором синтеза белка и промотором деградации белка. Мы обнаружили снижение фосфорилирования GSK-3b в группе HS на 26% относительно группы контроля ($p < 0,05$), которое было полностью предотвращено введением CDN1163.

Вывод: при 3-дневной функциональной разгрузке m. soleus введение активатора SERCA не влияло на маркеры mTORC1-зависимого сигналлинга, но предотвращало снижение фосфорилирования анаболических маркеров – GSK3b, eEF2 и белка S6 малой субъединицы рибосомы, что в совокупности могло способствовать улучшению эффективности трансляции. Транскрипционные факторы FoxO3 и MYOG активируются при функциональной разгрузке m. soleus, но к регуляции экспрессии E3 лигаз MuRF1 и Cbl-b при активировании SERCA может иметь отношение MYOG. Активатор SERCA CDN1163 влияет на регуляцию Ca-зависимых сигнальных путей при мышечной разгрузке, через изменение фосфорилирования CaMKII и уровня IP3R.

Работа выполнена при финансировании гранта РФФ № 21-15-00228

Роль фосфорилирования сердечного миозин-связывающего белка С в кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия

Копылова Г.В.^{2*}, Кочурова А.М.², Бельдия Е.А.^{1,2}, Титова К.^{1,2}, Кружаев А.^{1,2}, Бершицкий С.Ю.², Щепкин Д.В.²

¹УРФУ, г Екатеринбург, Россия;

²Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г Екатеринбург, Россия;
g_rodionova@mail.ru

Введение

Сокращение сердца осуществляется благодаря взаимодействию миозина толстых нитей саркомера с актином тонких нитей и регулируется кальцием. В отсутствие кальция тропомиозин (Trpm) закрывает сайты связывания миозина на актине («блокирующее» состояние), при связывании кальция тропонином С тропомиозин перемещается по актину, открывая часть сайтов («закрытое» состояние), присоединение миозина к актину дальше активирует тонкую нить («открытое» состояние) [McKillop, Geeves, Biophys J., 1993]. В кальциевой регуляции сокращения принимает участие сердечный миозин-связывающий белок-С (сMyBP-C), сдвигая Trpm из «блокирующего» состояния в «закрытое» [Mun et al., PNAS, 2014; Wang et al., Compr Physiol., 2018]. В N-концевой части молекулы сMyBP-C содержатся сайты фосфорилирования (Ser275, Ser284 и Ser304). Фосфорилирование сMyBP-C ускоряет сокращение, увеличивая вероятность связывания миозина с актином и скорость развития силы [Sadayappan, de Tombe, Biophys Rev, 2012; Lynch et al. J Mol Cell Cardiol., 2021]. Мы исследовали влияние фосфорилирования сMyBP-C на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия в миокарде, используя in vitro подвижную систему (ИПС).

Методы исследования

Актин экстрагировали из скелетных мышц кролика. Миозин получали из левого желудочка сердца свиньи. Сердечный альфа-Trpm человека экспрессировали в E.coli. Тропониновый (Tn) комплекс человека был предоставлен И.А. Катруха (МГУ им А.В. Ломоносова). Регулируемые тонкие нити реконструировали из F-актина, Tn и Trpm. N-терминальные фрагменты человеческого сMyBP-C (C0-C2 фрагменты) с аминокислотными заменами S275D, S284D и S304D, имитирующими фосфорилирование, экспрессировали в E.coli.

Влияние фосфорилирования сMyBP-C на актин-миозиновое взаимодействие изучали в ИПС, которая позволяет регистрировать движение флуоресцентно-окрашенных нитей актина или тонких нитей по поверхности миозина в проточной ячейке [Kopylova et al., BBRC, 2017]. Скорость движения нитей анализировали программой GMimPro [Mashanov&Molloy, Biophys. J., 2007; Matyushenko et al., Biochemistry, 2017]. Кальциевую зависимость скорости нитей аппроксимировали уравнением Хилла и определяли следующие параметры: максимальную скорость нитей при насыщающей концентрации кальция, кальциевая чувствительность (pCa_{50}) – значение pCa , при котором скорость полумаксимальная, и коэффициент кооперативности Хилла. Эксперименты проводились

трижды. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Сравнения проводились по U-критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$).

Для исследования влияния фрагментов сМуВР-С на мостик-мостиковую (Хб-Хб) кооперативность проанализировали зависимость скорости тонких нитей от концентрации миозина и определили его концентрацию (с50), при которой скорость нитей является полумаксимальной.

Результаты

Для исследования влияния фосфорилирования сМуВР-С на актин-миозиновое взаимодействие мы проанализировали зависимость скорости скольжения F-актина по миозину в ИПС от концентрации C0-C2 фрагментов. Добавление C0-C2 фрагментов дозо-зависимо снижало скорость скольжения F-актина. Мы определили значение концентрации фрагментов C0-C2, при которой скорость F-актина уменьшилась в два раза. Это значение составило 288.4 ± 35.9 нМ, 161.8 ± 48.9 нМ и 244.2 ± 13.4 нМ для C0-C2, S304D C0-C2 и S274D/S285D C0-C2, соответственно.

Влияния фосфорилирования C0-C2 фрагмента на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия исследовали, анализируя кальциевую зависимость скорости тонких филаментов по миозину в ИПС. Добавление $0.5 \mu\text{M}$ C0-C2 фрагмента на 25% снижало максимальную скорость тонких нитей и увеличивало кальциевую чувствительность скорости с 4.93 ± 0.05 до 5.72 ± 0.02 рСа. Фосфорилированные формы C0-C2 фрагмента на 30% уменьшали максимальную скорость нитей, их кальциевую чувствительность (до 5.34 ± 0.03 с S304D C0-C2 и 5.50 ± 0.04 с S274D/S285D C0-C2) и коэффициент кооперативности Хилла по сравнению с нефосфорилированной формой. Кроме того, фосфорилированные C0-C2 фрагмента увеличивало скорость тонких нитей при низких концентрациях кальция.

Хб-Хб кооперативность является одним из механизмов кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия. Фосфорилирование C0-C2 фрагмента влияло на Хб-Хб кооперативность. Значение с50 без добавления фрагментов сМуВР-С было равно 60.4 ± 10.5 мкг/мл миозина, добавление C0-C2 фрагментов в концентрациях $0.5 \mu\text{M}$ и $1 \mu\text{M}$ усиливало мостик-мостиковую кооперативность, уменьшая это значение. При обеих его концентрациях нефосфорилированный фрагмент уменьшал с50 примерно на 30 мкг/мл, а его фосфорилированные формы – на 40 мкг/мл.

Обсуждение

На модели трансгенных мышей показано, что при низких концентрациях кальция фосфорилирование N-терминальной части сМуВР ускоряет циклирование поперечных мостиков, а при его высоких концентрациях замедляет его и пролонгирует время жизни поперечных мостиков за счет увеличения связывания молекул сМуВР-С с актином [Lynch et al. J Mol Cell Cardiol., 2021]. Мы обнаружили, что фосфорилирование сМуВР-С усиливает актин-миозиновое взаимодействие при низких концентрациях кальция и замедляет циклирование мостиков при насыщающей концентрации кальция. Результаты наших экспериментов показывают, что механизм действия фосфорилирования сМуВР-С на актин-миозиновое взаимодействие может быть различен при насыщающей и ненасыщающей концентрациях кальция.

Эксперименты выполнены на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН и поддержаны грантом РФФИ № 22-14-00174.

Снижение активности АМРК способствует ускорению дифференцировки первичных миобластов, выделенных из атрофированной *m. soleus* крысы

Вильчинская Н.А.^{1*}, Мирзоев Т.М.¹, Шенкман Б.Ш.¹

¹Институт медико-биологических проблем РАН;
vilchinskayanatalia@gmail.com

Функциональная разгрузка скелетных мышц приводит к развитию атрофических процессов и снижению общего числа сателлитных клеток, осуществляющих регенерацию этих мышц. В исследованиях *in vitro* было выявлено усиление дифференцировки миобластов камбаловидной мышцы на фоне снижения активности АМФ-активируемой протеинкиназы (АМРК) после действия функциональной разгрузки. АМРК необходима для активации сателлитных клеток, участвует в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки. Можно предположить, что снижение активности АМРК после действия механической разгрузки способствует усилению/ускорению дифференцировки миобластов и усиленному формированию миотуб. Основная цель данного исследования состояла в изучении участия АМРК в регуляции процессов дифференцировки миобластов камбаловидной мышцы, подвергшихся действию гравитационной разгрузки.

Для проверки этой гипотезы применили специфический активатор АМРК – АICAR для предотвращения снижения фосфорилирования АМРК при дифференцировке миобластов *in vitro*, выделенных из камбаловидных мышц крыс подвергшихся 7-суточному воздействию функциональной разгрузки. С помощью метода ПЦР в реальном времени оценивали уровень экспрессии МРФ, факторов слияния миобластов и экспрессию различных

изоформ ТЦМ. При помощи методов иммуноцитохимии определяли индекс дифференцировки миотуб. Уровень активности АМРК измерялся вестерн блоттингом.

В дифференцирующихся миоблестах, полученных из m.Soleus после 7 суточного вывешивания, наблюдается снижение содержания фосфо-АМРК, фосфо-ACC и фосфо-гpS6 по сравнению с контрольными миоблестами, при инкубации таких миобластов с АICAR содержание этих белков не отличается от уровня контрольной группы. Применение АICAR при дифференцировке миобластов камбаловидной мышцы после действия функциональной разгрузки предотвращает усиление экспрессии мРНК MyoD, Miogenin, Mymx и быстрых изоформ ТЦМ IIb и IIcx, способствует поддержанию экспрессии мРНК медленных изоформ ТЦМ I и Ia. В дифференцирующихся миоблестах полученных из m.Soleus после 7 суточного вывешивания наблюдается увеличенный индекс дифференцировки миотуб, при действии АICAR на такие миоблесты уровень дифференцировки миотуб возвращается к значениям контрольной группы.

Таким образом, аномально ускоренная дифференцировка миобластов, выделенных из атрофированной камбаловидной мышцы крысы компенсируется поддержанием контрольного уровня активности АМРК с помощью АICAR. При этом нормализуется повышенная экспрессия МРФ, факторов слияния миобластов, а также ряда изоформ тяжёлых цепей миозина. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 20-75-10080.

Сравнение влияния тропомодулина1 на актин-миозиновое взаимодействие в сердечной и скелетных мышцах

Кочурова А.М.^{1*}, Бельдия Е.^{1,2}, Сазонова Е.^{1,2}, Щепкин Д.¹, Копылова Г.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук;

² Уральский Федеральный Университет им. Б.Н. Ельцина, г Екатеринбург, Россия;
kochurova.a.m@mail.ru

Введение. Для сокращения поперечнополосатых мышц необходима строго упорядоченная структура сократительного аппарата, в том числе определенная длина и стабильность тонких нитей, которые контролируются рядом белков, включая тропомодулин (Tmod). Tmod взаимодействует с медленно растущим минус-концом актиновой нити и двумя молекулами тропомиозина (Тpm). В сократительном аппарате миокарда и скелетных мышц экспрессируется изоформа Tmod1. Показано, что Tmod влияет на силогенерирующую способность скелетных мышц. Нокаут гена TMOD1 приводил к появлению изоформы Tmod3 на минус-конце актиновой нити и падению генерируемой мышцами силы. Ранее мы обнаружили, что Tmod принимает участие в актин-миозиновом взаимодействии в миокарде, и эффект его зависит от изоформ Tmod [Kopylova et al. 13th International Multiconference on “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology” – BGRS/SB-2022. Novosibirsk, 04-08 of July, 2022. P. 46-47], что может объясняться разницей аминокислотной последовательности в N-концевой части изоформ тропомодулина, содержащей сайты связывания тропомиозина. Мы сравнили влияние Tmod1 на актин-миозиновое взаимодействие в левом желудочке сердца и быстрых скелетных мышцах.

Материалы и методы. Миозин получали из левого желудочка сердца барана и быстрой скелетной мышцы psoas кролика. Актин и скелетный тропонин (Tn) выделяли из m. psoas кролика. Сердечный тропонин (Tn), альфа-тропомиозин (Тpm) и Tmod1 человека экспрессировали в E.coli. Для исследования молекулярного механизма влияния Tmod1 на актин-миозиновое взаимодействие использовали in vitro подвижную систему (ИПС). Регулируемы тонкие нити реконструировали в проточной ячейке из флуоресцентно окрашенного F-актина, Тpm и Тn. С сердечным миозином использовали нити, содержащие сердечный Тn, со скелетным миозином – скелетный Тn.

Результаты. Обнаружено, что Tmod1 по-разному влияет на актин-миозиновое взаимодействие в миокарде и скелетных мышцах. Tmod1 дозо-зависимо снижал скорость скольжения актин–Тpm нитей, содержащих актин и Тpm, по сердечному миозину в ИПС: концентрация Tmod1, при которой скорость нитей уменьшалась в два раза, составила 59.4±2.9 нМ. Tmod1 не оказывал эффекта на скорость актин–Тpm нитей со скелетным миозином. Влияние Tmod1 на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия исследовалось путем анализа зависимости скорости скольжения тонких нитей по миозину от концентрации кальция в ИПС. Добавление 500 нМ Tmod1 снижало на 0.15 рСа кальциевую чувствительность (концентрацию кальция, при которой скорость нитей полумаксимальная) скорости скольжения тонких нитей по сердечному миозину, и не влияло на характеристики кальциевой зависимости скорости со скелетными белками. Одним из механизмов регуляции актин-миозинового взаимодействия является активация тонких нитей поперечными мостиками миозина, мостик-мостиковая кооперативность (Хb-Хb кооперативность). Мы изучили влияние Tmod1 на Хb-Хb кооперативность, анализируя в ИПС зависимость скорости актин–Тpm нитей от концентрации миозина, загружаемого в

проточную ячейку. Tmod1 улучшал Xb-Xb кооперативность с сердечным миозином, уменьшая концентрацию, при которой скорость достигает половины от максимальной, но не влиял на неё со скелетным миозином.

Заключение. Для сравнения эффекта Tmod1 на актин-миозиновое взаимодействие в миокарде и быстрых скелетных мышцах мы использовали изоформы белков (миозин, Tn и Trm), экспрессирующиеся в этих мышцах. Tmod1 уменьшал кальциевую чувствительность актин-миозинового взаимодействия и усиливал Xb-Xb кооперативность с сократительными белками миокарда, но не влиял на характеристики взаимодействия скелетного миозина с актином. Таким образом, эффект тропомодулина на актин-миозиновое взаимодействие зависит от изоформного состава сократительных и регуляторных белков.

Эксперименты выполнены на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН и поддержаны грантом РФФИ № 22-24-00729.

Структурные и функциональные особенности тропомиозина с мутациями, ассоциированными с нарушением развития миокарда

Щепкин Д.В.^{1*}, Кочурова А.¹, Бельдия Е.^{1,2}, Кубасова Н.³, Цатурян А.³, Левицкий Д.⁴, Бершицкий С.¹, Ямпольская Д.⁴, Матюшенко А.⁴, Копылова Г.¹

¹Институт иммунологии и физиологии УрО РАН;

²УрФУ, г. Екатеринбург, Россия;

³Институт механики МГУ, г. Москва, Россия;

⁴Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия;

cmypb@mail.ru

Показано, что тропомиозин (Trm) участвует не только в регуляции мышечного сокращения, но и в развитии сердца, а именно в «созревании» миокарда желудочков, которое заключается в уплотнении сети волокон миокарда и сужении межтрабекулярных лакун (McKeown et al., Dev. Dyn., 2014). Обнаружены мутации в гене TPM1, кодирующем сердечный альфа-тропомиозин (Trpm1.1), ассоциированные с некомпактной кардиомиопатией левого желудочка (НМЛЖ) и врождёнными пороками сердца (ВПС) (Chang et al., Mol. Genet. Metab., 2011; England et al., J. Mol. Cell Cardiol., 2017). Мы исследовали структурно-функциональные свойства Trpm1.1 с НМЛЖ и ВПС мутациями L113V, I130V, D159N, R160H и S229F.

С помощью дифференциальной сканирующей калориметрии мы обнаружили, что все мутации влияют на доменную структуру Trpm1.1. Для выполнения регуляторной функции необходимо взаимодействие N- и C-концов соседних молекул тропомиозина на актиновом филаменте (F-актин). Мы оценили влияние мутаций на это взаимодействие, измеряя вязкость раствора Trpm1.1. Мутация R160H ухудшала взаимодействие N- и C-концов молекул Trm, а все остальные мутации усиливали его.

Мы проанализировали влияние мутаций на взаимодействие Trpm1.1 с F-актином. Мутации I130V и D159N уменьшали аффинность Trpm1.1 к F-актину, а остальные не влияли на него. Эффект мутаций на термостабильность F-актин-Trm комплекса мы исследовали по измерению светорассеяния раствора F-актина с Trpm1.1. Мутация R160H снижала термостабильность комплекса, а мутация D159N увеличивала её.

Для исследования влияния мутаций на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия в предсердиях и желудочках мы проанализировали кальциевую зависимость скорости скольжения тонких филаментов, реконструированных из F-актина, тропонина и Trpm1.1, по миозину предсердий и желудочков в *in vitro* подвижной системе. Эффекты мутаций зависели от изоформ миозина. Мутации D159N и R160H существенно снижали максимальную скорость тонких филаментов при насыщающей концентрации кальция по миозину желудочков. Мутации L113V и D159N в Trpm1.1 уменьшали, а I130V и S229F увеличивали максимальную скорость филаментов по миозину предсердий. Мутации I130V, D159N и R160H уменьшали кальциевую чувствительность скорости скольжения филаментов по миозину предсердий.

Моделирование молекулярной динамики показало, что мутация L113V вызывает изменения структурных свойств Trpm1.1, в том числе в участках молекулы, которые удалены от места внесения аминокислотной замены. Мутации D159N и R160H не оказывали существенного влияния на изгибную жесткость молекулы Trm. Отсутствие изменений изгибной жёсткости молекулы Trm с мутациями D159N и R160H указывает на то, что функциональные изменения регуляции актин-миозинового взаимодействия, вызванные этими мутациями, видимо, не связаны непосредственно с изменением механических свойств молекулы Trm.

Таким образом, мутации тропомиозина, ассоциированные с НМЛЖ и ВПС, влияют на характеристики актин-миозинового взаимодействия в миокарде желудочков и предсердий.

Эксперименты выполнены на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН и поддержаны госпрограммами 122022200089-4, 122041100022-3 и АААА-А19-119012990119-3.

Теоретическое исследование ориентационных, термодинамических и релаксационных свойств клетки эукариот

Никитюк А.С.^{1*}, Баяндин Ю.В.¹, Наймарк О.Б.¹

¹*Институт механики сплошных сред УрО РАН;*

nas@icmm.ru

Механические свойства клеток эукариот являются важными биофизическими маркерами онкологической патологии. В частности, существует большое количество прямых доказательств того, что опухолевые клетки являются более мягкими и менее вязкими по сравнению с клетками в норме. Также установлено, что жесткость клеток напрямую связана с инвазивностью опухолевого заболевания. В ряде других исследований показано, что метастатические раковые клетки, которые были выделены из опухоли, менее жесткие и обладают более высоким миграционным и инвазивным потенциалом, чем первичные опухолевые клетки. Кроме того, в последнее время появляется все больше данных о том, что цитоактиновый скелет живых клеток наряду с упругостью может проявлять признаки пластичности (ductility), а цитоскелет опухолевых клеток склонен к охрупчиванию (fragility).

Можно выделить три ключевые особенности механического поведения клетки эукариот. В зависимости от экспериментального подхода и исследуемых временных масштабов клетки проявляют как упругие, так и вязкие свойства. Вязкоупругое поведение клетки может быть описано степенным законом с одним или двумя показателями степени для широкого спектра временных или частотных масштабов. Модуль упругости клеток пропорционален величине предварительной нагрузки, за исключением небольшой остаточной жесткости при нулевом предварительном нагружении. В настоящее время не существует модели, отражающей полную феноменологию механического поведения клетки эукариот.

Для теоретического исследования механики единичных клеток наиболее распространенными являются структурно-механические и реологические модели со степенным законом, при этом они имеют серьезные недостатки. Для описания степенного характера вязкоупругого поведения клетки необходимо большое количество параллельно соединенных максвелловских элементов в структурно-механических моделях. В связи с этим появляется большое количество параметров, требующих экспериментальной идентификации и верификации. Наиболее зарекомендовавшей себя с точки зрения соответствия результатов экспериментов в широком диапазоне временных масштабов реологической моделью со степенным законом является модель с одним или более фрактальными элементами. Данные элементы описываются с помощью дробных производных, физический смысл которых с точки зрения структуры объекта исследования остается не ясным.

Основными компонентами, влияющими на механические свойства раковых клеток, являются цитоактиновый скелет, ядро и внеклеточная матрица. При рассмотрении выделенной из ткани, отдельной клетки цитоактиновый скелет можно представить, как активный механический элемент, ядро – как пассивный механический элемент, обладающий вязкоупругими свойствами, при этом влиянием внеклеточной матрицы можно пренебречь. Цитоактиновый скелет следует учитывать, как активный элемент механической системы ввиду двух экспериментально установленных фактов. Во-первых, при определенном внешнем механическом или биохимическом воздействии актиновые волокна стремятся ориентироваться в определенных направлениях. Во-вторых, в отсутствие каких-либо воздействий происходит деполимеризация волокон цитоскелета клетки.

Тогда механическое поведение клетки стоит рассматривать подобно характерным деформационным зависимостям полимерных систем. В следствии этого возможно предположить, что прогрессия нераковой клетки в раковую может сопровождаться фазовым переходом при механическом рассмотрении проблемы. Наиболее зарекомендовавшими себя подходами к исследованию фазовых переходов являются методы статистической термодинамики.

Целью работы является применение статистико-термодинамической теории к разработке теоретического описания механического поведения клетки эукариот, учитывающего её структурные свойства. В работе обсуждаются ориентационные свойства цитоактинового скелета клетки эукариот и вводится, описывающий их, параметр порядка. Получен вид свободной энергии актиновых волокон цитоскелета клетки. На основе первого и второго законов термодинамики, а также принципа Онсагера для линейного случая связи сил и потоков получены эволюционные уравнения для упругих и ориентационных элементов механической системы. Предложено использовать ориентационно-вязкоупругое тело как модель представительного объема клетки эукариот и получены эволюционные уравнения. Также введен спектр релаксации для структурно-механических моделей. Выполнено сопоставление результатов моделирования на основе различных существующих моделей клетки и предлагаемой в данной работе модели, кроме того проанализирована возможность описания двойного степенного закона вязкоупругой релаксации живых клеток.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственный контракт № АААА-А19-119013090021-5), а также поддержана Грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (№ МК-44.2022.1.1).

Участие PI3K и IP3R в регуляции атрофических процессов в скелетных мышцах при функциональной разгрузке

Зарипова К.А.^{1*}, Белова С.П.¹, Шенкман Б.С.¹, Немировская Т.Л.¹

¹Институт медико-биологических проблем РАН;

katsu.no.himitsu@gmail.com

Ранее показано, что IP3R-зависимые медленные сигналы Ca^{2+} могут участвовать в активации специфических транскрипционных программ мышечных волокон. Цель работы: проверка гипотезы об участии IP3R и PI3K в развитии атрофических процессов в скелетных мышцах на ранних этапах функциональной разгрузки. Мы также впервые исследовали, имеет ли влияние передача АТФ-опосредованных сигналов в мышце *in vivo* при функциональной разгрузке на активацию кальций-зависимых сигнальных путей и экспрессию рецепторов инозитол 1,4,5 трифосфата (IP3R). Для этого мы провели эксперимент с 3-дневным вывешиванием крыс и ингибированием киназы PI3 (PI3K). PI3K катализирует фосфорилирование фосфатидилинозитолдифосфата (PIP2), давая PIP3 высоко заряженный остаток, который рекрутирует фосфолипазу C (PLC) в мембрану, запуская гидролиз PIP2 на диацилглицерин и IP3. IP3 связывается с IP3R, присутствующими как в ядерной оболочке, так и в саркоплазматической сети, вызывая слабый сигнал высвобождения кальция, как в цитозоле, так и в нуклеоплазме, что способствует активации факторов транскрипции, приводящих к экспрессии или репрессии генов, вовлеченных в фенотип мышечных клеток. При функциональной разгрузке мышц концентрация кальция в миоплазме существенно возрастает. Если наша гипотеза верна, то воздействие на IP3R при ингибировании PI3K во время функциональной разгрузки мышц предотвратит, или существенно снизит экспрессию ключевых мышечных E3-лигаз MuRF1 и MAFbx и будет препятствовать активации транскрипционных факторов, влияющих на фенотип мышц.

Для проведения эксперимента были взяты 24 самца крыс линии Wistar и распределены на 3 группы по 8 крыс в каждой: контроль группа с введением плацебо (C); группа 3-суточного антиортостатического вывешивания с введением плацебо (HS); группа 3-суточного антиортостатического вывешивания с введением ингибитора PI3K LY294002 (LY, 30 мг/кг веса животного, внутривенно). Эксперимент был одобрен комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ — ИМБП РАН (протокол №617) и соответствует современным нормам и стандартам работы с животными.

Мышцы *m. soleus* крыс, вывешенных без введения препарата, подверглись существенной атрофии по сравнению с группой контроля (на 33%, $p < 0,05$). Вес мышц в группе с введением препарата был достоверно выше, чем в группе вывешивания с введением плацебо. Уровень АТФ в группе с введением ингибитора LY не отличался от группы C, тогда как в группе вывешивания был повышен на 24% ($p < 0,05$). Уровень pAMPK в *m. soleus* в группе LY также не отличался от группы контроля в то время, как в группе, вывешенной без препарата (HS), он был снижен на 37%. Содержание IP3R увеличивается при вывешивании на 41% относительно контроля ($p < 0,05$), а введение препарата предотвращает эти изменения. Мы измерили содержание маркеров кальций-зависимой передачи сигналов — CaMK II β и CaN. Фосфорилирование CaMKII было увеличено на 59% ($p < 0,05$) в ненагруженной камбаловидной мышце (гр. HS) относительно группы контроля, однако введение ингибитора PI3K предотвратило эти изменения. Аналогичные результаты получены для кальцинеина. Его экспрессия в *m. soleus* группы LY была ниже на 16%, чем в группе, вывешенной без препарата ($p < 0,05$).

В группе HS уровень экспрессии мРНК E3-лигаз MuRF1 и MAFbx, а также убиквитина был существенно выше (на 82, 137 и 158% соответственно, $p < 0,05$), чем в группе контроля. Введение ингибитора PI3K полностью предотвратило повышение экспрессии мРНК MuRF1 в группе LY, и существенно снизило в ней экспрессию MAFbx и убиквитина (на 22 и 119% соответственно относительно группы вывешивания без препарата, $p < 0,05$). В группе с введением ингибитора LY при вывешивании уровень маркеров белкового синтеза IRS-1, 4E-BP, фосфорилирование рибосомного белка S6 — не отличались от уровня группы контроля в то время, как в группе HS эти параметры были существенно снижены (на 34, 15 и 55 (для pS6(Ser235/236) и 83% (для pS6(Ser240/244) соответственно), $p < 0,05$).

Итак, ингибирование фосфоинозитид-3-киназы при функциональной разгрузке *m. soleus* предотвращает накопление в ней АТФ, замедляет атрофию *m. soleus*, а также экспрессию E3 лигаз и убиквитина, предотвращает повышение содержания IP3-рецепторов, регулирует активность кальций-зависимых сигнальных путей — снижает экспрессию мРНК CaN и фосфорилирование CaMKII; влияет на регуляцию маркеров анаболической передачи сигналов — предотвращает снижение фосфорилирования 4E-BP, рибосомного белка S6; а также предотвращает снижение скорости элонгационных процессов, предотвращая фосфорилирование eEF2.

Работа выполнена при финансировании гранта РНФ № 21-15-00228

Цитоскелет камбаловидной мышцы в условиях миопатии критических состояний

Тыганов С.А.^{1*}, Зарипова К.А.¹, Туртикова О.В.¹, Скитева Е.Н.^{1,2}, Кондратьев С.А.², Забродская Ю.М.²,
Шенкман Б.С.¹

¹ГНЦ РФ ИМБП РАН;

²РНХИ им. проф. А. Л. Поленова – филиал НМИЦ им. В.А. Алмазова;
[sentackle@yandex.ru](mailto:sentakle@yandex.ru)

Состояние функциональной разгрузки скелетных мышц наблюдается при иммобилизации в травматологии, у больных, находящихся на длительном постельном режиме, при спинальных травмах и опорно-двигательных нарушениях. Данное состояние приводит, помимо прочих эффектов, к разрушению и дестабилизации цитоскелета мышц. Миопатия критических состояний (СІМ) является следствием современного лечения в анестезиологии и интенсивной терапии, включая фармакологические вмешательства и применение устройств, поддерживающих жизнь пациента. Условия СІМ создают уникальную ситуацию, когда наблюдается полная потеря механических раздражителей в скелетных мышцах, т. е. потеря внешнего напряжения, которое определяется весом тела, и внутреннего напряжения, которое зависит от мышечных сокращений (Rebeca C. Kalamgi and Lars Larsson; 2016). Поражение мышц у реанимационного больного по своей природе неспецифично и является следствием нескольких процессов: адаптивная реакция на тяжелое повреждение организма, очаговое или тотальное повреждение ЦНС, повреждение спинномозговых нервов, нервно-мышечных синапсов, повреждение мышц, неспецифическое действие лекарственных препаратов. По этой причине, понимание молекулярных механизмов, регулирующих состояние скелетных мышц важно для разработки эффективных реабилитационных программ и возможных фармакологических вмешательства, которые могут предотвратить или облегчить потерю массы и функции скелетных мышц у пациентов с хроническим нарушением сознания (ХНС).

Целью данной работы являлось исследование влияния СІМ на цитоскелет камбаловидной мышцы человека. Мы провели детальный анализ большого числа цитоскелетных белков и внеклеточного матрикса у пациентов с хроническим нарушением сознания, которое приводит к такой миопатии. Инцизионные мышечные биопсии из камбаловидной мышцы были взяты у 8 пациентов, проходящих лечение в отделении анестезиологии и реанимации РНХИ им. проф. А.Л. Поленова. В качестве контроля использовались мышечные биоптаты, взятые у здоровых мужчин с помощью игольчатой биопсии методом Бергстрема. Оценка степени выраженности парезов (снижение силы мышц) у пациентов с ХНС является трудной задачей в виду отсутствия или выраженного снижения объема и спектра целенаправленных реакций, выполнения команд. У всех пациентов, включенных в исследование, отмечался глубокий тетрапарез преимущественно носивший диффузный характер, латерализация парезов выявлена у двоих пациентов в обоих случаях этиологическим фактором ХНС являлась черепно-мозговая травма. Изменения мышечного тонуса у пациентов с ХНС в основном представлены спастикой с несколькими, наиболее распространенными паттернам. Мышечные биоптаты, взятые у пациентов, замораживались в жидком азоте сразу после взятия. Содержание белков цитоскелета было проанализировано с помощью вестерн-блоттинга, ПЦР в реальном времени и гистохимического анализа.

Морфологическое исследование камбаловидных мышц у пациентов с ХНС показало колоссальную атрофию мышечных волокон и замещение их объема соединительной тканью. Мы наблюдали снижение площади поперечного сечения мышечных волокон на 73%, экспрессию эмбриональных миозинов, указывающая на денервацию, нарушение структуры цитоскелетных белков, фиброз, отложение липидов и снижение запасов гликогена, которые могут оказать негативное влияние на качество жизни больного, а также существенно осложнить этап реабилитации. Дальнейшее изучение цитоскелета с помощью ПЦР и вестерн-блоттинга помимо очевидного подтверждения атрофических изменений показало сдвиг миозинового фенотипа в сторону «быстрых» (гликолитических) мышечных волокон. Об этом свидетельствует как смена экспрессии самих тяжелых цепей миозина, так и вспомогательных структурных белков актининов, талина, тропомиозина. Разрастание же внеклеточного матрикса, по нашим данным, идет за счет повышения экспрессии коллагена Іа и коллагена Іа. Считается, что эти изменения могут зависеть от многих факторов, например от синдрома системного воспалительного ответа и сепсиса. Однако, использование животных моделей с искусственной вентиляцией легких позволило исключить влияние этих системных факторов на скелетные мышцы, при сохранении схожих атрофических изменений (Rebeca C. Kalamgi and Lars Larsson; 2016). Кроме того, было также показано, что сепсис сам по себе не приводит к развитию мышечного фенотипа при СІМ (Friedrich et al., 2015). Таким образом, на данный момент существует проблема определения пусковых механизмов развития СІМ.

Работа поддержана грантом РФ № 22-25-00615.

Экспрессия белка теплового шока 90 на плазматической мембране клеток фибросаркомы человека HT1080, находящихся в разных физиологических условияхЖмурина М.А.^{1*}, Врублевская В.В.¹, Скарга Ю.Ю.¹, Петренко В.С.¹, Моренков О.С.¹¹*Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ
РАН, Пуццино, Россия;
mariya100694@gmail.com*

Миграция клеток является сложным биофизическим процессом, представляющим собой направленное движение одной или группы клеток в ответ на ряд биохимических (цитокины, хемокины, ростовые факторы) и биофизических сигналов, как внеклеточных, так и внутриклеточных. Клеточная миграция, основанная на функционировании актино-миозинового комплекса, играет критическую роль во многих физиологических и патологических процессах: в эмбриональном развитии организмов, при ранозаживлении, метастазировании опухолевых клеток, ремоделировании тканей. Известно, что белок теплового шока 90 (Hsp90), кроме выполнения важных внутриклеточных функций, связанных с его шаперонной активностью, активно секретируется во внешнюю среду и экспрессируется на поверхности клеток. Экстраклеточный Hsp90 функционирует в качестве мотогена, стимулирует процессы миграции и инвазии клеток *in vitro*, участвует в процессах ранозаживления и метастазирования опухолевых клеток *in vivo*. Существует две изоформы Hsp90, индуцибельная изоформа Hsp90 α и конститутивная изоформа Hsp90 β . Hsp90 α считается более эффективным стимулятором клеточной миграции и инвазии, чем Hsp90 β . Механизм действия экстраклеточного Hsp90 основывается на рецептор-зависимой активации сигнальных путей, обеспечивающих клеточную подвижность. Основными рецепторами Hsp90 являются LRP1 и HER2. Показано, что помимо белковых рецепторов важную роль в связывании Hsp90 на плазматической мембране играют поверхностные клеточные гепарансульфат протеогликаны (ГСПГ). Роль взаимодействия ГСПГ с мембрана-ассоциированным Hsp90 в процессах миграции/инвазии клеток в настоящее время не ясна, однако десульфирование и деградация ГСПГ приводит к значительной потере мембрана-ассоциированного Hsp90 с плазматической клеточной мембраны, что коррелирует со сниженной клеточной подвижностью. Однако, экспрессия Hsp90 на клеточной мембране в разных типах клеток и в разных физиологических условиях исследована недостаточно.

Целью работы было исследование мембранной экспрессии двух изоформ Hsp90 в клетках фибросаркомы человека HT1080, находящихся в разных физиологических условиях. Для изучения мембранной экспрессии Hsp90 был использован метод иммунофлуоресценции с последующей регистрацией с помощью проточной цитофлуориметрии. В клетках фибросаркомы человека HT1080 мембрана-ассоциированные Hsp90 окрашивали с использованием Hsp90 α - и Hsp90 β -специфических антител, вторичных анти-видовых Alexa488-меченных антител с последующей детекцией результатов с помощью проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter). Для дифференциации Hsp90, связанных с белковыми рецепторами или с ГСПГ, клетки обрабатывали гепарином – конкурентным ингибитором связывания Hsp90 с ГСПГ.

Несмотря на невысокий уровень Hsp90 на плазматической мембране клеток HT1080 (количество мембрана-ассоциированного Hsp90 в 500 – 1000 раз меньше, чем внутриклеточного Hsp90) Hsp90 играет важную роль в миграции клеток, так как обработка клеток Hsp90-специфическими поликлональными кроличьими антителами приводила к снижению миграции и инвазии клеток HT1080 *in vitro*. Мембрана-ассоциированные Hsp90 α и Hsp90 β существенно различались по аффинности взаимодействия с ГСПГ: Hsp90 β были существенно более чувствительны к гепарину в сравнении с Hsp90 α . Диссоциация Hsp90 β от ГСПГ наблюдалась уже при концентрации гепарина 20 мкг/мл, в то время как диссоциация Hsp90 α начиналась только при 50 мкг/мл. В клетках, находящихся на экспоненциальной и стационарной фазах роста, доля Hsp90 α , ассоциированного с ГСПГ, составляла 30-50%, в то время, как доля ГСПГ-ассоциированного Hsp90 β составляла 60-80%. При переходе от экспоненциальной к стационарной фазе роста клеток наблюдалось снижение уровня Hsp90 α и Hsp90 β на клеточной поверхности на 30-40%. При этом снижение экспрессии Hsp90 α и Hsp90 β на мембране было связано с уменьшением количества ГСПГ-ассоциированных Hsp90, в то время как уровень Hsp90, связанных с белковыми рецепторами, практически не зависел от фазы клеточного роста.

Показано, что культивирование клеток HT1080 в отсутствии сыворотки в течении 24 ч приводит к незначительному снижению мембранной экспрессии Hsp90 α (примерно на 10%), при этом около 75% Hsp90 α оказывалось связанным с белковыми рецепторами, в то время как в клетках, культивируемых в среде с сывороткой, доля рецептор-связанного Hsp90 α составляла 60-70%. В отличие от Hsp90 α , содержание Hsp90 β на плазматической мембране клеток после «сывороточного голодания» резко снижалось (примерно на 70%) в основном за счет потери Hsp90 β , ассоциированного с ГСПГ, в то время как уровень рецептор-ассоциированного Hsp90 β оставался неизменным в клетках, культивируемых в бессывороточной среде и среде с сывороткой.

Смена среды у клеток или простое перемешивание среды без ее смены уже через 2 ч приводило к повышению на 40-50% уровня мембрана-ассоциированных Hsp90 α и Hsp90 β в сравнении с клетками, находящимися в неподвижных культуральных флаконах. Мы полагаем, что данные манипуляции приводят к

изменению клеточного микроокружения, что существенно влияло на экспрессию Hsp90 α и Hsp90 β на поверхности клеток.

Таким образом, мы обнаружили, что мембранная экспрессия двух изоформ Hsp90, которые играют важную роль в сложном биофизическом процессе - клеточной миграции, существенно зависит от условий культивирования клеток. При этом наибольшие изменения в мембранной экспрессии отмечались у Hsp90 β , в то время как Hsp90 α была менее подвержена изменениям. В менее благоприятных физиологических условиях (стационарная фаза роста клеток, отсутствие сыворотки) снижается уровень именно ГСПГ-ассоциированных Hsp90 α и Hsp90 β . На данный момент связь пролиферации и миграции клеток с уровнем мембрана-ассоциированных Hsp90 α и Hsp90 β не определена. Также необходимы дальнейшие исследования для выяснения механизма транслокации Hsp90 на мембрану и роли ГСПГ в этом процессе.

Биофизика сложных многокомпонентных систем. Математическое моделирование. Биоинформатика

Кардиопротекторный эффект донора NO в модели сердечной недостаточности

Каримова Р.Г.^{1*}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;
Rufiya77@yandex.ru

В развитие сердечной недостаточности вовлечены множество сигнальных путей клетки, в том числе и оксид азота (NO). Сниженная биодоступность NO при хронической сердечной недостаточности служит основанием для применения доноров оксида азота (II) с целью компенсации физиологических процессов при этой патологии.

Влияние донора NO на электрокардиографические параметры изучали на крысах с фенилэфриновой моделью хронической сердечной недостаточности. В роли донора NO было выбрано соединение, содержащее фуросановое кольцо – 4-хлор-6,7-фуросанобензофуразан. Ранее нами была доказана его NO-донорская активность.

Результаты электрокардиографии показали, что фенилэфриновая модель хронической сердечной недостаточности характеризуется изменениями в электрокардиограмме крыс. Отмечено уменьшение продолжительности зубца Р, увеличение продолжительности комплекса QRS, интервала RR и QT, кроме того у 15 % крыс зарегистрирована косовосходящая депрессия сегмента ST. Частота сердечных сокращений у крыс в модели хронической сердечной недостаточности была повышена, которая восстанавливалась на 36,8 % ($p < 0,05$) при введении 4-хлор-6,7-фуросанобензофуразана.

У 46 % крыс в модели хронической сердечной недостаточности была выявлена тахикардия, у 9 % крыс - мерцательная аритмия. Отмеченные нарушения ритма полностью восстановились при введении донора NO. Длительность и амплитуда зубца Р уменьшились у крыс в модели хронической сердечной недостаточности в 1,4 раза ($p < 0,05$) и 2,3 раза ($p < 0,05$), соответственно. Введение 4-хлор-6,7-фуросанобензофуразана увеличило продолжительность зубца Р до прежнего показателя, при этом его амплитуда осталась без изменений. У крыс в норме отсутствует зубец Q, поэтому вместо длительности интервала P-Q измеряется длительность интервала P-R. У крыс в модели хронической сердечной недостаточности длительность интервала P-R увеличена в 1,66 раза ($p < 0,05$). При введении 4-хлор-6,7-фуросанобензофуразана интервал P-R уменьшился до уровня интактных животных. Зубец Q появился у 55% у крыс с хронической сердечной недостаточностью. После введения донора NO наличие зубцов Q и их амплитуда у крыс в модели хронической сердечной недостаточности сохранилась. Введение донора NO привело к восстановлению продолжительности комплекса (Q)RS на 23 % ($p < 0,05$).

Таким образом, методом электрокардиографии установлено увеличение ЧСС, сужение зубца Р, снижение амплитуды зубца Р, R и Т, удлинение комплекса (Q)RS и (Q)RT у крыс в модели хронической сердечной недостаточности до показателей интактных животных.

Кардиопротекторный эффект донора NO подтвердился и биохимическими исследованиями: восстановлением сывороточной активности лактатдегидрогеназы, а также уровня натрия и хлора.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00167

BioGraph: компьютерная модель данных для стандартизации поиска и запросов разнородных биологических метаданных

Велькович А.В.¹, Орлов Ю.О.², Митић Н.М.^{1*}

¹Белградский университет, факультет математики, Белград, Сербия;

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия;
nenad.mitic@matf.bg.ac.rs

Изучение связи функции генов, заболеваний и реконструкции сети регуляторных генов требует совместимости данных. Данные из разных баз данных следуют разным схемам и доступны неоднородными способами. Хотя эксперименты различаются, данные могут относиться к одним и тем же биологическим

объектам. Некоторые объекты могут не быть строго биологическими, например, геолокации мест обитания или ссылки на литературу, но они обеспечивают более широкий контекст для других объектов. Одни и те же объекты из разных наборов данных могут иметь схожие свойства, которые могут быть обнаружены или отсутствовать в других наборах данных. Совместная одновременная выборка данных из нескольких источников данных сложна для конечного пользователя или, во многих случаях, не поддерживается и неэффективна из-за различий в структурах данных и способах доступа к данным.

Мы предлагаем BioGraph — новую модель, которая позволяет соединять и извлекать информацию из связанных биологических данных, полученных из различных наборов данных. Мы протестировали модель на метаданных, собранных из 5 различных общедоступных наборов данных, и успешно построили граф знаний, содержащий более 2 500 000 отдельных объектов сущностей, связанных между собой более чем 4 миллионами отношений. Модель позволяет выбирать сложные шаблоны и извлекать совпадающие результаты, которые можно обнаружить только путем объединения данных из нескольких источников. Биологические данные весьма разнообразны.

Данные, полученные в результате экспериментов по кристаллизации белков, сильно отличаются от данных, полученных в результате экспериментов по нарушению белков. Однако оба эксперимента могут дать информацию об одних и тех же биологических объектах, в данном случае об одних и тех же белках. Поскольку белки получены из генов, эксперименты, связанные с соответствующими генами, также могут предоставить ценную информацию в более широкой картине, если они связаны с данными о белках. Однако запись белка из одной базы данных может не содержать точного свойства, которое связывает его с соответствующим геном из другой базы данных, и, возможно, для установления этой связи требуется третья база данных. Некоторые базы данных, такие как MobiDB [1], содержат широкий спектр идентификаторов сущностей, полученных из нескольких баз данных, но поиск основан только на точном сопоставлении свойств, без возможности создания сложных запросов с использованием различных атрибутов метаданных. Практическим примером сложного запроса к нескольким базам данных может быть выбор генов опухолевых антигенов человека, связанных с белками с содержанием нарушений выше определенного значения. Такой мощный механизм запросов недоступен при использовании доступных методов запроса данных в отдельных базах данных, но требует определенного уровня унификации и связывания данных.

Использование графа знаний для соединения данных из источников биологических данных не является новой идеей [2]. Графы знаний являются фундаментальной структурой для интеллектуального здравоохранения [3]. Существует много активных инициатив по объединению данных из нескольких наборов данных в граф знаний, но большинство доступных в настоящее время решений сосредоточены на конкретных подобластях, таких как открытие лекарств и протеомика, редко на общей связи общих биологических данных из различных областей. Мы представляем новую модель, которая позволяет одновременно запрашивать свойства биологических данных из нескольких наборов данных на основе запроса метаданных, доступных из исходных баз данных. Модель ориентирована не на копирование данных из исходных наборов данных, а на связывание метаданных таким образом, чтобы их можно было использовать для эффективного выполнения сложных запросов к связанным данным. Модель позволяет добавлять свойства к сущностям и отношениям и унифицировать метаданные из различных форматов данных. Также были разработаны инструмент и веб-интерфейс, использующие новую модель данных. Инструмент и соответствующие пакеты можно развернуть локально как автономную систему, чтобы запросы можно было выполнять в автономном режиме. Предустановленный веб-интерфейс BioGraph в настоящее время доступен по адресу <http://andromeda.matf.bg.ac.rs:54321>.

Для проверки предложенной модели и ее реализации мы успешно собрали и объединили метаданные из пяти наборов данных различного формата: DisProt [4], HGNC [5], TAntigen 2.0 [6], IEDB [7] и DisGeNET [8].

Литература

1. Piovesan, D.; Del Conte, A.; Clementel, D.; Monzon, A.M.; Bevilacqua, M.; Aspromonte, M.C.; Iserte, J.A.; Orti, F.E.; Marino-Buslje, C.; Tosatto, S.C. MobiDB: 10 years of intrinsically disordered proteins. *Nucleic Acids Research* 2023, 51, D438–D444.
2. Ji, S.; Pan, S.; Cambria, E.; Marttinen, P.; Yu, P.S. A Survey on Knowledge Graphs: Representation, Acquisition, and Applications. *IEEE Transactions on Neural Networks and Learning Systems* 2022, 33, 494–514. <https://doi.org/10.1109/TNNLS.2021.3070843>.
3. Wu, X.; Duan, J.; Pan, Y.; Li, M. Medical knowledge graph: Data sources, construction, reasoning, and applications. *Big Data Mining and Analytics* 2023, 6, 201–217.
4. Vucetic, S.; Obradovic, Z.; Vacic, V.; Radivojac, P.; Peng, K.; Iakoucheva, L.M.; Cortese, M.S.; Lawson, J.D.; Brown, C.J.; Sikes, J.G.; et al. DisProt: a database of protein disorder. *Bioinformatics* 2004, 21, 137–140.4.
5. Seal, R.L.; Braschi, B.; Gray, K.; Jones, T.E.; Tweedie, S.; Haim-Vilmovsky, L.; Bruford, E.A. Genenames.org: the HGNC resources in 2023. *Nucleic Acids Research* 2023, 51, D1003–D1009.
6. Zhang, G.; Chitkushev, L.; Olsen, L.R.; Keskin, D.B.; Brusica, V. TANTIGEN 2.0: a knowledge base of tumor T cell antigens and epitopes. *BMC bioinformatics* 2021, 22, 1–8.
7. IEDB. Retrieved from <http://www.iedb.org>. Accessed: 2023-02-06

8. Piñero, J.; Juan Manuel, R.A.; Josep Saüch-Pitarch, F.R.; Emilio Centeno, F.S.; Furlong, L.I. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update. Nucl. Acids Res. 2019. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1021>.

Структурно-динамические модели и ИК спектры хроменопиридинкарбонитрильных и пиридо[1,2-а]пиримидиновых систем

Перетокина (Ивлиева) И.В.^{1*}, Бабков Л.М.¹, Мещерякова А.А.¹, Сорокин В.В.¹
¹Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия ;
Irine09@yandex.ru

Соединения, содержащие хромено[3,4-с]пиридиновый фрагмент, проявляют противомикробную, противоопухолевую, антибактериальную, противовоспалительную и другие виды биологической активности. Пиридо[1,2-а]пиримидиновые системы обладают широким спектром фармакологической активности. Представлены результаты исследований строения и ИК спектров впервые синтезированных хроменопиридинкарбонитрильных систем: 5-амино-2,4-диимино-3-(пиридин-2-ил)-2,3,4,10b-тетрагидро-1H-хромено[3,4-с]пиридин-1-карбо-нитрила (I) и 4-амино-2,5-диимино-3-(пиридин-2-ил)-2,3,5,10b-тетрагидро-1H-хромено[3,4-с]пиридин-1-карбонитрила(II); пиридо[1,2-а]пиримидиновых систем: изомерных 4-амино-2-арил-6H-пиридо[1,2-а]пиримидин-3-карбонитрилов (III, IV) и их открытых форм – 2-(арил(пиридин-2-иламино)метил)малонитрилов (V, VI) [1-3]. Синтез I и II осуществлялся на основе 2-(2-амино-3-циано-4H-хроменил)малонитрила и 2-аминопиридина при кипячении эквимольного соотношения реагентов в изопропиловом спирте. Полученные продукты реализовывались в виде смеси таутомеров в соотношении 49,56 : 50,44% [1]. Ряд пиридо[1,2-а]пиримидиновых систем (III, IV) и их открытые формы (V, VI) получены методом трехкомпонентной реакции 2-амино-пиридина, малонитрила и ароматических альдегидов в этаноле [2,3]. В нормальных условиях в диапазоне 400—3700 см⁻¹ на Фурье-спектрометре модели Shimadzu IRAFFINITY-1 измерены ИК спектры образцов, синтезированных веществ, запрессованных в таблетках KBr. Методом теории функционала плотности B3LYP/6-31g(d), реализованным в программном пакете GAUSSIAN'03 [4], построены структурно-динамических модели соединений I-VI. Установлено, что при таутомерном переходе I- II изменяется угол поворота кольца R4 относительно остальной части молекулы, длины некоторых связей изменяются в пределах ~0,1Å. На основе анализа измеренных и спектров смесей и рассчитанных их компонент, выделены спектрально-структурные признаки компонентов смесей I – VI, подтверждающие их наличие в смеси.

Интенсивные полосы измеренного ИКС 2295-2210см⁻¹ и 1640-1580 см⁻¹, относящиеся к колебаниям групп -C≡N, =NH, -NH₂, являются признаками таутомеров I, II. Полоса 3483 см⁻¹ соответствует колебанию q(NH) группы NH₂ соединения I, а полоса 3439см⁻¹ - колебанию q(NH) группы NH₂ соединения II. Полосы 2222 и 1543 см⁻¹ соответствуют колебаниям QR4(C≡N) и βR3(CCH), QR3(CC) соединений III и IV, полосы 959 и 754 см⁻¹ – колебаниям колец R1 и R3. Полосы 2208 и 1605 см⁻¹ соответствуют колебаниям QR4(C≡N), QR2R4(CC), QR3(NO), QR2(CC) и βR2(CCH), βR2 R(CCH) соединений V и VI, а полосы 1348 и 856 см⁻¹ - колебаниям колец R1. Т.о. интерпретированы измеренные ИК спектры хроме-но[3,4-с]пиридиновых и пиридо[1,2-а]пиримидиновых систем и идентифицированы их компоненты I–V.

Библиографический список

1. Nikulin A. V., Meshcheryakova, A. A., Sklyar, A. E., Vasilkova, N. O., Sorokin, V. V., Krivenko, A. P.. Fusion of Pyrimidine and Pyridine Rings to Substituted 4H-Chromenes //Russian Journal of Organic Chemistry. – 2021. – Т. 57. – №. 10. – С. 1650-1655.
2. Ивонин М. А., Тюлькина, И. Р., Мещерякова, А. А., Бурыгин, Г. Л., Сорокин, В. В.. Трехкомпонентный синтез новых аминотианов ряда пиридопиримидина//Химия биологически активных веществ. – 2019. – С. 134-135.
3. Таутомерия и. к. ц. Трехкомпонентный синтез и кольчато-цепная таутомерия пиридо [1, 2-а] пиримидинкарбонитрилов //Журнал органической химии. – 2020. – Т. 56. – №. 2. – С. 307-309.
4. Frisch J., Trucks G.W., Schlegel H.B. Gaussian03, Revision B.03; Gaussian, Inc., Pittsburgh PA. 2003. 302 p.

**Автоматизированная методика разметки полисомнографических записей на основе
технологии параллельных вычислений**

Журавлев М.О.^{1*}, Уколов Р.В.¹, Руннова А.Е.^{1,2}

¹СГУ;

²СГМУ;

zhuravlevmo@gmail.com

Состояние сна сегодня рассматривается как активный нейрофизиологический процесс, сопровождаемый относительно циклическими изменениями в физиологической и психологической активности. Соответственно, несколько исследований продемонстрировали важность сна для различных функций, таких как синаптический гомеостаз [1], восстановление мозга при токсических нарушениях [2], консолидация памяти [3] и обработка эмоций [4, 5].

В настоящее время отдельной и весьма трудоёмкой задачей в области изучения сна является детектирование различных стадий сна [6, 7] во время анализа полисомнографических данных. В настоящее время существует значительное количество методов и алгоритмов для автоматического детектирования стадий сна основанные на анализе различных сигналов: электроэнцефалограммы (ЭЭГ) [8, 9, 10], воздушного потока [11], сигналы акселерометра [12], электрокардиограмма (ЭКГ) [13, 14]. Однако, не смотря на значительные успехи в области разработки автоматических алгоритмов детектирования стадий сна в медицинских целях данные алгоритмы почти не применяются из-за низкого уровня точности, которая в первую очередь связана с высокой вариабельностью полисомнографических записей, а также из-за значительного времени анализа с использованием существующих методов.

Настоящая работа посвящена разработке автоматизированного алгоритма для детектирования различных стадий сна на основе частотно-временного анализа биофизических сигналов, зарегистрированных во время ночного мониторинга, с использованием технологии параллельных вычислений на GPU. Разработанный в рамках данной работы адаптивный алгоритм для автоматического детектирования различных стадий сна основан на использовании методов непрерывного вейвлетного преобразования [9, 10, 15] с использованием технологии параллельных вычислений, разработанная методика показала свою работоспособность и достаточно высокое качество распознавания стадий сна, в среднем различие между автоматизированной системой разметки стадий сна и разметкой врача-сомнолога составляли 80-85%, что ничем особо не уступает свои предшественникам по качеству детектирования стадий, но существенным преимуществом разработанной методики является значительное сокращение времени, необходимого для проведения разметки стадий сна. Стоит отметить, что ещё одним несомненным преимуществом разработанного алгоритма является реализация адаптационных алгоритмов выделения стадий сна под каждого пациента на основе предварительного анализа биоэлектрических сигналов, что в дальнейшем может позволить увеличить точность разметки, при введении дополнительных тестов перед регистрацией полисомнографии.

Работа поддержана проектом РФФИ № 22-72-10061

[1] Cirelli C, Tononi G (2015) Sleep and synaptic homeostasis. *Sleep* 38:161–162

[2] Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiagarajan M, O'Donnell J, Christensen DJ, Nicholson C, Iliff JJ, Takano T, Deane R, Nedergaard M (2013) Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*. 342(6156):373–377

[3] Siegel JM (2001) The REM sleep-memory consolidation hypothesis. *Science* 294:1058–1063

[4] van der Helm E, Gujar N, Walker MP (2010) Sleep deprivation impairs the accurate recognition of human emotions. *Sleep* 33: 335–342;

[5] Goldstein AN, Walker MP (2014) The role of sleep in emotional brain function. *Annu Rev Clin Psychol* 10:679–708

[6] Brown R. E. et al. Control of sleep and wakefulness //Physiological reviews. – 2012.

[7] Chen K. S. et al. A hypothalamic switch for REM and non-REM sleep //Neuron. – 2018. – Т. 97. – №. 5. – С. 1168-1176. e4.

[8] Van Hese P. et al. Automatic detection of sleep stages using the EEG //2001 conference proceedings of the 23rd annual international conference of the IEEE engineering in medicine and biology society. – IEEE, 2001. – Т. 2. – С. 1944-1947.

[9] Zhou J., Wu X., Zeng W. Automatic detection of sleep apnea based on EEG detrended fluctuation analysis and support vector machine //Journal of clinical monitoring and computing. – 2015. – Т. 29. – №. 6. – С. 767-772.

[10] Sharma M. et al. Automated detection of sleep stages using energy-localized orthogonal wavelet filter banks //Arabian Journal for Science and Engineering. – 2020. – Т. 45. – №. 4. – С. 2531-2544.

[11] Nakano H. et al. Automatic detection of sleep-disordered breathing from a single-channel airflow record //European Respiratory Journal. – 2007. – Т. 29. – №. 4. – С. 728-736.

- [12] Yeo M., Koo Y. S., Park C. Automatic detection of sleep stages based on accelerometer signals from a wristband //IEIE Transactions on Smart Processing and Computing. – 2017. – Т. 6. – №. 1. – С. 21-26.
- [13] Shinar Z. et al. Automatic detection of slow-wave-sleep using heart rate variability //Computers in Cardiology 2001. Vol. 28 (Cat. No. 01CH37287). – IEEE, 2001. – С. 593-596.
- [14] Khemiri S., Aloui K., Naceur M. S. Automatic detection of slow-wave sleep and REM-sleep stages using polysomnographic ECG signals //Eighth International Multi-Conference on Systems, Signals & Devices. – IEEE, 2011. – С. 1-4.
- [15] Hramov, Alexander E., et al. Wavelets in neuroscience. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015.

Агентная модель рост опухоли с учетом тканевого напряжения и поступления питательных веществ

Колобов А.В.^{1*}, Кузнецов М.Б.¹

¹*Физический институт им.П.Н.Лебедева Российской академии наук (ФИАН);
kolobov@lebedev.ru*

В докладе представлена модель роста опухоли на основе внерешеточных агентов, описывающая опухоль как сеть пролиферирующих клеток, динамика которых зависит от стресса, создаваемого межклеточными связями. Использован метод учета опухолевых клеток и учета межклеточных связей, обеспечивающий плавную динамику клеточной сети и позволяющий сохранить относительную численную дешевизну. В то же время такое описание точно воспроизводит эффекты, характерные для более сложных подходов, такие как вытягивание клеток в сторону области низкого давления и тенденцию к максимальному увеличению площади контакта между клетками. Моделирование свободного роста опухоли, ограниченного только остаточным напряжением, возникающим внутри опухоли, демонстрирует существенное влияние гидравлической проводимости ткани и силы межклеточного взаимодействия на форму опухоли и скорость роста. Моделирование компактного роста опухоли в пределах нормальной ткани показывает, что сильное взаимодействие между опухолевыми клетками является основным фактором, существенно ограничивающим рост опухоли. Кроме того, показано неоднозначное влияние размера нормальной ткани и силы взаимодействия нормальных клеток на опухолевый рост, характер которого качественно меняется в зависимости от величины гидравлической проводимости ткани. Моделирование роста опухоли в нормальной ткани с учетом питательных веществ, которые также влияют на поведение опухолевых клеток, дают разные режимы роста опухоли, в том числе рост без насыщения в течение как минимум нескольких лет с образованием крупных некротических ядер при низкой гидравлической проводимости ткани и достаточной высоким притоком питательных веществ, что качественно коррелирует с известными клиническими данными.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда грант № 22-21-00835.

Активное управление роботизированной жидкостью в конвективной петле с плавающими микрокиборгами

Ступникова А.В.^{1*}, Брацун Д.А.¹

¹*Пермский национальный исследовательский политехнический университет;
stypnast2014@yandex.ru*

В последние годы внимание исследователей привлекает активная жидкость, под которой понимается среда с активными элементами, способными самостоятельно перемещаться. Более строгое определение определяет активную жидкость как вязкую суспензию частиц, клеток, макромолекул, или бактерий, которые способны преобразовывать химическую энергию в механическую работу, создавая микроскопические напряжения в жидкости [1]. Было показано, что усилия большого числа активных элементов может приводить к таким макроскопическим явлениям в жидкости, как биоконвекция или спонтанный переход в сверхтекучее состояние.

В недавних работах ряда авторов была экспериментально продемонстрирована возможность создания не просто активной среды с самодвижением элементов, но среды нового типа, в которой оперирует рой микророботов. Например, в [2,3] была представлена технология производства большого числа микрокиборгов.

Дешевизна производства определяется тем, что биологической основой плавающего микрокиборга является живая бактерия. Для внешнего управления бактерией её тело покрывалось наночастицами, чувствительными к магнитному полю. Кроме того, геном бактерии модифицирован с целью появления у бактерий роевого сознания в виде чувства кворума (QS). Это означает, что бактерии могут использовать диффузионные сигналы для регулирования экспрессии генов, зависящей от плотности популяции. Была разработана методика создания микрокиборгов, обладающих хемо-чувствительностью, определено время его активации.

Таким образом, создание среды, насыщенной миллионами простых, но эффективных устройств, способных к самодвижению и коммуникации между собой, уже не является фантастикой. Гидромеханики пока не знакомы с этими работами, так как пловцы микрокиборги обсуждаются в замкнутых научных сообществах. Специалисты по управлению робототехническими системами, рассматривают жидкость лишь как среду обитания для их роботов, и также не в полной мере осознают перспективы. Авторы работы убеждены, что новый тип сред должен изучаться и ввести новый термин — роботизированная жидкость.

Данная работа посвящена исследованию динамики самоорганизации бактерий в тепловом поле, в рамках которого QS является поведенческой адаптацией и коллективным ответом на изменение среды. Мы предполагаем, что поскольку микрокиборги являются искусственно измененными бактериями, они могут быть запрограммированы на необходимый перечень свойств. В рамках данного исследования мы предполагаем, что плавающие микрокиборги обладают специальными теплочувствительными вставками. При попадании в тепловое поле, элементы роя двигаются по градиенту температуры. Поведение роя исследуется на примере простейшей конвективной системы: замкнутый канал, поперечное сечение которого много меньше характерного размера петли [4,5]. Конвективная петля заполняется несжимаемой жидкостью, неоднородно нагревается и помещается во внешнее силовое поле. Усредненные уравнения движения жидкости описывают одномерное течение жидкости, что делает задачу о конвективной петле простейшей моделью для изучения конвекции Рэлея-Бенара, а также модельной задачей для рассмотрения разнообразных гидродинамических явлений. Вопрос об управлении различными режимами конвективной неустойчивости в петле рассматривался в большом числе работ [4,5]. Управление сплошной средой, имеющей в общем случае бесконечное число степеней свободы, является важнейшим направлением механики сплошных сред.

В данной работе мы рассматриваем тороидальную петлю и предполагаем, что жидкость содержит рой плавающих микрокиборгов. Основная идея управления заключается в том, что каждый микрокиборг тяжелее жидкости и его перемещение в среде локально меняет плотность этой среды. При перемещении роя пловцов эффект может быть значительным. Предлагается два подхода для описания свойств системы: гибридный и сплошнوسредный. В рамках первого подхода мы рассматриваем совокупность микрокиборгов как сложную систему локально взаимодействующих между собой и жидкостью микроскопических элементов с индивидуальной динамикой на основе Аристотелевой механики (из-за сильной диссипативности процесса движения киборгов). Гибридность подхода определяется тем, что расчет поведения роя на каждом шаге по времени синхронизируется с расчетом движения жидкости. В рамках второго подхода мы разработали модель сплошной среды, в которой рой микрокиборгов рассматривается как эффективная суспензия жидкости с активной фазой.

В ходе численных экспериментов показано, что рой микропловцов может успешно поддерживать устойчивость неоднородно нагретой роботизированной жидкости даже при таких числах Рэлея, когда в однородной жидкости должна уже возникать конвекция. Так как скорость движения микрокиборгов в жидкости ограничена возможностями бактерии, важнейшим параметром конвективной системы является её характерный размер. Определен критический размер петли, при котором перестроения роя микропловцов не успевают вносить необходимые изменения в состояние системы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (проект № FSNM-2020-0026).

1. Saintillan D. Rheology of Active Fluids // Annu. Rev. Fluid Mech. – 2018. – Vol. 50. – P. 563-592.
2. Leaman E. J., Geuther B. Q., Behkam B. Quantitative investigation of the role of intra-/intercellular dynamics in bacterial quorum sensing // ACS synthetic biology. – 2018. – T. 7(4). – P. 1030-1042.
3. Leaman E. J., Geuther B. Q., Behkam B. Hybrid centralized/decentralized control of a network of bacteria-based bio-hybrid microrobots // J. Micro-Bio Robot. – 2019. – V. 15(1). – P. 1-12.
4. Брацун Д. А., Зюзгин А. В. Эффект возбуждения подкритических колебаний в стохастических системах с запаздыванием. Часть II. Управление равновесием жидкости // Компьютерные исследования и моделирование. – 2012. – Т. 4. – №2 – С. 369-389.
5. Bratsun D., Krasnyakov I., Zyuzgin A. Delay-induced oscillations in a thermal convection loop under negative feedback control with noise // Commun. Nonlinear Sci. Numer. Simul. 2017. – V.47. – P. 109-126.

Анализ генов, ассоциированных с развитием рецидивирующей мочекаменной болезни

Файзуллина Э.А.^{1*}, Шевелева О.Ю.¹, Молотков Т.П.¹, Орлов Ю.Л.¹, Алфимов А.Е.¹

¹Сеченовский Университет;
faiz.eline2000@yandex.ru

Данное исследование направлено на построение списка генов, связанных с развитием рецидивирующей мочекаменной болезни (МКБ), анализ генных онтологий и реконструкцию генной сети для выявления ключевых генов, связанных с этим заболеванием. Методически использовались биоинформационные подходы к анализу структуры генной сети, представленные ранее в работах студентов Сеченовского Университета для других заболеваний (Орлов и др., 2021; Дохоян и др., 2022)

Актуальность исследования обусловлена тем, что мочекаменная болезнь занимает одно из ведущих мест в структуре урологических заболеваний по частоте встречаемости, частоте обращений за скорой медицинской помощью и госпитализаций (Аполихин и др., 2014). По данным официальной статистики, в 2012 году показатель заболеваемости уролитиазом на 100 тыс. населения по Российской Федерации составил 550, при этом наблюдался значительный прирост количества заболевших по сравнению с 2002 г. (Аполихин и др., 2014). Рецидивы мочекаменной болезни после различных оперативных вмешательств в течение 5 лет могут иметь место у половины пациентов (Tiselius, 2006). Несмотря на то, что известен немалый перечень причин, ведущих к развитию уролитиаза, увеличение его распространенности практически во всех странах мира указывает на необходимость поиска новых факторов риска камнеобразования. В последнее десятилетие основным направлением изучения генетических факторов риска развития МКБ стало выявление ассоциации полиморфизма того или иного гена с МКБ. Результатами подобных исследований является установление наличия или отсутствия ассоциации полиморфизма гена с МКБ. Изучение таких ассоциаций имеет большое значение для понимания патогенеза заболевания и выбора тактики ведения больных уролитиазом.

Для составления списка генов, ассоциированных с развитием мочекаменной болезни, были использованы базы данных OMIM (<https://omim.org/>) и GeneCards (<https://www.genecards.org/>). Далее для анализа взаимодействий продуктов этих генов использован широкий набор биоинформатических инструментов, таких как Metascape (<https://metascape.org/>), GeneMANIA (<https://genemania.org/>), STRING-DB (<https://string-db.org/>). Для анализа категорий генных онтологий использовались ресурсы DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <https://david.ncifcrf.gov/>).

Изучение структуры генной сети и сравнение с предыдущими исследованиями по данной теме позволило выделить 45 генов-кандидатов и несколько ключевых генов, включая CASR, SLC26A1, AGXT. Аллели этих генов потенциально являются факторами риска для развития различных форм МКБ, в том числе рецидивирующего уролитиаза, и могут быть использованы в диагностической панели генов.

Анализ кластеров построенной сети показал, что наибольший вклад в проявление заболевания несут гены, относящиеся к кластерам: транспорт маленьких молекул, транспорт проксимальных канальцев, моноатомный катионный транспорт, синтез, секреция и действие паратиреоидного гормона, метаболизм глиоксиловой кислоты, процессы почечной системы, абсорбция минералов. Проведено исследование взаимосвязи списка генов и структуры сети взаимодействий (генной сети) с развитием данного заболевания и иных патологических состояний. В первую очередь к ним относятся: нефролитиаз, нефрокальциноз, камни в почках, гиперкальциурия, полиурия, почечная недостаточность. Систематический компьютерный поиск маркерных генов и лекарственных соединений отражает современные подходы к анализу фармацевтических продуктов (Koshechkin et al., 2022).

Полученные результаты по выделению маркерных генов могут быть полезны для дальнейшего исследования рецидивирующей мочекаменной болезни и для разработки новых методов лечения этого заболевания, так как предоставляют информацию о генах, которые могут быть потенциальными мишенями для лекарственных препаратов (Peeteren and Thongboonkerd, 2023).

Литература

1. Аполихин О.И., Сивков А.В., Москалева Н.Г., Солнцева Т.В., Комарова В.А. Анализ урологической заболеваемости и смертности в Российской Федерации за десятилетний период (2002-2012 гг.). Экспериментальная и клиническая урология. 2014; 2: 4-12.
2. Дохоян А.Ю., Глушенко М.В., Орлов Ю.Л. Реконструкция генной сети шизофрении для поиска генов-мишеней. Ульяновский медико-биологический журнал. 2022; 3: 6–22. doi: 10.34014/2227-1848-2022-3-6-22.
3. Орлов Ю.Л., Галиева А.Г., Орлова Н.Г., Иванова Е.Н., Мозылева Ю.А., Анашкина А.А. Реконструкция генной сети болезни Паркинсона для поиска генов-мишеней. Биомедицинская химия. 2021; 67(3): 222-230 doi: 10.18097/PBMC20216703222
4. Koshechkin K.A., Lebedev G.S., Fartushnyi E.N., Orlov Y.L. Holistic Approach for Artificial Intelligence Implementation in Pharmaceutical Products Lifecycle: A Meta-Analysis. Applied Sciences. 2022; 12(16):8373. doi: 10.3390/app12168373

5. Peerapen P., Thongboonkerd V. Protein network analysis and function enrichment via computational biotechnology unravel molecular and pathogenic mechanisms of kidney stone disease. Biomed J. 2023; 12:S2319-4170(23)00002-1. doi: 10.1016/j.bj.2023.01.001

6. Tiselius H.G. Patients attitudes on how to deal with the risk of future stone recurrences. Urol Res. 2006.; 34(4): 255-260. doi: 10.1007/s00240-006-0056-2

Анализ кривых дожития из Human Mortality Database с помощью мультифазной численной модели

Алексеев А.А.^{1,2*}

¹МГУ имени М.В.Ломоносова;

²Российский геронтологический научно-клинический центр;

alekseev@physics.msu.ru

Введение

В исследовании старения довольно часто рассматриваются кривые дожития, которые показывают уменьшение количества оставшихся животных в эксперименте на дожитие с течением времени относительно исходного их количества. Эти кривые используются как для общей оценки динамики смертности, а также и для вычисления средней (СПЖ) и максимальной (МПЖ) продолжительности жизни животных. Величины СПЖ и МПЖ используются для сравнительной оценки влияния различных факторов среды, а также генетических модификаций в задачах поиска геропротекторов (веществ, замедляющих процессы старения), а также генов, связанных с базовыми процессами старения или просто имеющих значимую корреляцию с возрастом (о том, что стоит за подобной корреляцией, далеко не всегда можно достоверно судить).

Также для анализа таких кривых применяются методы математической биологии, в частности, теоретические модели Гомертца и Вейбулла [2]. Хотя данные модели имеют развёрнутые математические основания, однако они не позволяют точно описать кривую дожития в ряде случаев, в том числе для данных из базы Human Mortality Database [3], или экспериментов для модельных животных, где кривая очевидно двухфазная — с низкой смертностью в молодом возрасте, и с негладким переходом к стадии ускоренного роста смертности: для карликовых мышей Эймса, где показан эффект «откладывания» экспоненциальной фазы старения в результате модификации рецептора гормона роста GHR [1], или для экспериментов на дожитие с 8926 особями дрозофил [4].

Однако, до последнего времени явным образом допущение двухфазности или многофазности при описании кривой дожития в литературе нам не известно, за одним исключением — в одной из глав в работе [5] рассматривалась двухфазная модель старения для кривых дожития дрозофил.

Методы

Нами была поставлена задача описание всего разнообразия кривых смертности для ряда животных различных групп (насекомые, пресмыкающиеся, млекопитающие) с помощью одной модели с различными наборами параметров для разных видов животных. В качестве первого шага мы взяли данные (кривые дожития) из базы [3], при этом были взяты несколько территориально удалённых стран, и когорты разных лет рождения.

В основу нашей численной модели было положена кусочно-заданная зависимость для коэффициента смертности (КС) от возраста, имеющая 5 фаз, включая фазу высокой смертности после рождения, уменьшение смертности в зрелом возрасте и экспоненциальный рост смертности (с определённого возраста) из-за старения. Модель имеет три параметра, определяющие смертности в начальный момент времени, в минимуме смертности и на «плато» в среднем возрасте. Кроме того, четыре параметра для возрастов перехода между фазами, а также коэффициент в показателе экспоненты. Также в модель добавлена коэффициент «стохастической» смертности, который не зависит от возраста, и не связан со старением. Итого, в модели 9 параметров.

Кроме того, модель явным образом учитывает гетерогенность популяции по «исходному здоровью» и описывает уменьшение стресс-устойчивости (СУ) организма при воздействии случайных внешних факторов, причём скорость снижения СУ пропорциональна априорно заданной многофазной зависимости КС от возраста.

В ходе расчётов «запас здоровья» каждого из группы «виртуальных индивидов» снижался, после снижения ниже определённой границы (которая также является параметром модели), для «индивида» фиксировался факт смерти. Таким образом, рассчитывалась вся кривая дожития. Для получения усреднённой кривой данный алгоритм выполнялся итеративно некоторое число раз (оптимальное его значение определено в ходе численных «экспериментов»).

Далее, для каждой рассмотренной кривой проводилась процедура идентификации параметров модели (фиттинг). Вычисления производились с помощью языка программирования R, оптимизационная задача решалась с помощью функции `optim`, доверительные интервалы для параметров оценивались с помощью процедуры бутстрэпа.

Результаты и выводы

Таким образом, были идентифицированы параметры модели для набора кривых дожития людей из базы [3], и, в целом, показана эффективность многофазного подхода при моделировании кривых дожития. Данный подход мы планируем в дальнейшем использовать для анализа кривых дожития для модельных животных, с целью выработки общего подхода к оценке параметров модели для эффекта «отложенного» старения [1], так и обоснования резонности использования величин МПЖ и СПЖ во множестве экспериментальных исследованиях в области старения, поскольку в величинах МПЖ и СПЖ отражаются как эффекты самого старения, так и множество особенностей постановки экспериментов, и воздействие факторов среды.

Литература

1. Bartke A. et al. Extending the lifespan of long-lived mice // Nature. – 2001. – Т. 414. – No. 6862. – P. 412-412.
2. Крутько В.Н., Донцов В.И. Системные механизмы и модели старения // М.: URSS. – 2008.
3. Human Mortality Database, <https://www.mortality.org/>
4. Handbook of The Biology of Aging Sixth Edition 2006, Fig. 10.1
5. Марчук Г.И. Геронтология in silico: становление новой дисциплины. – 2007. p. 377

Анализ палиндромных последовательностей в геноме SARS-CoV-2

Капунац С.К.¹, Белянски М.Б.¹, Митић Н.М.^{1*}

¹Белградский университет, факультет математики, Белград, Сербия;
nenad.mitic@matf.bg.ac.rs

Недавно было показано, что нуклеотидная последовательность генома SARS-CoV-2 организована в виде структурных и функциональных блоков информации разграниченных короткими последовательностями точек разрыва РНК, которые способствуют рекомбинации в определенных неслучайных местах внутри вирусного генома, состоящего из коротких повторяющихся последовательностей, а именно палиндромов. Палиндромные последовательности участвуют в формировании вторичных структур РНК. Это могут быть места, распознаваемые РНК-связывающими белками, а также места рекомбинации РНК [1].

Мы проанализировали геномы SARS-COV-2, уделяя особое внимание мутациям в палиндромных последовательностях. Набор данных из 423425 полных нуклеотидных последовательностей изолятов был извлечен из <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2> (25/08/2021г). После процесса очистки осталось 347962 изолятов с 123667 уникальными (имеющими соответствующую нуклеотидную последовательность) с 226624 уникальными белок-кодирующими нуклеотидными последовательностями, и 141926 уникальными аминокислотными последовательностями. Согласованность двух последовательностей проверяли с использованием стандартной таблицы генетического кода (transl_table 1). Каждая последовательность была снабжена аннотацией SARS-CoV-2 Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ).

Каждую нуклеотидную последовательность индивидуально выравнивали с эталонной последовательностью SARS-COV-2 (NC_045512.2) с использованием программы выравнивания MAFFT [2]. С помощью программы StatRepeats [3] были определены все палиндромы с минимальной длиной 8. Всего было определено 801 935 394 палиндрома. Среди них 785 854 841 повторов были идентичны их паре в эталонной последовательности NC_045512.2. Другие палиндромы (16.080.553) имеют некоторые мутации, связанные с эталонной последовательностью. Анализ количества встречаемости палиндромов проводился в 5 временных интервалах по 4 месяца с 31.12.2019. по 25.08.2021. Среднее число палиндромов на изолят показывает постоянное увеличение соответственно по временным интервалам: 1,92, 3,51, 9,31, 14,84 и 20,66.

Мы анализируем мутации во всех 12 типах ORF, присутствующих в наборе выделенных последовательностей (полипротеин ORF1a, полипротеин ORF1ab, поверхностный гликопротеин, белок ORF3a, белок оболочки, мембранный гликопротеин, белок ORF6, белок ORF7a, белок ORF7b, белок ORF8, нуклеокапсидный фосфопротеин, белок ORF10). Среди них, нормализованных по средней длине белка, после ORF1a и ORF1ab поверхностный гликопротеин (S-белок) имеет наибольшее количество повторов, в среднем 4,65 палиндрома при длине ≥ 8 . Наибольшее количество палиндромов расположено вокруг позиций 22.000 (левая часть) и 24.300 (правая часть), считая позиции относительно начала изолятов. Из общего числа мутаций почти 78% привели к аминокислотным изменениям в соответствующих белках.

В дальнейших исследованиях мы планируем провести подробный анализ мутаций палиндромных последовательностей в соответствии с классификацией вариантов SARS-CoV-2 ВОЗ, а также их влияние на изменения аминокислот и возникающие вторичные структуры или местоположения РНК, распознаваемые РНК-связывающими белками.

Литература

- [1] Gallaher, W. R.: A palindromic RNA sequence as a common breakpoint contributor to copy-choice recombination in SARS-COV-2, Archives of Virology. 2020; 165:2341–2348, <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04750-z>
- [2] Katoh, Rozewicki, Yamada: MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization, Briefings in Bioinformatics, 2019; 20:1160-1166
- [3] Jelovic, A., Mitic, N., Eshafah, S., and Beljanski, M.: Finding Statistically Significant Repeats in Nucleic Acids and Proteins, Journal of Computational Biology 2018; 25:375-387, doi 10.1089/cmb.2017.0046

База данных потенциальных промоторных последовательностей в геномах эукариот

Руденко В.М.^{1*}, Коротков Е.В.¹
¹ФИЦ Биотехнологии РАН;
v.m.rudenko@gmail.com

Промоторные области служат для инициализации процесса транскрипции и расположены выше кодирующих областей последовательностей ДНК. Определение их местоположения крайне актуально для решения задачи аннотации генома.

В эукариотических геномах промоторы имеют сложный состав. Они содержат специфические сайты связывания РНК полимеразы, а также регуляции транскрипции, в число которых входит инициатор (Inr), TATA-box, DPE и некоторые другие. При этом состав сайтов и их положение изменчиво. Ситуация усложняется тем, что у генов может быть не один, а несколько промоторов. Наличие альтернативных промоторов является причиной транскрипции с одного гена различных матричных РНК в зависимости от тканей и стадий развития организма.

Указанные сложности приводят к тому, что на сегодняшний день большинство биоинформационных методов поиска промоторов могут выявить лишь небольшую часть промоторных последовательностей. Также требуются априорные знания о структуре промотора. Известные промоторы, по большей части для модельных видов организмов, были определены экспериментальными методами и хранятся в банке данных EPD. Пользуясь этими данными, реально обучить нейронную сеть или построить Марковскую модель и при этом достичь высокой чувствительности метода при распознавании промоторов, сходных с представленными в обучающей выборке [1]. Однако возникает сложность с распознаванием промоторных последовательностей, если в них присутствует большое число мутаций по сравнению с последовательностями обучающей выборки, или же надо определить промоторы биологического вида, который отсутствует в EPD.

В нашей работе мы использовали для поиска промоторов МАНДС – метод множественного выравнивания сильнодивергентных последовательностей. МАНДС состоит из 4 шагов. На первом шаге в известном множестве промоторов конкретного биологического вида определяются классы. В случае, если нет данных по экспериментально подтвержденным промоторам, вместо них в качестве обучающей выборки берутся последовательности длины 600 нп, находящиеся в диапазоне -500..+100 нп относительно сайта старта транскрипции. На втором шаге строится множественное выравнивание последовательностей, входящих в каждый класс, и на основании этого выравнивания генерируется профиль или матрица класса. В зависимости от модификации метода при создании профиля учитываются частоты нуклеотидов или же динуклеотидов в различных позициях промотора. Далее для всех возможных фрагментов длины 650 нп хромосом определяется локальное выравнивание с профилем каждого класса промоторов. Длина промотора нами была определена как 600 нп, дополнительно 50 нп было предусмотрено на случай множественных вставок. Если вес выравнивания статистически значим, считается, что найдена потенциальная промоторная последовательность (ППС). Последний этап заключается в удалении перекрывающихся ППС с целью устранения избыточности в полученных результатах. Используя термин ППС, мы подчеркиваем тот факт, что определенные промоторные последовательности, обнаруживаются при помощи биоинформационных методов, но не подтверждены экспериментально.

Как видно, МАНДС можно использовать для поиска ППС в любом геноме. МАНДС не требует никакой априорной информации о структуре промоторов, поскольку он самостоятельно определяет эти структуры - профили.

МАНДС был применен для поиска ППС в геномах различных эукариот, а именно: *Oriza sativa*, *Capsicum annuum*, *Lactuca sativa* и *Homo sapiens*. Все обнаруженные ППС были размещены в базе данных, которая установлена на сервере Центра Биотехнологии ФИЦ Биотехнологии РАН [2]. Доступ осуществляется по ссылке: <http://victoria.biengi.ac.ru/cgi-bin/dbPPS/index.cgi>. Предполагается, что база данных будет пополняться ППС геномов других видов. Для каждого ППС хранится идентификатор, название биологического вида, номер

хромосомы, нить ДНК – прямая или обратная, длина ППС, левая и правая позиция в хромосоме, левая и правая позиция в профиле, сам профиль (или матрица класса), значение статистической значимости. Реализована функция фильтрации записей по этим параметрам. После задания параметров или их возможных диапазонов результаты представляются в виде списка с страничным выбором. Также есть возможность просмотра более детальной информации по каждому ППС, которая открывается при нажатии на кнопку “>>”. В открывающемся окне имеется гиперссылка на исходную хромосомную последовательность и выравнивание последовательности ППС относительно профиля. Также здесь можно увидеть множественное выравнивание, по которому рассчитывался профиль ППС.

Число идентифицированных методом MANHS ППС значительно превышает количество генов в указанных геномах. Так, например, для *Capsicum annuum* количество ППС составляет 825136, в то время как аннотированных генов всего 31600, т.е. наблюдается разница указанных величин в 26 раз. Похожая картина наблюдается и для других геномов. Возможно несколько причин такого расхождения. Во-первых, мы полагаем, что существуют неаннотированные в настоящее время гены, промоторы которых не определены. Во-вторых, часть промоторов может являться альтернативными, вследствие чего транскрипция с них идет только при определенных условиях. Также часть ППС пересекаются с мобильными генетическими элементами, число которых особенно много в растительных геномах.

Мы полагаем, что база данных ППС может представлять интерес в изучении генетической регуляции процесса транскрипции. Также представленные данные можно использовать в экспериментальных исследованиях, по изучению альтернативных путей транскрипции и в области генетической инженерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Umarov R., Solovyev V. Recognition of prokaryotic and eukaryotic promoters using convolutional deep learning neural networks. PLoS ONE 12, 2
2. Rudenko V., Korotkov E. Database of potential promoter sequences in the *Capsicum annuum* genome. Biology. 2022, 11, 1117

Бактериальные геномные молекулярные часы

Шейнман М.^{1*}

¹*Севастопольский государственный университет;*
mshainman@mail.sevsu.ru

Изучение эволюции бактерий остается непростой задачей. В отличие от более сложных организмов, расхождение геномных последовательностей у бактерий сильно зависит от частоты горизонтального переноса генов, который порождает мозаичную структуру бактериального генома: для пары бактерий разные гомологичные локусы обладают разным сродством. Этот же эффект мозаицизма порождается тем, что разные локусы подвержены отбору разной силы, так что они мутируют с разной скоростью.

Более того, из-за относительно быстрой смены поколений, нейтральные мутации накапливаются очень быстро и гомологию можно выявить только на консервативных локусах с относительно низкой скоростью мутаций. Вышеперечисленные свойства бактерий не позволяют напрямую использовать молекулярные часы полногеномных последовательностей. Вместо этого используются отдельные, медленно меняющиеся гены, иногда можно привязать эволюцию бактерий и их хозяев итп.

В настоящей работе мы построили модель эволюции бактериального генома. Модель учитывает разную скорость мутаций разных локусов и горизонтальный перенос генов. Предсказания рассмотренной модели очень хорошо описывают эмпирические данные: как меняется длина гомологичного участка у двух бактерий, среднее сродство, а другие геномные свойства с временем расхождения. Используя модель мы оценили времена расхождения для бактерий из семейства Enterobacteriaceae и построили ультраметрическое дерево продемонстрировав корректность и простоту метода.

Полученные результаты позволяют лучше понять как эволюционируют бактериальные геномы более робастно оценивать расхождение бактериальных видов на основе их полногеномных последовательностей.

**Биоинформатический анализ распределения и некоторых функций
самокомплементарных микроРНК у разных видов**

Кузьмичев С.А.^{1*}

¹МГМСУ им А.И.Евдокимова, НМИЦ онкологии им.Н.Н.Блохина, НИИ Канцерогенеза;
kuzs19782005@mail.ru

Исследования взаимодействий между малыми РНК, основная роль которых состоит в регуляции экспрессии множества генов, расширяют наши знания о их функциях. Различные методы показали способность ряда микроРНК (миРНК) образовывать гомодуплексы [1,2], т.е. дуплексы между самокомплементарными миРНК, с одинаковыми нуклеотидными последовательностями. Формирование дуплексов между миРНК, в составе которых повышается их устойчивость к деградации нуклеазами [2], может происходить при значениях минимальной свободной энергии (minimum free energy, MFE) ≤ -13 ккал/моль [2,3]. Предположены неканонические функции гомодуплексов миРНК, т.е. вне участия миРНК в регуляции трансляции мРНК [2]. Виды, отличающиеся размерами геномов, процессируют различное количество миРНК - от десятков у некоторых вирусов до нескольких тысяч у млекопитающих. Вероятность формирования дуплексов увеличивается со снижением MFE [3], поэтому для интерпретации различий [2] в проценте (%) миРНК, способных образовывать гомодуплексы важен анализ изменений их уровня с ростом MFE. Целью этой работы был анализ распределения миРНК, способных образовывать гомодуплексы с различными MFE, у разных организмов. Оценивалась способность миРНК участвовать в регуляции процессинга на основе определения MFE для различных дуплексов. Для анализа взяты последовательности миРНК и премикроРНК (пре-миРНК) из базы miRBase, версия 22.1, у разных видов: у домового мыши (*M. musculus*), у человека (*H. sapiens*), и у 6 видов вирусов герпеса, инфицирующих *H. sapiens* - вируса Эпштейна-Барр (EBV), вируса герпеса 8 типа (HHV-8), цитомегаловируса (HCMV), вирусов герпеса 1 (HSV-1) и 2 типа (HSV-2), вируса герпеса 6В (HHV-6В). Биоинформатический анализ для выявления миРНК, способных образовывать гомодуплексы, и определения их MFE проводился с помощью программы RNAup, как описано ранее [3]. Определен % самокомплементарных миРНК при увеличении нижней границы диапазона образования гомодуплексов от ≤ -13 до ≤ -30 ккал/моль. Вероятность образования гетеродуплексов между миРНК и пре-миРНК определялась с помощью программы RNAhybrid 2.2 (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>), наименьшее MFE было сопоставимо с ≤ -13 ккал/моль. Статистический анализ полученных данных проводился с помощью программы Statistica 10. Результаты и обсуждение: Корреляции данных расчета параметра MFE (в ккал/моль), полученные для гомодуплексов миРНК на основе метода, базирующегося на модели свободной энергии Тернера, Мэтьюза, и метода генерации ограничений [4] были высокими (коэффициент корреляции, $R = 0,97-0,98$). Распределение миРНК, способных образовывать гомодуплексы показало, что для мыши и человека, продуцирующих большее количество – тысячи миРНК, процент из них самокомплементарных миРНК в диапазоне MFE от ≤ -13 до ≤ -17 был меньше, чем у различных видов вирусов герпеса. Различие в % самокомплементарных миРНК между разными видами герпесов в этом диапазоне MFE сохранялось, что указывало на незначительное влияние погрешностей определения MFE [4] на результаты анализа. Обнаруженная неравномерность процентного содержания самокомплементарных миРНК при изменении MFE гомодуплексов дает возможность предполагать различное участие этих миРНК в регуляторных процессах. Сравнение данных из базы ViRmiRNA (<http://crdd.osdd.net/servers/virmirna>) не выявило отличий в количестве мРНК-мишеней для само- и не самокомплементарных миРНК ($p > 0,05$). Некоторые миРНК, как и короткие олигонуклеотиды, могут участвовать в регуляции процессинга миРНК, связываясь с комплементарными последовательностями при-микроРНК и пре-миРНК [2,5]. Наш анализ показал, что у самокомплементарных миРНК вероятность образования гетеродуплексов больше. Большое количество сайтов гибридизации между самокомплементарными миРНК и разными премиРНК, по сравнению с не самокомплементарными миРНК у разных видов герпесов (различия достоверны по тесту U Манна-Уитни: для EBV- $p < 0,05$, для HCMV - $p < 0,01$, для HSV-1 - $p < 0,001$, для HHV-8 - $p < 0,05$) может указывать на больший вклад этих миРНК в регуляцию процессинга. Образование гомодуплексов с $MFE \leq -25$ ккал/моль у мыши и человека для некоторых миРНК может способствовать накоплению этих миРНК в клетках, значительно снижая вероятность их выделения в экзосомах [3]. Причины относительного возрастания % самокомплементарных миРНК с $MFE \leq -25$ ккал/моль их гомодуплексов у мыши и человека могут быть выявлены в дальнейших исследованиях *in vitro*, учитывая возможность гибридизации миРНК и с другими типами некодирующих РНК.

ЛИТЕРАТУРА 1.Maiti M, Nauwelaerts K, Lescrinier E et al. // Biochem Biophys Res Commun. 2010. 392(4):572-76. 2.Belter A., Gudanis D., Rolle K et al. // PLoS ONE. 2014. 9 (11). e113848/1-e113848/23.3. Кузьмичев С.А., Комельков А.В., Чевкина Е.М // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. 2019(1):48-53. 4.Andronescu M., Condon A., Hoos H. et al. // RNA. 2010. 16(12):2304-2318. 5.Koralewska N., Hoffmann W., Pokornowska M et al. // Acta Biochim Pol. 2016; 63(4):773-783.

Биоинформационный анализ данных сравнительного протеомного анализа белков сыворотки крови больных биполярным аффективным расстройством и здоровых лиц при помощи программного пакета Peptide Shaker

Смирнова Л.П.^{1*}, Серегин А.А.¹, Дмитриева Е.М.¹, Иванова С.А.¹

¹ТНИМЦ;

²НИИ психического здоровья ТНИМЦ;

lpsmirnova2016@gmail.com

Аффективные расстройства, особенно биполярное аффективное расстройство (БАР), оказывают отрицательное воздействие на профессиональные и социальные стороны жизни больных и приводят к существенному снижению качества жизни. БАР поражает до 3% от мирового населения, являясь психическим заболеванием с неясной этиологией и патогенезом. Основное отрицательное последствие этого расстройства заключается в высоком риске суицидов (10-15%) у этих больных, а частота парасуицидов достигает 25–50%. Поэтому раннее выявление и правильное лечение имеет для БАР особо важное значение. В настоящее время не существует параклинических методов диагностики психических расстройств. Для постановки диагноза используют только анамнестические и клиничко-психопатологические данные, основанные на клинических оценках преобладания тех или иных психогенных симптомов.

В последнее время активно развиваются новые подходы к диагностике психических заболеваний и поиску их патогенетических маркеров, в том числе и с помощью протеомного анализа. По протеомным исследованиям больных с психическими расстройствами публикации малочисленны, и в основном представлены работами по шизофрении. Особенностью протеомного анализа является возможность с его помощью обнаруживать белковые биомаркеры, связанные с функциональными нарушениями, участвующими в патофизиологии заболеваний, без необходимости выдвижения гипотезы и ограничения ею области поиска.

Предполагается, что патогенез БАР связан с нарушением синаптической передачи в системе нейронов гипоталамуса и других базальных отделов мозга, так же в повреждении лежащих в их основе энергетических путей. Поэтому логично предположить, наличие биомаркеров, отражающих эти патогенетические изменения. Но до настоящего времени в мировой практике не выявлено не одного биологического маркера БАР. Это связано в том числе и большими трудозатратами при обработке большого объема масс-спектрометрических протеомных данных. В связи с этим для выявления белковых биомаркеров нами был применен программный пакет PeptideShaker. Это независимая от поисковой системы платформа для интерпретации результатов протеомной идентификации из нескольких поисковых систем и систем de novo, в настоящее время поддерживающая X!Tandem, MS-GF+, MS Amanda, OMSSA, MyriMatch, Comet, Tide, Mascot, Andromeda, MetaMorpheus, Novor, DirecTag и mzIdentML. PeptideShaker объединяет результаты в единый идентификационный набор, аннотирует спектры, вычисляет оценку консенсуса, сопоставляет последовательности и делает вывод о белках, оценивает локализацию посттрансляционных модификаций, выполняет статистическую проверку, контроль качества и аннотирует результаты с использованием нескольких источников информации, таких как Gene Ontology, аннотации UniProt и Ensembl и структуры белков.

Таким образом, целью настоящей работы явилось проведение сравнительного биоинформационного анализа данных масс-спектрометрии сыворотки крови лиц больных БАР и здоровых лиц при помощи программного пакета PeptideShaker. В работе проанализирован белковый спектр сыворотки крови 10 человек с диагнозом БАР в сравнении с аналогичной контрольной группой.

Списки пиков, полученные из спектров MS/MS, были идентифицированы с использованием OMSSA версии 2.1.9 и X!Tandem версии X! Tandem Vengeance (2015.12.15.2). Поиск проводился с использованием версии SearchGUI [4.1.14]. Идентификация белков проводилась по объединенной версии базы данных UniProtKB [PMID 20013364]. Пептиды и белки определяли по результатам идентификации спектра с использованием PeptideShaker версии 2.2.9. Совпадения пептидного спектра (PSM), пептиды и белки были проверены с коэффициентом ложного обнаружения 1,0% (FDR). Учитывались только белки, количественно определенные по крайней мере с двумя пептидами.

Для оценки различий между изучаемыми группами использовали количественный анализ без метки на основе интенсивности emPAI. Интенсивности emPAI для белков были прологарифмированы log2 и нормализованы для обеспечения равного среднего содержания белка во всех образцах. Статистическая обработка проводилась при помощи двустороннего непарного t-теста Стьюдента (FDR 0,05 и S0 = 2).

В результате анализа в каждой исследуемой группе было идентифицировано более 1300 белков. Далее, с учетом анализа статистически значимых различий в показателях нормализованных средних интенсивностей (emPAI) пептидов исследуемых групп были выделены 10 белков.

Минимальное значение p (p=0,0003) оказалось у белка Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3, который играет роль в клеточной адгезии и является структурным компонентом внеклеточного матрикса. Следующие 5 белков Disabled homolog 2-interacting protein, coiled-coil domain-containing protein 80, B-cell

CLL/lymphoma 9 protein, coatamer subunit gamma-1, ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 ($p=0,001$) также являлись различными структурными компонентами внеклеточного матрикса, регуляторами широкого спектра различных сигнальных путей, прежде всего воспалительного, а также регулирующих иммунный ответ, эмбриональное развитие, транскрипцию и дифференцировку клеток и апоптоз. Кроме того, ras GTPase-activating-like protein IQGAP1, является по сути нейроспецифичным белком и способствует росту нейритов. Такие белки как ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase, adhesion G protein-coupled receptor B1 и 14-3-3 protein zeta/delta ($p=0,002-0,005$) отвечают преимущественно за фосфорилирование и дефосфорилирование, гидролизуют АТФ и другие нуклеозиддифосфаты, регулируют апоптоз и убиквитинирование; в нейронах регулируют образование дендритных шипиков.

Таким образом, использование программного пакета PeptideShaker помогло отобрать несколько наиболее перспективных белков кандидатов маркеров БАР для дальнейшего количественного исследования.

Вариабельность бактериального гена *gpaA* в полифункциональном семействе рибосомных белков S1, содержащем структурные повторы

Галзитская О.^{1*}, Мачулин А.В.², Дерюшева Е.И.³, Кравченко С.В.⁴, Сурин А.А.⁵, Глякина А.В.¹, Гришин С.Ю.¹

¹Институт белка РАН, Пуццо, Россия;

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пуццо, Россия;

³Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пуццо, Россия;

⁴Тюменский государственный университет, X-Bio, Тюмень, Россия;

⁵МИРЭА, Российский технологический университет, Москва, Россия;

ogalzit@vega.protres.ru

Случаи множественного копирования одного и того же структурного домена по белковой цепи обнаружены в составе многих биологически важных белков таких как, например, интегрин α , анкирины, интерлейкин-1s, ряд трипсиновых ингибиторов, а также во многих белковых токсинах. Копирование доменов по белковой цепи принято рассматривать как “удачную эволюционную стратегию”. Такие белки имеют регулярную консервативную вторичную структуру, формируя при этом трехмерные структуры различных размеров и расширяя доступную для связывания площадь поверхности. При этом ограничения взаимодействий с лигандами, связанные с неконсервативностью первичной структуры белка, снимаются именно множественным копированием структурных повторов. Предполагается, что повторы белковых доменов возникают из-за тандемных дупликаций генов, однако механизмы этого процесса до сих пор не установлены полностью.

Многофункциональный рибосомный белок S1, кодируемый геном *gpaA*, является частью 30S субъединицы рибосомы и играет важную роль в инициации трансляции мРНК и элонгации. Семейство рибосомных белков S1 составляет примерно 20% от всех бактериальных белков, содержащих S1-домены. Отличительной особенностью этого семейства является множественное копирование структурных доменов в прокариотах.

Для изучения вариабельности бактериального гена *gpaA* повторов мы исследовали 1324 последовательности этого гена в семействе рибосомных белков S1, с разным количеством структурных доменов S1 (<http://oka.protres.ru:4200>). Ген *gpaA*, кодирующий полноразмерные белки S1, содержащие от одного до шести доменов S1, идентичны друг другу на 42%, 38%, 56%, 56%, 44% и 58%, соответственно. При этом, анализ консенсусных последовательностей показал, что участки гена *gpaA*, кодирующие отдельные домены S1, не имеют строго повторяющейся структуры между группами, содержащими разное количество доменов S1. Часть гена *gpaA*, кодирующая центральные домены в многодоменных белках S1, более консервативна, чем концевые домены, что коррелирует с тем фактом, что дупликация обнаруживается преимущественно в центральной области белковой цепи между другими повторами. Третий домен шестидоменных белков имеет наиболее консервативную консенсусную последовательность гена по сравнению с другими. Это согласуется с нашим предположением о том, что этот домен следует считать наиболее консервативным. Консенсусная последовательность гена *gpaA* для всех отдельных доменов, содержит некоторые консервативные части (nTTCGTnGAn, nTnGnn, nGAnnTn), соответствующие трем (из пяти) консервативным остаткам на поверхности домена S1, который образует сайт связывания РНК в бактериальном, археальном и эукариотическом белке, содержащем домен S1. Таким образом, трехмерная организация отдельных доменов S1 (консервативная ОВ-складка) играет ключевую роль для функционирования семейства.

Анализ последовательностей перед стартовыми кодонами генов *gpaA* показал, что, область инициации трансляции гена *gpaA* может складываться в структуру, предложенную для *E. coli*. Нами обнаружены области инициации трансляции гена *gpaA* в представителях отделов Terenicuties, Bacteriodites, Cyanobacteria, Firmicutes и

Actinobacteria, которые имеют структурное сходство и некоторые особенности консервативных последовательностей. Все последовательности содержат вырожденную последовательность Шайна-Далгарно (в основном GAAG) в шпильке III со стартовым кодоном AUG. Кроме того, шпильки разделены расширенными участками, богатыми A/U (ss1 и ss2). Выявленное нами филогенетическое сходство позволяет предположить, что предложенная укладка область инициации трансляции гена *grsA* в *E.coli* имеет функциональную ценность и, скорее всего, важна для трансляционного контроля экспрессии гена *grsA* в других типах бактерий, а не только в гамма-протеобактериях.

Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ (Галзитская О.В. 23-14-00342).

Вклад вариации копийности участков генома (CNVs) в видообразование и генетическое разнообразие штаммов лейшманий

Новожилова Т.С.^{1*}, Чистяков Д.С.^{2,3}, Ахмадишина Л.В.², Лукашев А.Н.², Герасимов Е.С.¹, Юрченко В.⁴

¹Биологический факультет, МГУ им. Ломоносова;

²НИИ медицинской паразитологии им. Е.И. Марциновского ;

³Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. Ломоносова;

⁴Life Science Research Centre, Faculty of Science, University of Ostrava;

nota-ru@yandex.ru

Род *Leishmania* представлен паразитическими простейшими, некоторые из которых вызывают у людей лейшманиоз – опасное тропическое заболевание, и могут заражать различных животных. Существует более двух десятков видов лейшманий, характеризующихся различными клиническими проявлениями инфекции, лекарственной устойчивостью и обитающими в разных хозяевах [1]. Примечательно, что некоторые виды *Leishmania* могут даже заражать одно и то же животное-хозяина [2]. В настоящее время применяются различные подходы для изучения геномных, протеомных и метаболических факторов, которые могли бы указать на взаимосвязь между видом лейшмании и механизмами, лежащими в основе патогенности и специфичности в отношении хозяина. Несмотря на интенсивные исследования, на сегодняшний день аспекты эволюции и генетического разнообразия лейшманий остаются довольно слабо изученными.

В данной работе мы исследовали два близкородственных вида лейшманий, которые в природе могут паразитировать в одном и том же хозяине, чтобы изучить на данной модели генетические факторы, которые могут способствовать видообразованию у этих паразитов. В Центральной Азии большие песчанки (*Rhombomys opimus*) служат основными переносчиками для нескольких видов лейшманий: *L. major*, *L. gerbilli* и *L. turanica*. В то время как *Leishmania major* патогенна для человека, ее близкий вид *L. turanica* встречается только в песчанках [3]. В разных регионах Азии существуют два типа популяций песчанок: коинфицированные *L. major* и *L. turanica* (в дальнейшем именуемые условно «симпатрическими») и инфицированные только *L. turanica* (условно «аллопатрическими»). Мы секвенировали 5 геномов «симпатрических» и 6 геномов «аллопатрических» штаммов *L. turanica* и провели обширный сравнительный геномный анализ. Мы проанализировали изменения в покрытии генома для обнаружения вариаций копийности генов и хромосом (CNVs), поскольку ранее было показано, что этот показатель может играть важную роль для генома трипаносоматид [4]. В частности, мы применили метод GIP [5] и метод *cn.MOPs* [6].

Мы проанализировали изменение числа копий генов и хромосом и обнаружили, что у всех штаммов хромосома 31 имеет ploidy 4, что типично для других видов рода *Leishmania*. У отдельных штаммов мы обнаружили либо амплификацию всей хромосомы, либо увеличение покрытия в крупных регионах хромосомы. В среднем примерно 244 гена имели значительно увеличенное покрытие в каждом из штаммов, что указывает на то, что события дупликации генов определяют разнообразие между штаммами. Мы не наблюдали специфических паттернов амплификации хромосом или числа копий генов при сравнении «симпатрических» штаммов с «аллопатрическими».

Таким образом, наши результаты подтверждают, что CNVs являются основными факторами, формирующими генетическое разнообразие видов *Leishmania*, при этом, по-видимому, нет заметного разделения между так называемыми «симпатрическими» и «аллопатрическими» штаммами.

Работа поддержана РФФИ #19-15-00054.

Литература

1. Stuart, Ken, et al. "Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases." *The Journal of clinical investigation* 118.4 (2008): 1301-1310.

2. Strelkova, M. V. "The isoenzyme identification and pathogenic characteristics of clones of *Leishmania major*, *L. sp. nov.* and *L. gerbilli*." *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni* 6 (1990): 9-13.

3. Strelkova, M. V., et al. "A new species of Leishmania isolated from the great gerbil *Rhombomys opimus*." *Parasitology* 101.3 (1990): 327-335.
4. Rogers, Matthew B., et al. "Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*." *Genome research* 21.12 (2011): 2129-2142.
5. Späth, Gerald F., and Giovanni Bussotti. "GIP: an open-source computational pipeline for mapping genomic instability from protists to cancer cells." *Nucleic Acids Research* 50.6 (2022): e36-e36.
6. Klambauer, Günter, et al. "cn. MOPS: mixture of Poissons for discovering copy number variations in next-generation sequencing data with a low false discovery rate." *Nucleic acids research* 40.9 (2012): e69-e69.

Влияние динамики фотосинтезирующих клеточных структур фитопланктона на производство биомассы

Абакумов А.И.^{1*}, Пак С.Я.¹
¹ИИПУ ДВО РАН;
abakumov@dvo.ru

Для исследования влияния фотосинтезирующих клеточных структур на производство биомассы предложены две модели. Обе они основаны на общепринятой модели Друпа [1] для внутриклеточного содержания минерального вещества в фитопланктоне. Модель Друпа расширена с учетом механизмов фотосинтетического производства. Для этого используется понятие хлорофильной квоты – доли фотосинтезирующих веществ в растительных клетках. Фотосинтетическая активность фитопланктона, помимо хлорофильной квоты, определяется внешними условиями, в первую очередь, уровнем фотосинтетически активной радиации (ФАР). Модель основана на разделении зависимости воспроизводства фитопланктона от внешних условий соответственно этапам фотосинтеза. Световой этап в большей мере определяется ФАР, а темновая стадия лимитируется питательным ресурсом при контролирующем влиянии температуры водной среды. Дальнейшее развитие модели связано с более детальным описанием фотосинтеза с точки зрения энергоресурса, который формируется в световую стадию в форме энергоемких веществ или макроэргических молекул – макроэргов. Самым распространенным макроэргом клетки является аденозинтрифосфат (АТФ). Доля АТФ в фитопланктоне меняется в зависимости от светового режима и от того, сколько энергии расходуется в темновую стадию. В модель, помимо основных уравнений, включая кинетику Друпа, введены уравнения динамики хлорофильной квоты и пула АТФ. Проведено сравнение условий существования и устойчивости равновесных решений при одинаковых значениях общих для обеих моделей параметров. Установлено наибольшее влияние на динамические режимы минимального значения клеточной квоты. Существенно значимым также является доля биомассы, ассоциированная со световым периодом фотосинтеза. В терминах первой модели это биомасса, продуцируемая в светлое время суток, в рамках второй модели – биомасса, сформированная за счет энергии АТФ, запасенной в световой фазе. Выявлено влияние структуры динамических моделей на суточную и годовую динамику фитопланктона. Исследованы сценарии поведения моделей при различных режимах освещенности, в том числе при постоянном и периодически меняющемся освещении.

Обе модели имеют сложную динамику, когда устойчивых равновесий не существует. Эта динамика подчиняется аттрактору модели Друпа. Она может иметь периодические, квазипериодические и квазистохастические свойства в постоянной среде.

Условия изменения освещенности моделировались при прочих неизменных условиях. Поведение квоты хлорофилла и доли АТФ в биомассе, рассчитанное по предложенной модели, полностью согласуется с результатами опубликованных лабораторных экспериментов [2]. В частности, ввод уравнения динамики АТФ в модельную систему позволяет избежать прямого влияния квоты хлорофилла на внутриклеточное содержание биогенов. Таким образом, формируется временной лаг, в течение которого система успевает накопить энергию, необходимую для запуска ферментативной реакции. Характерно, что хлорофилл начинает расходоваться только при накоплении достаточного количества энергии. В отсутствие освещения клетки фитопланктона в качестве источника энергии используют только АТФ. Реакция синтеза органического вещества протекает медленнее. Поэтому хлорофилл также расходуется медленно. Следовательно, наибольшая его концентрация в клетках фитопланктона отмечается в абсолютной темноте. Концентрация АТФ, наоборот, падает до минимума, так как в темноте увеличивается потребление энергоемких веществ из-за отсутствия других источников энергии [3].

Моделирование годового цикла показывает адекватную динамику в обеих моделях при имитации сезонных изменений среды обитания в течение года. Показано, что такие изменения приводят к весенним и осенним всплескам продуктивности биомассы. Это согласуется с известными полевыми наблюдениями [4]. В целом, модели демонстрируют способность более точно описывать процессы биопродукции по сравнению с моделями, разработанными нами ранее. При наличии данных дистанционных наблюдений и результатов

лабораторных экспериментов представленные модели могут быть использованы для оценки биопродуктивности водных экосистем.

1. Droop M.R. Some thoughts on nutrient limitation in algae. J. Phycol. 1973. No. 9. P. 264–272.
2. Hunter B.L., Laws E.A. ATP and chlorophyll a as estimators of phytoplankton carbon biomass. Limnology and Oceanography. 1981. V. 26. No. 5. P. 944–956.
3. Adamson H.Y., Hiller R.G., Vesik M. Chloroplast development and the synthesis of chlorophyll a and b and chlorophyll protein complexes I and II in the dark in Tradescantia albiflora (Kunth). Planta. 1980. V. 150. No. 4. P. 269–274.
4. Colebrook J.M. Continuous plankton records: seasonal cycles of phytoplankton and copepods in the North Atlantic Ocean and the North Sea. Marine Biology. 1979. V. 51. No. 1. P. 23–32.

Влияние замещений атомов Са на атомы Sr, Mg, Mn, Fe в структуре Гидроксиапатита и изменений электрического поля на его физические свойства, важные для биомедицины

Быстров В.С.^{1*}, Парамонова Е.В.¹, Быстрова А.В.¹, Авакян Л.А.², Макарова С.В.³, Исаев Д.Д.³, Булина Н.В.³

¹ИМПБ РАН - филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН;

²Физический факультет, Южный Федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия;

³Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, Новосибирск, Россия;

vsbys@mail.ru

Гидроксиапатит (ГАП) является широко используемым биоматериалом в различных медицинских применениях, благодаря своей естественной биосовместимости с костными тканями организма человека, как основной минеральный компонент (до 70 %) костей и зубов человека [1]. Кость представляет собой сложную многокомпонентную систему, включающую коллагеновые волокна, окруженные кристаллами гидроксиапатита, которые слагаются в пластинки (размером ~ 450 Å на 250 Å) и различных клеток костной ткани: остеобласты участвуют в создании и минерализации костей, остециты поддерживают структуру, а остеокласты обеспечивают резорбцию костной ткани. В здоровом организме обычно постоянно происходят процессы регенерации или ремоделирования кости - последовательная резорбция костной ткани с образованием новой прочной костной матрицы. Процесс обновления костной ткани происходит так, чтобы в год заменялось 4–6% всей массы скелета организма. При костных травмах, переломах, удалении зубов или введении костных имплантов, процессы ремоделирования запускаются воспалением, которое активирует действия остеокластов, что стимулирует расщепление пораженной костной ткани, и ускоряет скорость резорбции новой ткани за счет работы остеобластов. С целью ускорения этого процесса, роста новой костной ткани и приживаемости импланта, медики применяют специальные остеогенные биоматериалы. Среди них ГАП является тут основным компонентом, который применяется, в том числе, для покрытия как титановых, так и других имплантов. Но для повышения свойств биосовместимости синтетического ГАП его необходимо модифицировать. Одним из способов является введение добавок и замещений атомов в структуре ГАП. Это изменяет свойства ГАП и тем самым влияет на активность osteo-клеток.

Проведенные ранее исследования, моделирование и расчеты структуры и свойств ГАП показало, что свойства реальных образцов ГАП определяются наличием в нем структурных дефектов (вакансий, внедрений и замещений атомов в структуре ГАП) [1-3]. В данной работе рассмотрены модели, проведены расчеты и проанализированы физические свойства ГАП с замещениями атомов Са на другие атомы (Sr, Mg, Mn, Fe) [1-3], а также изменение свойств ГАП под влиянием электрического поля и пьезоэффекта [4, 5]. Моделирование и расчеты свойств ГАП проводились методами теории функционала плотности в разных приближениях и в комбинации с квантовыми полуэмпирическими методами расчета PM3, PM7, PM6-D3H4. Важной особенностью замещений атомов Са в ГАП на другие атомы оказывается изменение всей энергетической зонной структуры ГАП и, как результат, изменение электронной работы выхода. Это приводит к изменению поверхностного потенциала ГАП, что влияет на адгезию и рост количества osteo-клеток на его поверхности, т. е. на рост костной ткани на поверхности импланта, покрытого таким ГАП. Это позволяет регулировать биосовместимость ГАП.

Здесь существенно, что замещения разного типа приводят к различным эффектам. Так, замещения Mg/Ca и Sr/Ca вызывают противоположные изменения в ширине запрещенной зоны Eg и, соответственно, работы выхода: замещения Sr/Ca увеличивают Eg, тогда как замещения Mg/Ca уменьшают Eg [1]. Атомы Mg и Sr находятся в одной группе с Са в таблице Менделеева и их замещения не вызывают сильных деформаций решетки ГАП. В тоже время замещения типа Mn/Ca и Fe/Ca (атомы из разных групп) вызывают более существенные перестройки в ячейках решетки ГАП. В результате, кроме сдвига ширины запрещенной зоны Eg,

внутри нее появляются уровни энергии E_i , которые служат донорами/акцепторами электронов и меняют оптические свойства ГАП [1]. Другим эффектом, который влияет на сдвиг уровней энергии зонной структуры ГАП и изменяет ширину запрещенной зоны E_g , является электрическое поле E . Проведенные модельные расчеты разными методами на чистом ГАП показали, что сдвиги уровней энергии E_v , E_c и E_g под влиянием электрического поля, оказываются сравнимы по величине со сдвигами, возникающих при замещениях атомов в ГАП, и также изменяют поверхностный потенциал ГАП. Важно, что в этом случае влияние оказывает и пьезоэффект — благодаря деформациям сжатия, возникающим в костях при ходьбе, и пьезоэффекту нанокристаллов ГАП [4, 5] (входящих в состав костной ткани), на их поверхности генерируется электрическое поле, величина которого достаточна для создания такого сдвига E_g , изменения работы выхода и поверхностного потенциала ГАП, приводящего к активизации работы костных клеток и роста костных тканей. Таким образом, происходит процесс регенерации костной ткани. Проведенное в данной работе моделирование процессов влияния электрического поля и замещения атомов ГАП и расчеты, выполненные разными методами ТФП и полуэмпирическими методами, показывают, что полученные значения сдвигов уровней энергии, ширины запрещенной зоны E_g и изменения поверхностного потенциала ГАП сопоставимы с экспериментальными данными. Полученные результаты описывают физический механизм влияния электрического поля, пьезоэффекта и замещения атомов в ГАП, на процессы регенерации костной ткани. Это имеет практическое значение как для биомедицины, так и для технологии синтеза новых наноматериалов для медицинских и других целей на основе ГАП. Работа поддержана грантом РНФ № 21-12-00251.

1. Bystrov V., Paramonova E., Avakyan L. et al. Simulation and Computer Study of Structures and Physical Properties of Hydroxyapatite with Various Defects. *Nanomaterials* 2021, 11, 2752.

2. Bulina N.V., Makarova S.V. et al. A Study of Thermal Stability of Hydroxyapatite. *Minerals* 2021, 11, 1310.

3. Avakyan L., Paramonova E., Bystrov V., Coutinho J. et al. Iron in Hydroxyapatite: Interstitial or Substitution Sites? *Nanomaterials* 2021, 11, 2978.

4. V. S. Bystrov, E. V. Paramonova, A. V. Bystrova, L. A. Avakyan, N. V. Bulina. Structural and physical properties of Sr/Ca and Mg/Ca substituted hydroxyapatite: modeling and experiments. *Ferroelectrics* 2022, 590, 41- 48.

5. V. S. Bystrov. Piezoelectricity in the ordered monoclinic hydroxyapatite. *Ferroelectrics* 2015, 475 (1), 148.

Влияние пространственного полиморфизма биологического объекта на градиенты метаболитов при моделировании конвекционной реакции-диффузии

Нарциссов Я.Р.^{1,2*}

¹НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии;

²Биомедицинская исследовательская группа, БиДиФарма ГмбХ;

yarosl@biotic.dol.ru

Существенной особенностью любого биологического объекта является пространственное распределение переменных исследуемой системы. К числу наиболее важных характеристик относятся содержание метаболитов, участвующих в биохимических процессах внутри клеток. Для описания пространственно-временных распределений концентраций химических соединений используют краевые задачи для уравнений в частных производных параболического типа. В общем случае необходимо учитывать и конвекционную составляющую, возникающую при движении жидкостей в отдельных областях биологического объекта [1]. В представленной работе конвекционная реакция-диффузия метаболитов моделировалась с помощью метода конечных элементов в программном пакете COMSOL Multiphysics. В ряде случаев формирование барьеров приводит к изменению реакции системы на внешние воздействия. Было показано, что формирование градиентов концентрации глюкозы при снижении кровотока значительно зависит от геометрических параметров структурных элементов нейроваскулярной единицы [2,3], в то время как на содержание кислорода подобный геометрический полиморфизм влияния не оказывает. Кроме того, симметричность геометрии бифуркации сосудов предопределяет изменения в снабжении прилегающих участков паренхимы нервной ткани при снижении кровотока в одной из дочерних ветвей. Подобные эффекты влияния геометрии структуры объекта проявляются и на субклеточном уровне. В частности, кластерное расположение глициновых рецепторов на пост-синаптической мембране нейронов приводит к формированию временного локального изменения концентрации ионов хлора, обуславливающего смену отклика рецепторов на выброс медиаторов из пре-синаптических везикул. Аналогично, кластерное расположение митохондрий в теле нейрона делает возможным значительные флуктуации в содержании АТФ, а также объясняет различия в реакции отдельных клеток на химические соединения, воздействующие на окислительное фосфорилирование. Таким образом, совокупность математических моделей, выполненных для систем разного уровня, указывает на то, что геометрические

особенности организации пространства диффузии играют существенную роль в формировании градиентов метаболитов наряду с изменениями физико-химических свойств среды.

1. Nartsissov, Y. R., 2021. A novel algorithm of the digital nervous tissue phantom creation based on 3D Voronoi diagram application. Journal of Physics: Conference Series 2090, 012009, doi:10.1088/1742-6596/2090/1/012009.

2. Nartsissov, Y. R., 2021. The Effect of Flux Dysconnectivity Functions on Concentration Gradients Changes in a Multicomponent Model of Convectional Reaction-Diffusion by the Example of a Neurovascular Unit. Defect and Diffusion Forum 413, 19-28, doi:10.4028/www.scientific.net/DDF.413.19.

3. Nartsissov, Y. R., 2022. Application of a multicomponent model of convectional reaction-diffusion to description of glucose gradients in a neurovascular unit. Frontiers in Physiology 13, doi:10.3389/fphys.2022.843473.

Влияние процедуры перекристаллизации на физико-химические характеристики глицина и янтарной кислоты: эксперимент и квантовохимическое моделирование

Жулидин П.А.^{1*}, Филин П.Д.¹, Захаров А.А.¹, Пластун И.Л.¹, Яковлев Р.Ю.²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный технический университет имени Ю. А. Гагарина»;

²ООО «Научный центр РТА»;
zhulidin@mail.ru

В последние годы, уделяется большое внимание поиску средств повышения биодоступности и растворимости лекарственных препаратов для повышения их терапевтического эффекта. Компания ООО «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РТА», осуществляющая разработку новых полиморфных модификаций лекарственных веществ и их сокристаллов, недавно предложила новые схемы по модификации глицина и янтарной кислоты, основанные на технологии криохимической перекристаллизации органических веществ.

Как отмечается в [1], в результате перекристаллизации изменяется растворимость, текучесть, смачиваемость, температура плавления, скорость растворения и, как следствие, повышается биодоступность модифицированных лекарственных форм в сравнении с основными.

Янтарная кислота входит в состав растительных и животных тканей. Она широко используется в медицине [2, 3], в частности, в терапии кардиологических, неврологических и эндокринных заболеваний, а также в токсикологии. Глицин, как препарат, используется в неврологической практике для устранения повышенного мышечного тонуса, улучшения обмена веществ и предотвращения гибели клеток мозга после инсульта [4]. Также, в исследовании [5] доказано, что глицин при приеме перорально в достаточно больших дозировках (3-9 г) способствует улучшению качества сна и не оказывает серьезных побочных эффектов.

Технология получения модифицированных форм глицина и янтарной кислоты, разработанная ООО «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РТА», является технологией криохимической перекристаллизации органических веществ и состоит из нескольких определяющих стадий: 1) растворение вещества до образования истинного раствора; 2) получение молекул в высокоэнергетических конформациях, что достигается за счет воздействия на раствор температуры, лазерного или ультрафиолетового излучения; 3) охлаждение/заморозка раствора; 4) лиофильная сушка.

Как показали экспериментальные исследования, проведенные в ООО «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РТА», после модификации происходит значительное изменение морфологии кристаллов глицина и янтарной кислоты. Исследования морфологических характеристик выполнялось на сканирующем электронном микроскопе TESCAN MIRA3 (Чехия) при разрешении до 5 мкм (3.0 кВ). Было обнаружено существенное увеличение удельной площади поверхности веществ: для глицина с 0,08 м²/г перед модификацией до 6,3 м²/г после модификации; для янтарной кислоты с 1,28 м²/г перед модификацией до 4,54 м²/г после модификации. В ходе эксперимента были получены фотографии, подтверждающие, что наночастицы веществ подверглись реструктуризации в ходе криохимической перекристаллизации. Спектры инфракрасного излучения регистрировались на ИК Фурье спектрометре Spectrum Two в диапазоне 600 - 4000 см⁻¹ с разрешением 2 см⁻¹ при температуре 20 оС.

Для подтверждения экспериментальных данных, было произведено численное моделирование структуры и ИК спектра молекулярных комплексов исследуемых веществ как отдельно, так и с последовательным присоединением молекул воды к мономерам и полимерам глицина и янтарной кислоты. Моделирование структуры и расчёт спектров молекул и их комплексов осуществлялись на основе методов теории функционала плотности (ТФП) с использованием функционала B3LYP и базисного набора 6-31++G (3D2F,3P2D) [6]. Все процедуры молекулярного моделирования, включая оптимизацию молекулярных структур и расчёт ИК спектров, проведены на основе программного комплекса Gaussian.

На основе расчетов структуры и ИК спектров мономера, димера и тетрамера глицина проведена качественная оценка его комплексообразования с водой. Анализ показал, что при увеличении количества молекул воды и глицина образуется большое количество водородных связей, частота которых совпадает с основными частотами спектра воды. При этом наблюдается хорошее согласие рассчитанного и экспериментально измеренного спектра модифицированного глицина.

Аналогичное исследование ИК спектров и структуры янтарной кислоты показало, что в модифицированной янтарной кислоте присутствуют не только цепочечные ассоциаты, но и мономеры янтарной кислоты, что говорит о возможности разрыва цепочек связей в результате процедуры перекристаллизации. Из сравнения рассчитанного и экспериментального ИК спектров хорошо заметно присутствие воды и её влияние на физико-химические свойства модифицированной янтарной кислоты.

Можно сделать вывод, что при перекристаллизации глицина и янтарной кислоты, несмотря на лиофильную сушку, остаются единичные молекулы воды, что приводит к изменениям физико-химических свойств модифицированных веществ, выражающимся в сверхвысокой скорости растворения и к изменению ИК спектра рассматриваемых веществ.

Список литературы:

1. Javadzadeh S. Y., Dizaj M. D., Vazifehasl Z., Mokhtarpour M. Recrystallization of Drugs — Effect on Dissolution Rate // Recrystallization in Materials Processing. London, United Kingdom: IntechOpen, 2015. P. 191-211
2. Смирнов А.В., Нестерова О.Б., Голубев Р.В. Янтарная кислота и ее применение в медицине. Часть I. янтарная кислота: метаболит и регулятор метаболизма организма человека // Нефрология. 2014 Т. 18, №. 2, С. 33-41
3. Смирнов А.В., Нестерова О.Б., Голубев Р.В. Янтарная кислота и ее применение в медицине. Часть II. Применение янтарной кислоты в медицине // Нефрология. 2014 Т. 18, №. 4, С. 12-24.
4. Громова О.А., Торшин И.Ю., Гусев Е.И., Никонов А.А., Лиманова О.А. Молекулярные механизмы воздействия аминокислот в составе церебролизина на нейротрансмиссию. Нейротрофические и нейропротективные эффекты аминокислот // Трудный пациент. 2010 Т. 8, №. 4, С. 25-31.
5. M. Bannai, N. Kawai. New therapeutic strategy for amino acid medicine: glycine improves the quality of sleep // J. Pharm. Sci. 2012 Vol. 118. № 2. P. 145-148. DOI:10.1254/jphs.11r04fm
6. Becke A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange // Journal of Chemical Physics. 1993. Vol. 98. № 7. P. 5648-5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913>

Влияние эффектов турбулентности при моделировании гемодинамики аортального клапана в норме и при патологии

Пиль Н.Е.^{1*}, Кучумов А.Г.¹

¹ПНИПУ;

nikitapil32@gmail.com

Аортальный стеноз является одной из самых распространенных патологий аортального клапана, более 15% старше 70 лет подвержены этому заболеванию. В результате аортального стеноза происходит сужение клапанного отверстия и/или деформация створок клапана. Тяжелая форма аортального стеноза является одной из основных причин заболеваемости и смертности среди пожилых людей. Ежегодно в мире проводится более 275 000 хирургических операций по замене аортального клапана, а к 2050 году прогнозируется их рост до 850 000 операций в год.

Для долгосрочного прогнозирования исходов оперативных вмешательств необходимо биомеханическое моделирование гемодинамики в аортальном клапане. На текущий момент не предложено комплексной модели ввиду множества нерешенных вопросов. Один из них заключается в учете влияния эффектов турбулентности на гемодинамические процессы. Турбулентный поток увеличивает риск гемолиза, а при больших значениях касательных напряжений Рейнольдса происходит разрушение тромбоцитов.

В работе проведен анализ использования двух подходов к моделированию турбулентных процессов: при помощи метода крупных вихрей и на основе моделей турбулентной вязкости. Решалась осесимметричная задача на идеализированной трехмерной геометрии, построенной на основе данных снимков УЗИ и литературного обзора. Задача решалась в рамках FSI подхода при помощи программного пакета COMSOL Multiphysics. Поток крови моделируется несжимаемой ньютоновской жидкостью с постоянной плотностью и вязкостью.

Для моделирования биомеханического поведения створок аортального клапана в норме применяется модель анизотропной гиперупругости Хольцапфеля-Гассера-Огдена. Патологическое состояние створок аортального клапана описывается линейно упругой моделью.

Математическая постановка включает уравнение Навье-Стокса с условием несжимаемости, уравнения для описания моделей турбулентности. Также записывается уравнение движения для твердого тела. Система замыкается начальными и граничными условиями, а также условиями сопряжения жидкости и твердого тела. На входе в расчетную область задается профиль скорости. Для определения давления на выходе из расчетной области используется двухэлементная модель виндекесселя, в которую в качестве входных данных принимается профиль скорости.

Полученные результаты описывают изменения основных гемодинамических показателей: скорости, давления, пристеночных касательных напряжений и индекса колебаний касательных напряжений. Также проведено сравнение результатов для значений кинетической и турбулентной кинетической энергии между двумя моделями турбулентности и состоянием в норме и при патологии.

Возможности дифференциальной сканирующей калориметрии для изучения белок-лигандных взаимодействий

Седов И.А.^{1,2*}, Хайбрахманова Д.Р.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет;

²Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН;
igor_sedov@inbox.ru

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) — мощный аналитический метод, используемый в биофизике для изучения стабильности и денатурации белков. Он основан на измерении количества теплоты, выделяемого или поглощаемого при физическом или химическом процессе в образце в ходе изменения его температуры. ДСК обычно используется для характеристики термических свойств индивидуальных белков в различных условиях, оптимизации термостабильности белка или характеристики моноклональных антител и вакцинных антигенов.

ДСК также может применяться для изучения связывания между белками и лигандами, что используется гораздо реже и обычно на качественном уровне. Связывание лиганда с нативным белком приводит к повышению температуры его денатурации, однако нет простой зависимости между сдвигом температуры плавления и термодинамической константой связывания. Нами разработана программа для численного моделирования кривой ДСК в системах белок-лиганд с различной стехиометрией связывания. Расчеты выполняются для обратимой денатурации в предположении, что при любой температуре в процессе сканирования быстро устанавливаются равновесия фолдинга-анфолдинга и связывания. Это верно для низких скоростей сканирования.

Используя известные термодинамические параметры денатурации и связывания нескольких лекарственных веществ для бычьего сывороточного альбумина, были рассчитаны калориметрические кривые для различных соотношений лиганд:белок. Затем были записаны экспериментальные термограммы для тех же систем с помощью капиллярного ДСК-калориметра. Наблюдалась хорошая воспроизводимость максимальных температур пиков денатурации и площадей пиков при избытках лиганда ниже 5:1. Более высокие концентрации лиганда приводят к более сильным, чем предсказывает модель, температурным сдвигам, что можно объяснить наличием дополнительных сайтов связывания со слабым родством.

Затем была решена обратная задача определения констант связывания по данным ДСК для ряда лекарственных лигандов. Нами была экспериментально измерена температура максимума пика и площадь пика при различных концентрациях лиганда и определены первая и вторая последовательные константы связывания белок-лиганд, при которых модель дает наилучшее согласие с экспериментом. Затем эти значения были независимо подтверждены измерениями методом изотермической титрационной калориметрии.

Результаты показывают, что метод ДСК может использоваться для количественной характеристики взаимодействий между белками и другими молекулами, чтобы лучше понять их механизм и выявить связь между структурой и аффинностью. Анализ различий в аффинности связывания между различными лигандами может быть использован для дизайна и скрининга потенциальных кандидатов при разработке новых лекарств. Существенным преимуществом метода ДСК является его высокая воспроизводимость.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

Вычислительное моделирование стоковых течений в сложных каналах

Марковский А.Н.^{1*}, Гамаюнова Д.Ю.¹
¹Кубанский государственный университет;
mrkvsk@yandex.ru

Классическая задача Стокса построения вязкого медленного течения внутри ограниченной области требует задания скорости на всей границе. Но, в тех случаях, когда скорость неизвестна на части границы, приходится доопределять ее искусственным образом. Однако можно строить течения используя только граничные данные искомой функции тока при естественном условии минимума среднеквадратической завихренности. В такой новой постановке, функция тока искомого течения представляется логарифмическим потенциалом с неизвестной плотностью. Принадлежность искомой плотности пространству гармонических функций обеспечивает единственность решения задачи и соответствует заданному экстремальному условию. Искомую гармоническую плотность предлагается определять методом базисных потенциалов, который опирается на доказанную полноту систем сдвигов фундаментального решения уравнения Лапласа.

В работе предлагается простой алгоритм построения стоковых течений только по граничным данным. Предлагаемый подход позволяет без труда строить течения в каналах сложной геометрии, что может быть использовано при моделировании кровотока в разветвленной системе сосудов.

В работе приводятся результаты вычислительных экспериментов для разных областей.

Динамика кристаллов ДНК-Dps в условиях обезвоживания

Терешкина К.Б.^{1*}, Терешкин Э.В.¹, Лойко Н.Г.², Коваленко В.В.¹, Крупянский Ю.Ф.¹
¹ФИЦ ХФ РАН;
²ФИЦ Биотехнологии РАН;
quebra-mola@yandex.ru

Рост бактериальной колонии претерпевает множественные виды стресса и подстраивает свой жизненный цикл под существующие условия окружающей среды. Выживаемость бактерий в неблагоприятных условиях во многом определяется способностью бактерии сохранить неповрежденным свой генетический материал, главным образом – нуклеоидную ДНК. При наступлении неблагоприятных условий, рост колонии замедляется, она вступает в стационарную фазу роста, в которой начинают вырабатываться особые ДНК-стабилизирующие белки Dps (DNA-binding protein from starved cells), обеспечивающие образование кристаллов внутри клетки [1-2]. Белки Dps представляют собой гомододекамеры с полостью внутри. Расположение субъединиц таково, что белок относится к точечной группе симметрии T (23 по международной классификации). Из-за способности связывать ионы железа, инактивировать их и накапливать во внутрибелковой полости, семейство белков DPS относится к суперсемейству ферритина. Концевые участки всех субъединиц чрезвычайно лабильны и способны связывать ДНК. Кристаллизация белка Dps приводит к возникновению внутриклеточных кристаллов ДНК-Dps. Гомологи Dps были идентифицированы у многих бактерий и архей. Однако до сих пор не изучены молекулярные механизмы, позволяющие этим белкам защищать ДНК.

В данной работе методами молекулярной динамики рассматриваются процессы образования и эволюции сокристаллов ДНК с белком Dps бактерии *Escherichia coli* (PDB ID: 6GCM). Исследована динамика нанокристаллов Dps-ДНК при высушивании, сопровождающемся уменьшением процентного содержания воды и повышением ионной силы раствора. Начальные концентрации ионов соответствовали цитоплазме клетки *E. coli*. В качестве контроля изучены: 1) кристаллы Dps-ДНК в растворе с противоионами, 2) свободная ДНК в растворах. Расчёты проведены с использованием крупнозернистого представления молекул в Gromacs. Участок кристалла содержал 15 додекамеров Dps. Участок ДНК содержал 165 пар нуклеотидов (ген *yhiS*, предположительно обладающий высокой адсорбционной способностью к белку Dps [3]). Расчёты динамики систем проводились в периодических граничных условиях при постоянном числе частиц, температуре и давлении в процессе одного расчёта. Шаг интегрирования составлял 10 фс, длина траекторий – 0.1 мкс для всех систем, кроме сильно обезвоженных. Длина траектории таких систем сокращена до 0.03 мкс из-за более быстрого выхода исследуемых параметров на плато. Температура 300 К поддерживалась с помощью ланжевеновского термостата (постоянная времени - 1 пс). Давление поддерживалось с помощью баростата Парринелло-Рамана (постоянная времени - 4 пс, давление – 1 бар, изотермическая сжимаемость воды $3.0 \cdot 10^{-4}$ бар⁻¹). Радиусы обрезания для кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий брались равными 1.2 нм. Диэлектрическая проницаемость среды была равна 15 для обеспечения явного экранирования. Количество

молекул воды изменялось от 100% - необезвоженная система. Первой стадии обезвоживания отвечало снижение количества молекул воды до 75%, второй стадии – до 50%, третьей стадии – до 25%, четвертой стадии – до 10%. Пятая стадия обезвоживания характеризовалась присутствием исключительно связанной воды. Были получены пространственные и энергетические характеристики систем. Анализ главных компонент позволил оценить различия в динамике Dps и участков ДНК в процессе обезвоживания.

Было выявлено, что при нормальном (100%) и близком к нормальному (75%) количествах молекул воды нанокристаллы сохраняют свою структуру и практически идентичны. ДНК внутри кристалла подстраивалась под форму каналов. Концевые участки ДНК, лежащие вне каналов, а также свободная ДНК в растворе не претерпевали значительных конформационных изменений. При уменьшении количества воды в системе на 50%, начинали проявляться эффекты обезвоживания. Диаметр молекул Dps оставался неизменным, происходило сближение и взаимодействие молекул Dps, не контактировавших друг с другом в нативных кристаллах. На этом этапе обезвоживания начинали возникать дефекты кристалла. Дефекты могли как самоустраняться, так и расти по мере расчёта. ДНК внутри кристалла оказывалась стабилизированной, подстроившись под внутреннее окружение каналов. Однако в лежащих вне кристалла участках молекул ДНК начинали появляться изломы. При уменьшении количества воды в системе до 25% и ниже, ядро кристалла, образованное внутренними молекулами Dps, продолжало уплотняться. На этой стадии уплотнение происходило как за счёт сближения молекул Dps, так и сжатия додекамеров. Наблюдался отрыв некоторых поверхностных молекул Dps. Сжатие молекул Dps возникало вследствие выхода наружу молекул воды, находившихся в полости додекамера. Этот эффект проявлялся и при высокой, и при низкой концентрациях ионов, и был, по-видимому, обусловлен локальным повышением ионной концентрации на поверхности додекамеров. ДНК внутри кристалла не претерпевала существенных изменений. Свободные участки ДНК сжимались либо адсорбировались на поверхности нанокристалла. Дальнейшее уменьшение количества воды незначительно затрагивало форму молекул и кристаллов Dps с лежащей внутри ДНК, но вызывало существенные конформационные изменения свободных участков ДНК. Появлялись изломы и изгибы способные привести к деградации структуры ДНК. Было показано, что в процессе обезвоживания молекулы Dps оказывают критическое влияние на сохранность ДНК и способны сохранить нативную структуру ДНК во внутренних каналах кристалла.

Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда (соглашение № 23-24-00250). Расчеты проводились на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (МСЦ РАН).

Литература:

1. Tereshkin E., Tereshkina K., Loiko N. et al. // J Biomol Struct Dyn. 2018. V. 37. P. 2600.
2. Терешкин Э. В., Терешкина К. Б., Коваленко В. В. и др. // Химическая физика. 2019. V. 38. № 40. С. 48.
3. Antipov S.S., Tutukina M.N., Preobrazhenskaya E.V. et al. // PLoS One. 2017 Aug 11;12(8):e0182800. doi: 10.1371/journal.pone.0182800.

Динамика связанности между полушариями мозга крыс при прохождении волны распространяющейся депрессии

Лачинова Д.А.^{1,2*}, Сысоев И.В.^{1,2}, Виноградова Л.В.¹

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН;

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.

Чернышевского;

lachinova-dasha@yandex.ru

Распространяющаяся депрессия (РД) представляет собой реакцию нервной ткани в виде кратковременной обратимой самораспространяющейся интенсивной клеточной деполяризации [1]. Острое повреждение головного мозга (черепно-мозговая травма, инсульт) и эпилептические судороги могут провоцировать волну распространяющейся депрессии (РД). Считается, что для возникновения РД необходимо локальное повышение концентрации ионов калия во внеклеточной среде, ведущее к деполяризации нейронов. Внеклеточно волна РД регистрируется как высокоамплитудный негативный сдвиг постоянного потенциала, который является наиболее надежным индикатором её развития в нервной ткани. Амплитуда волны РД отражает число нейронов, участвующих в деполяризации, а её длительность – скорость реполяризации клеточных мембран. При фокальном возникновении РД распространяется относительно медленно (2-6 мм/мин) по серому веществу мозга. Малая скорость распространения и большая длительность (0.5-1 мин) волны РД говорят о том, что основной вклад в её развитие вносят внесинаптические процессы.

Электрофизиологический эксперимент для определения изменения в связанности между двумя полушариями в кортико-лимбической системе (неокортексе) головного мозга крыс проводился на взрослых крысах-самцах линии Wistar. За две недели до начала эксперимента крысам были имплантированы электроды

для регистрации электрокортикограммы (ЭКоГ) и направляющие канюли для проведения фокального микроповреждения нервной ткани. Электрическую активность фронтальной коры в широком диапазоне частот регистрировали с помощью усилителя постоянного тока с высоким входным сопротивлением и АЦП (Е14-440, L-Card, Россия) в условиях хронического эксперимента.

В нашем распоряжении имелись записи ЭКоГ, полученные в условиях свободного поведения у восьми бодрствующих крыс. У ряда животных было получено несколько записей, всего 14. Появление РД в областях регистрации определялось по характерным медленным сдвигам внеклеточного потенциала. Анализировались 600-секундные эпохи записи ЭКоГ фронтальной коры обоих полушарий до и после одностороннего повреждения амигдалы и индукции волны РД. Записи ректифицировались методом скользящего среднего, удалялись низкочастотные тренды, подвергались полосовой фильтрации (50 Гц), затем корректировались артефакты, вызванные выходом сигнала за динамический диапазон АЦП. Сегменты были разделены на 20-секундные неперекрывающиеся последовательные интервалы. Для каждого интервала была вычислена мера связанности — функция взаимной информации по методу, предложенному в [2].

Анализ межполушарной функциональной связности в сигнале в целом с использованием функции взаимной информации (нелинейная, частотно неразрешённая мера ненаправленного взаимодействия) показал значительное изменение межполушарной связности под влиянием РД. Оказалось, что одновременно с падением мощности корковых осцилляций односторонняя волна РД вызывает существенное (в 2-5 раз) ослабление функциональной связанности между полушариями (уменьшение функционального сходства сигналов). Минимум взаимной информации достигается в среднем через 100 секунд после начала снижения. Восстановление связанности до фонового уровня занимает ещё 100-200 с. Работа выполнена при поддержке РНФ, грант № 22-15-00327.

1. Vinogradova L.V., Suleymanova E.M., Medvedeva T.M. Transient loss of interhemispheric functional connectivity following unilateral cortical spreading depression in awake rats. *Cephalalgia*. 2021 Mar;41(3):353-365.
2. Kraskov, Stögbauer H., Grassberger P. Estimating mutual information. *Physical Rev. E*. 69.066138, 2004.

Динамические модели начальных этапов дивергентной эволюции

Фрисман Е.Я.^{1*}, Кулаков М.П.¹, Жданова О.Л.²

¹*Институт комплексного анализа региональных проблем ДВО РАН, Биробиджан, Россия;*

²*Институт автоматики и процессов управления ДВО РАН, Владивосток, Россия;*

frisman@mail.ru

Сохранение сбалансированного полиморфизма в стационарной среде в рамках классической теории популяционной генетики возможно в условиях сверхдоминирования. Хотя обнаружить такой тип отбора удастся крайне сложно, полиморфизм в природе достаточно распространен, что поддерживает неослабевающий исследовательский интерес к выявлению и изучению механизмов, препятствующих потере генетического разнообразия. Наличие полиморфизма может оказаться первым этапом необходимым для первичной дивергентной эволюции популяций – возникновению различий в генетических структурах субпопуляций изначально однородной популяционной системы. В то же время устойчивая первичная генетическая дивергенция сама по себе оказывается дополнительным фактором поддержания полиморфизма в популяционной системе. Наиболее интересной и даже несколько парадоксальной с точки зрения популяционной генетики является возможность установления устойчивых различий на однородном по отбору ареале, т.е. в условиях одинаковости действия отбора во всех субпопуляциях. Единственный тип отбора, который может привести к такой дивергенции – дисруптивный отбор, в простейшем случае монокусного отбора – это пониженная приспособленность гетерозигот.

В первой части данного сообщения на основе математической модели исследуются механизмы, приводящие к возникновению первичной генетической дивергенции – устойчивых генетических различий между двумя смежными популяциями, связанными миграцией особей. Рассматривается следующая простая ситуация. Популяции панмиктичны с менделевскими правилами наследования. Приспособленность особей жестко определяется единственным диаллельным локусом. Мы используем динамическую модель, которая описывает изменение концентрации одного из аллелей, а также отношение численностей популяций к общей численности. Эту модель можно отнести к разделу эволюционной биофизики популяций. Показано, что дивергенция в такой модельной популяции достигается при пониженной приспособленности гетерозигот и появляется в результате мягкого расщепления неустойчивого состояния равновесия, соответствующего полиморфной популяции. В свободно развивающейся популяции с неограниченным ростом численности дивергентное состояние всегда неустойчиво и проявляется в динамике как часть переходного процесса при движении к одному из мономорфных состояний. Устойчивой генетической дивергенции оказывается лишь для популяций,

сохраняющих соотношение своих численностей на постоянном уровне. Например, с ограниченной или синхронной динамикой. В этом случае дивергенции предшествует седлоузловая бифуркация, а динамика оказывается квадростабильной – в зависимости от начальных условий популяции оказываются однородными по генетической структуре, либо между ними сохраняются существенные различия. Таким образом, для возникновения генетической дивергенции помимо популяционно-генетических факторов необходимо существенное экологическое лимитирование роста численности.

Более убедительно показать возможность генетической дивергенции на однородном ареале, максимально исключив при этом влияние гетерогенности среды обитания, можно только в лабораторных условиях. Весьма масштабные эксперименты такого рода были выполнены Ю.П. Алтуховым и соавторами с ящичными популяциями *Drosophila melanogaster*. В ходе этих экспериментов была, в частности, получена выраженная первичная дивергенция генетических структур субпопуляции по локусу α -ГДГ при практически идентичных условиях обитания в каждом из 30-ти ящиков. Во второй части данного сообщения мы с помощью математического моделирования попытались оценить роль дизруптивного отбора, в данном случае наличие пониженной приспособленности гетерозигот по α -ГДГ, в поддержании первичной генетической дивергенции, наблюдаемой в системе. Альтернативной гипотезой является закрепление различий генетических структур субпопуляций, происходящее фактически только в результате генетического дрейфа. Мы проанализировали математические модели динамики частот аллелей в большой панмиктической популяции и в системе из 30 локальных миграционно-связанных популяций и сопоставили модельные динамики частот аллелей под действием дизруптивного отбора и без него с реальными данными, полученными в экспериментальной работе Ю.П. Алтуховым и соавторами.

Результаты моделирования позволяют заключить, что в присутствии дизруптивного отбора в системе популяций, связанных стохастическими миграциями, первичная генетическая дивергенция возникает с достаточно большой вероятностью и оказывается структурно устойчивой. При этом сопоставление данных эксперимента с результатами моделирования позволяет заключить, что построенной Ю.П. Алтуховым с сотрудниками искусственной популяционной системе наверняка имел место дизруптивный отбор, который способствовал первичной генетической дивергенции популяций.

Если взглянуть на протекающие процессы несколько шире, то можно прийти к следующему обобщению. Поскольку исходное ядро экспериментальной популяционной системы создавалось гибридными особями, можно предположить, что в ходе ее развития параллельно проходило два разнонаправленных процесса. Первый заключался в том, что формировались блоки генов обеспечивающие повышенную приспособленностью гетерозиготных форм. Естественный отбор здесь был направлен на поддержание полиморфизма аллелей этих генов. Второй процесс был связан с расщеплением гетерозиготных форм и выявлением генов, характеризующихся повышенной приспособленностью гомозигот и дизруптивным характером динамики частот аллелей. В каждый из этих процессов были вовлечены и аллели генов, адаптивно нейтральные в данной экспериментальной системе. В силу тех или иных причин, основной из которых является, по-видимому, сцепление, эти нейтральные аллели в данной ситуации оказались генетическими маркерами соответствующих адаптивных процессов. Так локус эстеразы-6 оказался таким маркером для процессов направленных на поддержание полиморфизма аллелей, а локус α -ГДГ – маркером дизруптивного отбора, протекающего в системе и способствующего первичной генетической дивергенции.

Идентификация серотониновых нейронов у *Hymenolepis diminuta* и *Schmidtea mediterranea* с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (CLSM)

Крещенко Н.Д.^{1*}, Кузнецов Г.В.¹, Митьковский Д.Е.², Мочалова Н.В.³, Теренина Н.Б.³, Мовсесян С.О.³

¹Институт биофизики клетки РАН;

²Государственное бюджетное профессиональное образовательное учреждение Московской области
«Серпуховский колледж» (Серпухов, Московская область, Россия);

³Центр Паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (Москва, Россия);

nkreshch@rambler.ru

Работа посвящена изучению серотонинергических компонентов в нервной системе свободноживущих планарий и паразитических плоских червей (Platyhelminthes). Планарии *Schmidtea mediterranea* являются модельным биологическим объектом, который используют при изучении молекулярных механизмов регенерационных процессов и функционирования стволовых клеток. Цестода *Hymenolepis diminuta* является опасным паразитом кишечника человека и животных.

В работе использовали *S. mediterranea*, размером около 1 мм (7 особей), а также личинок цестод (цистициркоидов) *H. diminuta* длиной 149–170 мкм и шириной до 99–106 мкм. Особей фиксировали 4% параформальдегидом, затем помещали в 15% раствор сахарозы. Для идентификации серотонина у планарий были использованы серийные замороженные срезы. Для исследования цестод *H. diminuta* использовали тотальные препараты (4 особи). Образцы окрашивали антителами к серотонину (Immunostar) непрямым иммуноцитохимическим методом и анализировали с помощью флуоресцентного Leica DM6000 B, и конфокального лазерного сканирующего (CLSM) микроскопов Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия) Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН. Измерения проводили на микрофотографиях с помощью программы AxioVision Rel 4.8.1.0. Измеряли размер нейронов. Количественная оценка серотониновых нейронов проводится впервые.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия препаратов, окрашенных антителами к серотонину, показала, что у *H. diminuta* нервная система представлена головными ганглиями, расположенными в головном конце между четырьмя присосками, и двумя парами нервных стволов, соединенных серотонин-иммунопозитивными (-ип) нервными комиссурами.

Локализацию серотониновой иммунореактивности наблюдали в телах нервных клеток и нервных волокнах в центральной нервной системе личинок *H. diminuta*. Серотонин-ип нервные элементы присутствовали в латеральных (или церебральных) ганглиях, в соединительной комиссуре, в хоботковых ганглиях, а также в продольных нервных стволах и в поперечных нервных комиссурах. Обнаружено, что пара серотонинергических нервов (хоботковые нервы) идет от латеральных ганглиев к хоботковым ганглиям, чтобы присоединиться к ним. В каждом из двух латеральных ганглиев идентифицировано несколько серотонин-ип нейронов. Всего в головном конце тела можно было наблюдать от 14 до 18 серотониновых нейронов.

Серотонин-ип нервные волокна присутствуют в нервных сплетениях внутри каждой присоски. Положительное окрашивание на серотонин наблюдается в нейритах, составляющих продольные нервные стволы, два из которых являются наиболее выраженными с расстоянием между ними около 50–64 мкм. Серотонинергические нейроны (в количестве 6–8) были обнаружены вдоль нервных стволов, которые соединены несколькими тонкими серотонин-ип нервными комиссурами.

Среднее значение размеров серотониновых нейронов у личинок *H. diminuta* составило: длина 4.80 ± 0.28 , ширина 3.53 ± 0.34 мкм, ($n=54$, здесь и далее дано среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение, n – число измерений). Средний размер серотониновых нейронов в передней трети тела личинки (головной конец) составил: длина 4.91 ± 0.68 , ширина 3.67 ± 0.70 мкм ($n=19$).

У планарий *S. mediterranea* выявили обилие серотонин-ип нейронов и нервных волокон в центральных и периферических отделах нервной системы. Нервная система представлена головным нервным ганглием, имеющим форму дуги, и парой нервных стволов, простирающихся вдоль тела планарии. Число серотониновых нейронов в головном ганглии *S. mediterranea*, наблюдаемых на одном срезе, составило 25.7 ± 3.1 . Ширина дуги головного ганглия составила 109.2 ± 15.3 мкм. Внутренняя часть головного ганглия состоит из тонких, окрашенных антителами к серотонину нервных волокон (так называемый «нейропиль»), тела же серотониновых нейронов у *S. mediterranea* расположены по периферии головного ганглия. Это в основном биполярные и мультиполярные, редко униполярные серотонин-ип нейроны. Средняя длина нейрона головного ганглия планарии 13.39 ± 3.59 мкм, а ширина 9.34 ± 2.42 мкм ($n=120$).

В периферических отделах нервной системы, а именно, в субмышечной нервной сети обнаружены многочисленные серотонин-ип нервные волокна и тела нейронов. Это в основном мультиполярные нейроны, реже биполярные, форма тел нейронов овальная, вытянутая, или неправильная. Размеры периферических нейронов планарий *S. mediterranea*: длина 10.19 ± 2.55 мкм, ширина 7.51 ± 1.78 мкм ($n=87$).

Итак, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия совместно с иммуноцитохимической окраской тканей специфическими флуоресцентно мечеными антителами позволила идентифицировать и охарактеризовать серотониновые нейроны в нервной системе представителей паразитических и свободноживущих представителей плоских червей. Проведенное исследование позволило определить общее число, а также, локализацию и морфологические характеристики серотониновых нейронов центральной нервной системы планарий *S. mediterranea* и цестод *H. diminuta*. Морфометрические данные серотониновых нейронов, получены на большом числе измерений и приводятся впервые.

Результаты указывают на широкое распространение нейромедиатора серотонина у плоских червей. Обнаружено, что серотонинергические нейроны головного ганглия планарий являются более крупными, по сравнению с нейронами, расположенными в периферических отделах нервной системы. Число и размер нейронов планарий значительно превышает размеры нейронов у личинок паразитических цестод. Необходимо проведение исследований нервной системы с использованием большего числа видов для последующего сравнительного анализа морфометрических характеристик серотонин-ип компонентов нервной системы у свободноживущих и паразитических червей. Полученные сведения могут быть полезны для выявления и описания эволюционных закономерностей централизации нервной системы у билатерально симметричных организмов (Bilateria).

Изучение соотношения структура-активность ряда химических соединений с противовирусной активностью

Дохоян А.Ю.^{1,2*}, Кезин В.А.², Анашкина А.А.^{1,2}

¹Сеченовский Университет;

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук;
adnastasyia@gmail.com

В связи с появлением новых лекарственно-устойчивых штаммов вирусов, вновь возникающих инфекций, высокой распространенностью коинфекций и повышенной восприимчивостью населения к вирусным заболеваниям, актуальным стало создание современных эффективных противовирусных лекарственных препаратов с улучшенными свойствами. Ранее были синтезированы новые соединения на основе 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов для ингибирования вирусных мишеней [1]. Целью данной работы был анализ структур химических соединений, обладающих противовирусной активностью, из работы [1], и предсказание новых соединений с противовирусной активностью.

Для комплексного анализа взаимосвязи структура-активность (QSAR) ряда химических соединений-аналогов нуклеозидов с известными данными о противовирусной активности использовалась программа MOE [2]. В программе MOE смоделированы 3D структуры химических соединений с известной противовирусной активностью и объединены в базу данных.

Для всех соединений были рассчитаны более 400 различных физико-химических свойств (декрипторов), из которых 18 вошли в модель, описывающую активность соединений. Среди выбранных дескрипторов оказались, например, сумма площадей ван-дер-ваальсовой поверхности гидрофобных атомов и молекулярная масса соединения. Модель описывает активности соединений с высокой точностью. По библиотекам нуклеозидных соединений и комбинаторным библиотекам, на основе модели, проведен поиск соединений с потенциально более высокой противовирусной активностью. Найдено 131 новое химическое соединение с предсказанными противовирусными свойствами. Наиболее высокая предсказанная противовирусная активность оказалась у соединения O=C1[N+@H](CCCCO)C=C2C(=N1)NC(c1ccc(CCCCC)cc1)=C2.

Также с помощью MOE были построены 2D структуры представленных химических соединений, была создана база данных, включающая структуры соединений и активность, полученную экспериментальным путем. С помощью программного обеспечения GUSAR [3] эту базу данных проанализировали: был проведен поиск структурных элементов, отвечающих за активность. Системный анализ соотношения «Структура-активность» в программе позволил выявить определённые закономерности в строении молекул и выделить перспективные структуры с наибольшим вкладом в эффективность действия.

Результаты выполненных работ могут служить вкладом в развитие методологии химического структурного синтеза потенциально социально востребованных лекарств, основанных на использовании релевантных свойств выделенных химических соединений. Планируется последующий синтез и экспериментальная проверка предсказанных соединений.

Источники.

1. Хандажинская А.Л. Новые аналоги нуклеозидов в качестве прототипов антивирусных и антибактериальных агентов: диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук – Москва, 2022. – 260 с.

2. Molecular Operating Environment (MOE). 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7: Chemical Computing Group ULC, 2022.

3. Zakharov A.V. et al. QSAR Modeling and Prediction of Drug–Drug Interactions // Mol. Pharmaceutics. American Chemical Society, 2016. Vol. 13, № 2. P. 545–556.

Изучение соотношения структура-активность ряда химических соединений с противотуберкулезной активностью

Богданова Л.Г.^{1,2*}, Кезин В.А.², Анашкина А.А.^{1,2}

¹Сеченовский Университет;

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук;
lilia.bgdnv@gmail.com

Инфекционное заболевание туберкулез, продолжает оставаться одной из основных проблем здравоохранения всего мира. Возникновение новых штаммов с множественной лекарственной устойчивостью

(МЛУ-ТБ) создает необходимость в создании современных препаратов с улучшенными свойствами и повышенной эффективностью. Одна из стратегий создания – поиск новых химиотерапевтических агентов. В связи с этим, актуальной задачей является поиск новых химических соединений – потенциальных лекарств с помощью анализа закономерностей строения в химических соединениях, которые подавляют рост и развитие штаммов *M. Tuberculosis*.

Целью данной работы являлся анализ существующих химиотерапевтических агентов на основе 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов с противотуберкулезной активностью и поиск их свойств, отвечающих за проявляемую активность, а также предсказание новых химических соединений с улучшенными свойствами.

Для исследования закономерностей в строении химических соединений с уже известной активностью была использована программа MOE [1]. Для описания модели таких соединений было выбрано 18 дескрипторов на основе их статистической значимости, в частности: величина потенциальной энергии, суммарная энергия SCF (ккал/моль), потенциал ионизации (ккал/моль) и т.д. Далее, с помощью модели, был выполнен поиск соединений с предсказанной активностью, сравнимой с активностью у существующих противотуберкулезных препаратов.

Предсказана высокая противотуберкулезная активность семи химических соединений, самая лучшая у соединения Nc1c(C2=C/C(=C\C)/N=C2)ncn1. Планируется синтез предсказанных соединений и экспериментальная проверка их активности на бактерии *M. tuberculosis*.

Литература

1. Molecular Operating Environment (MOE). - 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7: Chemical Computing Group ULC, 2022.

Использование дробных производных для моделирования профиля пульсовой волны давления

Гамилов Т.М.^{1,2,3*}, Рогов А.В.^{1,2}, Кириченко Я.Ю.¹

¹*Сеченовский Университет, Москва, Россия;*

²*Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия;*

³*Университет Сириус, Сочи, Россия;*

gamilov.tm@mipt.ru

В последнее время для описания различных явлений в физике, механике, экономике, науках о природе все большее распространение получают математические модели, содержащие дробные производные. Дробно-дифференциальные уравнения дают более адекватное и точное описание многих процессов, чем классические уравнения с целыми производными. Они успешно применяются в математической биологии, гидрогеологии при моделировании процессов тепло- и массопереноса в сильно неоднородных средах, задачах упруго-пластичности, в эпидемиологии и др.

Одним из таких приложений является использование моделей с дробными производными для описания гемодинамических процессов. Интерес к дробным производным со стороны специалистов гемодинамики обусловлен, с одной стороны, возможностью моделировать сложные течения с вязко-упругостью, анизотропной вязкостью, эффектами памяти т.д., а с другой – возможностью более реалистичного воспроизведения форм пульсовых волн. Последняя задача становится особенно актуальной в последние годы с развитием вычислительной техники и возрастающего интереса к обратным задачам.

В данной работе предлагается использовать модель одномерной гемодинамики для описания течения крови в аорте и коронарных артериях. Каждый сосуд представляет собой одномерную эластичную трубку, по которой течёт вязкая несжимаемая жидкость. В точках ветвлений сосудов перераспределение потоков рассчитывается с помощью закона сохранения массы и непрерывности полного давления. Построенная сеть сосудов требует задания граничных условий на входе (около сердца) и на выходах (области микроциркуляции). На входе задаётся зависимость потока от времени, соответствующая сердечному выбросу среднестатистического человека. На выходах задаётся перепад давлений через гидродинамические сопротивления.

Дробные производные используются для модификации граничных условий на конце аорты и описания растяжимости микроциркуляторного русла. Рассмотрены различные значения показателя дробной производной Капуто. Величина показателя влияет на форму пульсовой волны давления в аорте и, как следствие, в коронарных артериях.

Форма пульсовой волны может оказывать влияние на индексы, используемые для оценки гемодинамической значимости стенозов коронарных артерий, например на iFR (индекс свободной волны). iFR вычисляется как отношение давлений после и до стеноза в период расслабления желудочков сердца. Значения iFR используются в диагностике для принятия решения о хирургическом вмешательстве.

Дробные производные могут использоваться для персонализации модели кровотока путём подбора показателя и воспроизведения формы пульсовой волны пациента. Подобная персонификация модели важна при точной оценке различных гемодинамических индексов, влияющих на выбор стратегии лечения пациента.

Исследование биомолекулярной сольватации в рамках теории классического функционала атомной плотности

Чуев Г.Н.^{1*}, Кручинин С.Е.², Федотова М.В.²

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

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

genchuev@rambler.ru

Биомолекулярная сольватация в растворах играет одну из определяющих ролей в протекании множества жизненно важных процессов. В живом организме биомолекулы вовлечены в большое количество межмолекулярных взаимодействий – с водой (гидратация), между собой (ассоциация, самоагрегация), с присутствующими в среде ионами (ассоциация) или с лигандами (комплексообразование). От специфики проявления этих взаимодействий существенным образом зависит их биологическая активность. Однако определение параметров гидратации, ассоциации, комплексообразования молекул с помощью экспериментальных методов во многих случаях представляет значительную проблему, как техническую, так и финансовую. Чрезвычайно затратными для сольватированных биомолекул оказываются и расчеты методами численного моделирования.

В докладе обсуждаются проблемы неэмпирического исследования эффектов сольватации, включая расчеты свободной энергии гидратации биомолекулы и свободной энергии связывания белок-лиганд. Для преодоления проблем точности и скорости таких расчетов предлагается использовать теорию классического функционала атомной плотности с рядом новых подходов. Первая методика направлена на корректный анализ трехмерной гидратной структуры с использованием новой простой процедуры точного определения толщины гидратной оболочки и гидратных чисел биомолекул. Второй подход реализуется путем расчета параметров комплексообразования биомолекул в ограниченной области их гидратной оболочки для увеличения скорости расчетов. Третья методика основана на новой параметризации функционала свободной энергии сольватации (гидратации) для повышения точности расчетов. Применение этих подходов для *in silico* исследования биомолекулярной гидратации рассмотрены на примере белков - ингибитора бычьего панкреатического трипсина (BPTI) и тирозинфосфатазы 1B (PTP1B), а также ряда лекарственных соединений, для которых белок 1B (PTP1B) является мишенью. Представлены также результаты для комплекса с участием рецептор-связывающего домена (RBD) шиповидного (S) белка вируса SARS-CoV-2 и ангиотензинпревращающего фермента рецептора клеточной мембраны человека (hACE2).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-23-00184, <https://rscf.ru/project/22-23-00184/>)

Исследование различных режимов питания с помощью математической модели углеводно-липидного обмена адипоцита

Чистякова Ю.А.^{1*}, Фурсова П.В.¹, Хрущев С.С.¹, Плюснина Т.Ю.¹

¹ *МГУ;*

chistyakyu@gmail.com

Нарушения метаболизма жиров и углеводов могут привести к развитию различных патологических состояний и заболеваний, как, например, атеросклероз, диабет второго типа и ожирение. Количество людей в мире, имеющих лишний вес или страдающих ожирением, растет на протяжении последних десятилетий, поэтому и исследование путей борьбы с избытком массы тела ведется довольно активно. Наиболее часто используемым подходом к коррективке веса и улучшению метаболизма является подбор диетического питания. Однако, эмпирический подбор диет может быть не всегда правильным, а иногда и в корне ошибочным из-за особенностей метаболизма конкретного человека. Математические модели могут описывать процессы превращения различных веществ и поэтому являются очень важным инструментом для исследования метаболизма. Существует множество различных моделей метаболизма, в том числе и применительно к

метаболизму липидов и углеводов [1], [2], [3]. Такие модели могут быть разной степени детализации, в зависимости от целей моделирования, могут включать один или несколько органов и тканей, множество метаболитов. Однако, есть некоторый набор метаболитов, который встречается в большинстве моделей углеводно-липидного обмена, который включает глюкозу, триглицериды, жирные кислоты и инсулин в роли эффектора.

В данной работе была построена математическая модель углеводно-липидного обмена адипоцита. Модель представляет из себя систему из тринадцати дифференциальных уравнений, записанных по Михаэлису-Ментен. Основными переменными модели являются концентрации метаболитов плазмы крови – глюкозы, инсулина, триглицеридов и жирных кислот, метаболитов адипоцита – глицеральдегид-3-фосфата, жирных кислот и триглицеридов жировой капли, а также измеряемые в килокалориях жиры, белки и углеводы, поглощаемые в процессе питания. Инсулин в модели выступает в роли эффектора: активирует реакции, направленные на образование триглицеридов липидной капли, и ингибирует реакции их распада. Модель была верифицирована на трех типах данных [2], [4] и показала высокий уровень согласованности с экспериментами. Далее было исследовано поведение модели при изменении количества приемов пищи, а также при различном соотношении жиров и углеводов в пище. Были рассмотрены двух-, трех и пятиразовое питания, для каждого режима питания были исследованы влияние трех типов диет: с низким содержанием углеводов и высоким содержанием жиров, с низким содержанием жиров и высоким содержанием углеводов, и рацион, описанный в статье, по данным которой проводилась верификация модели.

Было показано, что при высоком содержании жиров в рационе двух-, трех- и пятиразовое питание приводит к снижению концентрации триглицеридов жировой капли. При обычном и углеводном питании двухразовое питание ведет к снижению, а пятиразовое питание к увеличению концентрации триглицеридов, трехразовое же питание оказывает незначительное влияние на их концентрацию.

Было выдвинуто предположение, что различия в динамике триглицеридов в жировой капле при разном количестве приемов пищи возникают из-за неодинакового инсулинового ответа. Выработка инсулина в ответ на повышение глюкозы и поступление глюкозы в клетку взаимозависимые процессы, активирующие друг друга. Несмотря на одинаковое количество поглощенных за сутки углеводов при разной периодичности питания, количество образовавшегося за сутки инсулина различается. Это связано с нелинейной зависимостью ответа инсулина на повышение концентрации глюкозы в крови. Такая зависимость является функцией с насыщением, то есть при увеличении уровня глюкозы выше некоторой концентрации ответ инсулина перестает меняться. Таким образом, при двух- и трехразовом питании, хотя амплитуды пиков концентрации глюкозы после приемов пищи различаются сильно, амплитуды пиков концентрации инсулина практически не отличаются, но в одном случае пиков два, а в другом три, из-за чего наблюдается неодинаковый инсулиновый ответ.

Литература

1. O'Donovan S. D., Lenz M., Vink R. G., Roumans N. J. T., T. M. C. M. de Kok, Mariman E.C. M., Peeters R. L. M., N. A. W. van Riel, M. A. van Baak, Arts I.C. W. 2019. A computational model of postprandial adipose tissue lipid metabolism derived using human arteriovenous stable isotope tracer data. PLOS Computational Biology. 3.
2. Pratt A.C., Wattis J.A.D., Salter A. M. 2015. Mathematical modelling of hepatic lipid metabolism. Mathematical Biosciences. 262, 167-181.
3. Jelic K., Hallgreen C.E., Colding-Jørgensen M. 2009. A Model of NEFA Dynamics with Focus on the Postprandial State. Ann Biomed Eng. 37, P. 1897.
4. Cruz M. L., Evans K., Frayn K. N. 2001. Postprandial lipid metabolism and insulin sensitivity in young Northern Europeans, South Asians and Latin Americans in the UK. Atherosclerosis. 159(2), 441-449.

Как AlphaFold находит структуру белка: предсказывает он её на основе физики, или распознает по сходству последовательностей с помощью огромных баз данных?

Финкельштейн А.В.^{1,2,3*}

¹Институт белка Российской академии наук;

²Биотехнологический факультет МГУ им. Ломоносова;

³Биологический факультет МГУ им. Ломоносова;

afinkel@vega.protres.ru

Огромный успех программ типа AlphaFold [1-3] в идентификации структуры белка по его аминокислотной последовательности подымает вопросы: (i) В чем главная причина этого успеха? (ii) Что именно делает AlphaFold: основанное на физике предсказание пространственной структуры белка, или распознавание этой структуры по сходству целевой аминокислотной последовательности с последовательностями с уже известной пространственной структурой? Ответы, данные в этом докладе, таковы: основной причиной успеха программ

типа AlphaFold является (i) использование огромных баз данных, которые уже охватывают практически все существующие в природе суперсемейства белков; (ii) используя эти базы данных, множественные выравнивания последовательностей и коэволюционную информацию, такую как корреляции в триплетах аминокислотных остатков контактирующих участков цепи, программ типа AlphaFold распознают пространственную структуру белка по сходству его аминокислотной последовательности (или ее частей) с родственными последовательностями с уже известными трехмерными структурами [4]. Подчеркну, что это не умаляет достоинства и полезности AlphaFold; это только объясняет основу его успеха.

Я благодарен Российскому научному фонду (грант № 21-14-00268) за финансовую поддержку.

Литература

1. A. W. Senior et al., Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. Nature 577, 706–710 (2020).
2. J. Jumper et al., Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature 596, 583–589 (2021).
3. G. Ahdriz et al., OpenFold: Retraining AlphaFold2 yields new insights into its learning mechanisms and capacity for generalization. bioRxiv preprint (2022) <https://doi.org/10.1101/2022.11.20.517210>.
4. A.V. Finkelstein, Does AlphaFold predict the spatial structure of a protein from physics or recognize it (its main parts and their association) using databases? bioRxiv preprint <https://doi.org/10.1101/2022.11.21.517308> (November 22, 2022).

Как изменение электрических зарядов белков способствует их переупаковке в оболочках вирусов Зика и Денге при созревании

Голушко И.Ю.^{1*}, Коневцова О.В.¹, Подгорник Р.², Рошаль С.Б.¹

¹Южный федеральный университет;

²Университет китайской академии наук;

vaniagolushko@yandex.ru

Электростатические силы играют ключевую роль во множестве биологических процессов на молекулярном уровне, являясь частью как близкодействующих, так и далекодействующих взаимодействий. За исключением особой изоэлектрической точки, соответствующей раствору определенной кислотности, белки всегда имеют неравный нулю электрический заряд, который может достигать величины нескольких десятков элементарных зарядов на молекулу. Одной из ключевых особенностей электростатики белков по сравнению с классической электростатикой коллоидов является наличие ионизируемых аминокислотных остатков. Из-за этого присутствие подвижных ионов в окружающем растворе не только экранирует заряды белков, но и напрямую влияет на их величину. Изменение pH раствора приводит к диссоциации ионизируемых остатков, изменяя как общий заряд белка, так и его распределение в пространстве. Сопутствующие изменения электростатических взаимодействий могут оказывать влияние на вторичную, третичную и четвертичную структуры белка.

В работе мы исследуем роль электростатических сил в масштабной перестройке оболочек вирусов Денге и Зика в ходе их созревания. Эти родственные вирусы обладают сложным трёхслойным строением капсида. Его внутреннее белковое ядро окружено липидной мембраной, на которой расположена внешняя оболочка, состоящая из продолговатых структурных белков. Прежде чем сформировавшийся в эндоплазматическом ретикулуме вирус сможет заражать клетки, он должен попасть в кислую среду, где его пористая оболочка с развитой морфологией претерпевает масштабные конформационные изменения, в результате которых белки переупаковываются в более плотную и гладкую структуру.

Мы анализируем структуры вирусов Денге и Зика на различных этапах их жизненного цикла в рамках развиваемой полуколичественной электростатической модели [1,2]. Учитывая существенные размеры системы ($\sim 10^7$ атомов), мы рассматриваем вирусную оболочку как совокупность точечных зарядов, соответствующих ионизируемым остаткам. Используя изотерму Гендерсона – Хассельбаха, мы определяем частичные заряды аминокислот в белках для различных значений pH, а затем рассчитываем соответствующие энергии электростатического взаимодействия между белками в рамках приближения Дебая – Хюккеля.

Мы показываем, что при уменьшении pH электростатическая энергия начального состояния становится больше энергии конечного зрелого, что и способствует переупаковке белков внешней оболочки. Вклад в активацию перехода могут вносить сразу несколько механизмов. Во-первых, это изменение взаимодействий между белками внешней оболочки, вызванное как изменением общего заряда, так и его перераспределением между частями молекулы. Например, в вирусе Денге с уменьшением pH возрастает положительный заряд рг доменов, расположенных на концах структурных белков внешней оболочки. До конформационных изменений рг домены объединены в тройки, но в результате перестройки практически равномерно распределяются по поверхности вируса, что значительно уменьшает силы отталкивания между ними. Во-вторых, это увеличение

притяжения между отрицательно заряженной липидной мембраной вируса и структурными белками внешней оболочки, приобретающими большой положительный заряд в кислой среде, что делает более плотную, зрелую структуру энергетически более выгодной. Наконец, взаимодействие с внутренним ядром, также может способствовать перестройке внешней оболочки.

Исследование и моделирование уникального механизма созревания вирусов Денге и Зика представляет интерес сразу по нескольким причинам. Прежде всего, это разработка новых препаратов, направленных на его нарушение. С другой стороны, полученные знания могут быть использованы при разработке новых кристаллических пористых композитных нанобиоматериалов, состоящих из липидных мембран и связанных с ними белковых комплексов, способных подобно вирусам Денге и Зика к структурной перестройке под действием pH окружающей среды. Такие материалы могут использоваться для адресной доставки лекарств и их пролонгированного выпуска.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-12-00105).

1. S. B. Rochal, O. V. Konevtsova, D. S. Roshal, A. Božič, I. Y. Golushko and R. Podgornik, *Nanoscale Adv.*, 2022, 4, 4677–4688. *Nanoscale Adv.*, 2022, 4, 4677–4688

2. O. V. Konevtsova, I. Y. Golushko, R. Podgornik and S. B. Rochal, *Biomater. Sci.*, 2023, 11, 225–234.

Как повысить эффективность культивирования диатомовой водоросли *Skeletonema costatum*?

Суглобов А.С.¹, Кузнецов А.В.^{2,3*}

¹Центр дополнительного образования "Малая академия наук", Севастополь, 299055;

²Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, 299011;

³Севастопольский государственный университет, Севастополь, 299053;

andrei_kouznetsov@hotmail.com

Введение

Многие бактерии используют коммуникацию между клетками, называемую чувство кворума (quorum sensing), для координации изменений в поведении, зависящих от плотности популяции. Данное явление основано на секреции в окружающую среду и восприятии сигнальных молекул, концентрация которых изменяется в зависимости от количества окружающих клеток [Popat et al., 2015; Abisado et al., 2018]. Чувство кворума было обнаружено у морских бактерий [Zhao et al., 2019], дрожжей [Rosselló, Bouza, 2013], губок [Padder et al., 2018] и других видов одноклеточных, в частности, у микроводорослей [Zhang et al., 2021].

Диатомовые водоросли (Diatomeae) – это фотосинтезирующие водоросли, отличающиеся наличием «панциря» из диоксида кремния, называемого фрустулой, строение которой уникально для каждого вида, что делает их привлекательными для нанотехнологии [Rabiee et al., 2021]. Являясь важнейшей составляющей морского планктона, диатомеи создают до четверти всего органического вещества планеты [Белякова, 2006].

Интерес представляет космополитическая диатомовая водоросль *Skeletonema costatum* [Shevchenko et al., 2022], которая обитает в Чёрном море, биология и условия культивирования которой хорошо изучены [Kumar et al., 2014]. Геном *S. costatum* секвенирован, имеет в длину 51,13 Mb с GC-контентом 45,1%, экология и физиология описаны, что даёт понимание биологии этих организмов и может прояснить ряд прикладных вопросов. Например, как повысить выход биомассы при культивировании микроводорослей в искусственных условиях?

Биоинформационный анализ

У *Thalassiosira pseudonana* известны два специфичных для смерти белка: DSP1 и DSP2 (death-specific protein, DSP), что позволило найти ортологи у *S. costatum*, применяя процедуру pBLASTp к базе nr [Sayers et al., 2021]. Используя обе матрицы ABU86411.1 и ABU86412.1 из *T. pseudonana*, мы нашли протеиновые последовательности AAY27742.1 и ABU86410.1 в *S. costatum*. Дальнейший анализ протеинов AAY27742.1 и ABU86410.1 был проведён на сервере Protomenal [NOVEL, 2004], который позволяет выявлять функциональные домены. Оказалось, что оба белка содержат регуляторный EF-hand домен на С-конце полипептидной цепи, но отличаются по содержанию актуаторных доменов.

Математическое моделирование

Предположим, что активность белков, участвующих в процессах смерти у *S. costatum*, предотвращает тотальное вымирание при интенсивном росте, и возможно, лимитирует ростовые характеристики культур этих клеток в лабораторных условиях. Мы провели симуляционное моделирование в среде NetLogo [Wilensky, 1998, 1999; Liu, 2001]. Первоначально применили модели экспоненциального и логистического роста, входящие в список стандартных моделей NetLogo, которые используют системную динамику, где эксплуатируется идея лимитирования роста извне, например под действием неблагоприятных факторов среды или в результате

истощения запасов питательных веществ. Тем не менее, как показывают наши данные о присутствии DSP генов в геноме *S. costatum*, внутренне управление предлагает возможность превентивной регуляции, которая могла возникнуть в ходе эволюции, как механизм, обеспечивающий надёжное выживание популяции в условиях быстро изменяющейся среды. Следовательно, логичнее каждую клетку представлять в виде автономного агента, настроенного на непрерывное размножение, а также запрограммировать смерть в случае достижения порогового значения кворума или же выполнять симуляцию без граничных условий размножения, что соответствует отсутствию активности DSP белков в клетках. Симуляция начиналась с генерирования исходной случайной немногочисленной популяции агентов, ощущающих кворум. Размножение агентов сопровождалось выделением сигнальных молекул, при достижении максимальной локальной плотности которых происходит частичная гибель агентов, а потом повторяется всё с начала. Система устойчива на длительном интервале времени.

Заключение

Таким образом, при помощи биоинформационного анализа нами обнаружены 2 специфичных для смерти белка в диатомовой водоросли *S. costatum*. Имитационное агентно-ориентированное моделирование продемонстрировало устойчивый колебательный рост, регулируемый чувством кворума, а также безудержное экспоненциальное размножение при отключении внутренней регуляции. Молекулярно-биологические данные свидетельствуют, что в реальных бактериях и микроводорослях кворум-система осуществляет элиминацию клеток хозяина при помощи соответствующих DSP белков [Thamatrakoln et al., 2013; Hao et al., 2021], 2 из которых (AAU27742.1, ABU86410.1) мы обнаружили закодированными в геноме диатомовой водоросли *S. costatum*. Наши находки перекликаются с исследованиями на *S. costatum* [Chung et al., 2005, 2008] по авторегуляции численности этих организмов в условиях стресса. Выключение активности данных генов теоретически может привести к бесконтрольному росту культур при отсутствии лимита по питанию, что является интереснейшей находкой для крупномасштабного культивирования в биотехнологии. Практически это можно осуществить при помощи РНК-интерференции [Han, 2018] на уровне транскрипции или, что более практично, с помощью CRISPR/Cas9-таргетинга [Ma et al., 2014] соответствующих генов на уровне генома или с применением низкомолекулярных ингибиторов DSP белков с целью предотвратить автокаталитический лизис клеток.

Работа выполнена в рамках проекта Сириус.Лето «Трихоплакс для бионики III; от сенсоров к актуаторам» № 100220220512058031.

Компьютерный анализ структуры генной сети глиобластомы и опухолей мозга

Туркина В.А.^{1*}, Майорова А.А.¹, Дергилев А.И.², Красильникова А.А.¹, Ланских Д.В.³, Кумейко В.В.³, Орлов Ю.Л.^{1,2,3}

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);

²Новосибирский государственный университет;

³Дальневосточный Федеральный Университет;

y.orlov@sechenov.ru

Рассмотрена компьютерная модель генной сети глиобластомы с целью поиска ассоциаций с другими опухолями мозга (Gubanova et al., 2021). Актуальность задачи обусловлена тем, что мультиформная глиобластома (Glioblastoma multiforme) — наиболее распространенный рак мозга, и вторая по распространенности опухоль головного мозга (Louis et al, 2007). Клетки глиобластомы могут развиваться из нормальных клеток, а также из клеток существующей астроцитомы низкой степени злокачественности (5%). Причина большинства случаев глиобластомы неизвестна (Gulaia et al., 2022). Нестандартными факторами риска являются генетические нарушения, такие как нейрофиброматоз и синдром Ли–Фраумени, а также предшествующая лучевая терапия. Отмечалось, что заболеваемость глиобластомой связана с вирусами SV40 (Vilchez et al, 2003), ВГЧ-6 и цитомегаловирусом

Поставлена задача построения (сбора) списка генов, ассоциированных с развитием глиобластомы, анализа категорий генных онтологий для такого списка и реконструкции генной сети. Рассмотрены базы данных клинических исследований и выбраны наиболее значимые препараты для лечения глиобластомы и их «мишени».

Использовались интернет-ресурсы OMIM (<https://www.omim.org/>), MalaCards.org и ресурсы моделирования, используя ранее опубликованные подходы (Орлов и др., 2021). Список содержал 551 название гена: ENO1, MTOR, PTEN, KRAS и др. Для анализа категорий генных онтологий использовался ресурс DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>).

Показано, что наиболее значимыми категориями для генов глиобластомы по DAVID являются связывание ферментов (enzyme binding), негативная регуляция экспрессии генов (negative regulation of gene expression). В

целом, большинство генов относятся к категориям, регулирующим образование опухолей, в том числе – апоптоз, связывание ферментов и протеинкиназ, негативные регуляции клеточной пролиферации и генов, характерные для нервной системы термины, такие как регуляции апоптоза нейронов и регуляция катаболизма предшественника бета-амилоида. Ресурсы анализа онтологий (DAVID, PANTHER, GOST) выделяют основными генными онтологиями глиобластомы ангиогенез, регуляцию сигналинга и апоптоза, связывание ферментов и белков.

Использовались онлайн инструменты реконструкции генных сетей GeneMANIA, STRING-DB, Metascape (<https://metascape.org/>). Статистика по STRING-DB показывает, что сеть имеет неслучайно большое число связей (со значимостью $<1.0e-16$), средняя степень связности узла сети (белка) – 9.61, коэффициент кластеризации 0.468. В центре сети представлены гены с наибольшим влиянием на другие гены и, вероятнее всего, наиболее связанные с возникновением и развитием глиобластомы: PTEN, PIK3CA, MTOR, KRAS, VEGF и др. С помощью инструмента Metascape был проведен расширенный анализ белок-белковых взаимодействий.

В структуре сети глиобластомы выявлено семь кластеров белок-белковых взаимодействий, суммарно в которых участвуют около 50 генов – 16% от общего числа, что нельзя назвать большим числом, но, тем не менее, также нельзя отрицать, что белки данных генов совсем изолированы друг от друга и не взаимодействуют. Общие пути, найденные Metascape, соответствуют основным способам инициации канцерогенеза - устойчивость к ингибированию рецептора эпидермального фактора роста (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance) и регуляция сигнального пути PI3K-Akt, также отвечающего за пролиферацию клеток. Также отдельно выделены комплексы репарации ДНК - MSH2-MSH6-PMS2-MLH1 и PCNA-MutS-alpha-MutL-alpha-DNA (при неправильной репарации ДНК риск развития онкологии увеличивается), ядерные комплексы (LINC complex) и регуляция хроматина (Chromatin modifying enzymes, Chromatin organization), гликолиз (NADH regeneration, canonical glycolysis, glucose catabolic process to pyruvate) (клетки опухоли подвержены эффекту Варбурга - склонность большинства раковых клеток производить энергию преимущественно с помощью очень активного гликолиза с последующим образованием молочной кислоты, а не с помощью медленного гликолиза и окисления пирувата в митохондриях с использованием кислорода, как в большинстве нормальных клеток).

Данные MalaCards и clinicaltrials.gov по лекарственным препаратам показывают, что наиболее используемыми являются классические препараты – Темозоломид и Бевацизумаб. Данные препараты были найдены с помощью ресурса Drugbank (<https://go.drugbank.com>) и сведены в таблицу с описанием механизма действия.

Исследование генных онтологий подтверждает, что наиболее успешными фармакологическими «мишенями» были бы ингибирование ангиогенеза, регулирование апоптоза и белковых/ферментативных путей, сигнальных рецепторов. Построение генных сетей показало, что некоторые гены, ассоциированные с глиобластомой, достаточно связаны между собой, когда как другие являются «выпадающими», значит, на них нельзя будет повлиять с помощью других «мишеней».

Благодарности:

Проект реализуется победителем грантового конкурса для преподавателей магистратуры 2021/2022 Стипендиальной программы Владимира Потанина.

Литература

1. Орлов Ю.Л., Галиева А.Г., Орлова Н.Г. и др. Реконструкция генной сети болезни Паркинсона для поиска генов-мишеней. Биомедицинская химия. 2021; 67(3): 222-230 doi: 10.18097/PBMC20216703222
2. Gubanova N.V., Orlova N.G., Dergilev A.I., Oparina N.Y., Orlov Y.L. Glioblastoma gene network reconstruction and ontology analysis by online bioinformatics tools. Journal of Integrative Bioinformatics. 2021; 18:20210031. doi: 10.1515/jib-2021-0031
3. Gulaia V., Shmelev M., Romanishin A. et al. Single-nucleus transcriptomics of IDH1- and TP53-mutant glioma stem cells displays diversified commitment on invasive cancer progenitors. Sci Rep. 2022;12(1):18975. doi: 10.1038/s41598-022-23646-3.
4. Louis, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol 2007; 114, 97–109.
5. Vilchez R.A., Kozinetz C.A., Arrington A.S. et al. Simian virus 40 in human cancers. Am J Med 2003; 114, 675–684.

МД моделирование взаимодействия пептидного дендримера Lys2Leu с биоактивными пептидами

Михтанюк С.Е.¹, Щербань-Филимошкин В.А.¹, Шавыкин О.В.¹, Неелов И.М.^{1*}

¹Университет ИТМО;

i.neelov@mail.ru

Дендримеры – это наноразмерные молекулы, которые состоят из центрального ядра, разветвленных повторяющихся блоков и концевых групп. Дендримеры высоких поколений токсичны для биомедицинских приложений из-за большого количества заряженных концевых групп. Эта проблема может быть преодолена пептидными дендримерами более низких поколений и их модификацией аминокислотными вставками между всеми точками ветвления [1-3]. В настоящей работе была изучена возможность использования лизинового дендримера Lys2Leu с дипептидными спейсерами из аминокислоты лейцина в качестве носителей лекарственных средств для доставки 16-ти биологически активных тетрапептидов, таких как Ala-Glu-Asp-Gly (AEDG), Ala-Gly-Ala-Gly (AGAG), Ala-Leu-Leu-Gly (ALLG). Молекулярно-динамическое моделирование взаимодействия между дендримером и пептидами проводилось в водном растворе с явным учетом контрионов при температуре T=310 К и давлении P=1 атм с использованием пакета программ Gromacs 4.5.6. Было получено, что отрицательно заряженные пептиды AEDG (8 из 16 пептидов) образуют наиболее стабильные и компактные комплексы с дендримером Lys-2Leu. Формы распределений по радиусам инерции для систем с пептидами AEDG и ALLG выглядят схожим образом, распределение для первого пептида смещено в сторону меньших значений радиусов инерции. Пептиды AEDG образуют примерно в два раза больше водородных связей с дендримером Lys2Leu по сравнению с пептидом ALLG. Наиболее гидрофобный пептид ALLG образует комплекс с 6 из 16 пептидов, в то время как пептид AGAG только с 2 из 16. Также была изучена внутренняя структура образовавшихся комплексов, получены функции радиального распределения плотности групп атомов. Радиальное распределение плотности атомов дендримера Lys2Leu в системе с пептидами ALLG имеет характерные минимумы, соответствующие проникновению пептидов во внутреннее пространство дендримера за счет гидрофобных взаимодействий. Таким образом наибольший вклад в образование комплексов вносит электростатическое взаимодействие между концевыми положительно заряженными группами дендримера и отрицательно заряженными группами пептидов, однако гидрофобных взаимодействий также оказывается достаточно для переноса гидрофобных молекул дендримером с гидрофобными вставками.

Работа была поддержана грантом РФФИ 20-53-12036.

1. Sommerfeld, N., Hejl, M., Klose, M., Schreiber-Brynzak, E., Bileck, A., Meier, S., Gerner, C., Jakupec, M., Galanski, M., Keppler, B. Low-Generation Polyamidoamine Dendrimers as Drug Carriers for Platinum(IV) Complexes. Eur. J. Inorg. Chem. 2017, 2017, 1713–1720.

2. Shah, N., Steptoe, R., Parekh, H. Low-generation asymmetric dendrimers exhibit minimal toxicity and effectively complex DNA. J. Pept. Sci. 2011, 17, 470–478.

3. Gorzkiewicz, M., Konopka, M., Janaszewska, A., Tarasenko, I., Sheveleva, N., Gajek, A., Neelov, I., Klajnert-Maculewicz, B. Application of new lysine-based peptide dendrimers D3K2 and D3G2 for gene delivery: Specific cytotoxicity to cancer cells and transfection in vitro. Bioorg. Chem. 2020, 95, 103504

4.N.N. Sheveleva, D.A. Markelov, M.A. Vovk, M.E. Mikhailova, I.I. Tarasenko, I.M. Neelov, Lysine-based dendrimer with double arginine residues, RSC advances, 2019, 9 (31), 18018-18026

5.N.N. Sheveleva, D.A. Markelov, M.A. Vovk, I.I. Tarasenko, M.E. Mikhailova, I.M. Neelov, Stable deuterium labeling of histidine-rich lysine-based dendrimers, Molecules, 2019, 24(13), 2481

6.B. Okrugin, M. Ilyash, D. Markelov, I. Neelov, Lysine dendrigraft nanocontainers. influence of topology on their size and internal structure, Pharmaceutics, 2018, 10 (3), 129

Математическая теория надежности и биофизика старения: краткая история и современное состояние

Кольтовер В.К.^{1*}

¹Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Московская область, Российская Федерация;

koltover@icp.ac.ru

Основы теории надежности технических объектов (reliability engineering) были разработаны в середине XX века в связи с потребностями авиационно-ракетной техники и проблемами связи и управления. Надежность

определяется как свойство объекта (конструкции) выполнять заданную функцию в течение заданного времени в заданных условиях [1]. В работе конструкций возможны случайные сбои (отказы). Аналогично, с ограниченной надежностью функционируют биологические объекты - от нанобиоконструкций до экосистем. Проблемы бионадежности – это классификация и систематизация отказов, механизмы отказов и механизмы их реализации в функциональных нарушениях, механизмы восстановления биоконструкций, разработка методов тестирования надежности и прогнозирования отказов в биосистемах различных уровней сложности [2, 3]. В 1978 г. при Научном совете по биологической физике АН СССР была организована Комиссия по проблемам надежности биологических систем, в составе которой были многие видные советские биофизики. Регулярные конференции по надежности биосистем, проводимые при содействии этой комиссии, и сборники трудов этих конференций стимулировали, четверть века спустя, аналогичные исследования за бывшим «железным занавесом» (biological robustness) [4]. Проблема надежности прямо связана с проблемой старения. В наших работах был разработан теоретико-надежностный подход к проблеме старения биосистем, основанный на нескольких общих постулатах [5-8]. Во-первых, предполагается, что все биологические конструкции синтезируются в соответствии с генетическими программами для выполнения заданных (генетически предопределенных) функций. Во-вторых, все биоконструкции работают с ограниченной надежностью, а именно: нормальные операционные действия чередуются со случайными сбоями (повторяющимися отказами). В-третьих, высокая системная надежность обеспечивается благодаря своевременной профилактике отказов, а именно; малонадежные элементы своевременно, до наступления фазы их износа, обновляются (метаболический turnover). В четвертых, постулируется, что существует конечное число управляющих элементов высшего уровня иерархии – критические структуры, которые контролируют процессы обновления компонентов клеток и тканей, по сути – структуры контроля системной надежности. И пятый постулат: эти критические структуры работают с ограниченной, предопределенной генетически, надежностью. На этой основе естественным образом объясняются универсальные количественные закономерности старения, а именно: экспоненциальный рост смертности с возрастом («закон Гомперца») и корреляция максимальной видовой продолжительности жизни с видоспецифическими особенностями окислительного метаболизма («закон Рубнера»). Первостепенное значение имеют случайные сбои в работе митохондриальных электрон-транспортных нанореакторов, при которых возникает побочный продукт окислительного фосфорилирования - анион-радикал кислорода («супероксидный радикал»). Этот радикал, будучи химически активным восстановителем, изменяет соотношение $\text{NAD(P)H}/\text{NAD(P)}^+$, тем самым воздействуя на эпигенетические сиртуиновые регуляторы репарационных и восстановительных процессов в клетках и тканях. Как следствие, накапливаются продукты реакций окислительного стресса и другие метаболические шлаки, что ведет к аутофагии, апоптотической гибели клеток и, как следствие, к возрастным клиническим расстройствам. Согласно оценкам, сделанным на основе теоретико-надежностной модели старения и экспериментальных литературных данных, если бы работа ферментов антиоксидантной защиты от свободных радикалов кислорода была бы совершенно надежной, то продолжительность жизни человека могла бы достичь 250-ти лет. Таким образом, старение – это неизбежное следствие генетически заданного дефицита надежности биомолекулярных конструкций, в то время как свободно-радикальный редокс-таймер, расположенный, предположительно, в особых клетках гипоталамуса, служит эффективным стохастическим механизмом реализации генетической программы ограничения продолжительности жизни. Кроме того, теоретико-надежностный системный подход служит эвристической методологией для анти-возрастной фармакологии, в частности, при поиске реальных механизмов антиоксидантной терапии [9]. In vivo, так называемые антиоксиданты, как природные, так и синтетические, работают не столько как ингибиторы свободно-радикальных реакций, сколько профилактически, воздействуя на нейро-эндокринную систему и микробиоту организма и, таким образом, опосредованно снижают генерацию активных форм кислорода в клетках и тканях организма.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, тема АААА-А19-119071890015–6.

1. Гнеденко Б.В., Беляев Ю.К., Соловьев А.Д. Математические методы в теории надежности. Наука, Москва, 1965.

2. Гродзинский Д.М., Войтенко В.П., Кутлахмедов Ю.А., Кольтовер В.К. Надежность и старение биологических систем. Наукова думка, Киев, 1987.

3. Koltover V.K. Mathematical theory of reliability and biological robustness: reliable systems from unreliable elements. In: Focus on Systems Theory Research (ed. M. Casanova, I. Opris). Nova Science Publ., New York, 2019, pp. 49-80.

4. Kitano H. Biological robustness. Nat Rev Genet., 2004, 5, 826-837.

5. Кольтовер В.К. Надежность ферментных систем и молекулярные механизмы старения. Биофизика, 1982, 27, 635-639.

6. Koltover V.K. Free radical theory of aging: view against the reliability theory. In: Free Radicals and Aging (ed. I. Emerit, B. Chance). Birkhauser, Basel, 1992, pp. 11-19.

7. Koltover V.K. Reliability concept as a trend in biophysics of aging. J. Theor. Biol., 1997, 184, 157-163.

8. Koltover V.K. Reliability and longevity of biological systems: the free-radical redox timer of aging. In: Redox Signaling and Biomarkers in Ageing. Healthy Ageing and Longevity (ed. U. Çakatay). Springer, London, 2022, v. 15, pp. 21-44.

9. Koltover V.K., Skipa T.A. Antioxidant pharmacology. In: Anti-Aging Pharmacology (ed. V.K. Koltover). Acad. Press/Elsevier, San Diego, 2023, pp. 341-366.

Математические подходы оценки длительности интервала QT электрокардиограммы

Искаков Н.Г.^{1*}, Чершинцева Н.Н.¹, Назаренко А.С.¹, Зверев А.А.¹

¹Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма;
Nikitaiskakov1992@mail.ru

В настоящее время, ЭКГ один из самых доступных и применяемых методов анализа работы сердца. Интерпретация каждой ЭКГ включает измерение и оценку интервала QT, изменение длительности которого может быть связано с риском желудочковых аритмий и внезапной сердечной смерти. Оценка ЭКГ требует точности разных амплитудно-временных характеристик зубцов. Амплитуда зубцов Q и T необходимо для определения времени их окончания для оценки интервала QT [3]. Интервал QT зависит от множества факторов, среди которых ЧСС играет наиболее важную роль [2,4]. Описано множество случаев удлинения интервала QT, как связанных с генетическими заболеваниями, так и ассоциированных с приемом лекарственных препаратов, электролитными нарушениями или сердечно-сосудистой патологией, получивших общее название «синдром удлиненного интервала QT». Синдром укороченного интервала QT был описан в 2000г. I. Gussac ассоциировал его с увеличенным риском внезапной смерти, вследствие развития фибрилляции желудочков. Для определения показателя электрической систолы желудочков сердца используют разные формулы ее расчета, и эти показатели должны отвечать требованиям физиологии сердечных сокращений, в условиях изменяющейся ЧСС [1]. В последние десятилетия используются несколько формул, для оценки временных характеристик отдельных зубцов. Одна из первых формул для коррекции интервала QT в зависимости от ЧСС была предложена Н.С. Bazett и до настоящего времени она остается основной формулой для определения скорректированного интервала QT, как в научных исследованиях, так и в клинической практике. Большинство электрокардиографов при автоматизированном анализе используют формулу Bazett в которой используется экспоненциальный метод определения QT, где $QT_c = QT/RR^{1/2}$. Однако, формула Bazett не вполне корректна. Отмечена тенденция к излишней корректровке при тахикардии, и недостаточная корректровка при брадикардии. Fridericia предложил рассчитывать скорректированный интервал как отношение продолжительности интервала QT к кубическому корню из предшествующего интервала RR, обозначается $QT_c = QT/(RR)^{1/3}$. Эта формула дает более достоверные результаты при высокой или низкой частоте сердечного ритма. Формулы, использующие линейный метод коррекции, позволяют уменьшить ошибки экспоненциального метода. Наиболее известной из них является формула Framingham $QT_c(S) = QT + 0,154 \times (1000 - RR)$ [3]. Данная формула может использоваться при фибрилляции предсердий. Формула Hodges $QT_c = QT + 1,75(ЧСС - 60)$ является линейной поправкой. Формула Matsunaga $QT_c = \log 600 \times QT / \log RR$ и VandeWater et al $QT_c = QT - 0,087 \times [RR - 1000]$, отличается в расчете единицы интервала RR [4]. Целью данного исследования являлось проведение сравнительного анализа использования различных формул вычисления скорректированного интервала QT при разных положениях тела.

Материалы и методы. Регистрацию ЭКГ проводили в Центре бадминтона Поволжского ПГУФКСиТ на установке PowerLab (ADInstruments) (n=15, 8-10 лет). Испытуемые выполняли стабиллографическую пробу Ромберга (тест с открытыми и закрытыми глазами) с параллельной регистрацией ЭКГ. Электроды накладывались на грудную клетку по типу Holter. Обработку производили с помощью встроенного модуля анализа ЭКГ в программном обеспечении LabChartPro. Оценивали длительность QT-интервал скорректированный по формулам Bazett, Fridericia, Framingham, Hodges, Matsunaga, Mitchell et al, VandeWater et al. За контрольные значения брали формулу Bazett. Статистическую значимость эффекта выявляли с помощью парного критерия Стьюдента и ANOVA (p<0,05).

Результаты и обсуждение. Несмотря на актуальность измерения интервала QT, при вычислении его продолжительности на одной и той же ЭКГ разные специалисты нередко приходят к разным результатам. Проблема заключается в том, что нет четко установленного стандарта, где именно определять начало и конец интервала QT. В наших экспериментах испытуемые находились в горизонтальном и вертикальном положениях, а при вертикальное положение регистрация проводилась с открытыми и закрытыми глазами. Анализ показателей ЭКГ (в положении лежа) показал максимальный разброс только временных значений ЭКГ. Наименьшим значением QT интервал в горизонтальном положении было при расчете формулы Mitchell, что составило 70%, относительно формулы Bazett. При смене положения наблюдается тенденция к увеличению значений интервала QT как при открытых, так и закрытых глазах. При расчетах в горизонтальном положении формула Bazett всегда показывала самый продолжительный QTc интервал. При изменении положения наблюдалась противоположная

реакция со стороны сердца, что может быть связано с дополнительной нагрузкой на сердце. Длительность интервала QT больше при закрытых глазах, что может указывать на взаимосвязь зрительного анализатора на временные характеристики ЭКГ. При анализе амплитудных характеристик интервала QT различными формулами и при различных положениях испытуемых амплитуда всех основных зубцов не изменяется. Таким образом, при анализе временных характеристик ЭКГ необходимо использовать различные формулы учитывающие, прежде всего исходную ЧСС положение тела и наличие разных видов аритмий.

Список литературы:

1. Воробьев Л.В. ЭКГ анализ интервала QTc с позиций физиологичности сердечных сокращений / Л.В. Воробьев // Научное обозрение. Медицинские науки–2019.–№ 1.–С.10-15.
2. Зверев А.А. Корригированный подход к оценке интервала QT / А.А. Зверев, А.С. Назаренко, М.И. Баталова, А.С. Шалавина, Ю.Ф. Кузнецова, Е.Е. Платошкина // Российский кардиологический журнал–2022–Т.27–№S5–С.42-43.
3. Magnano M., Gallo C., Bocchino P.P., Briguglio M., Rivetti A., Gaita F., Anselmino M. QT prolongation and variability: new ECG signs of atrial potentials dispersion before atrial fibrillation onset. J. of Cardiovascular Medicine, 2019, V. 20, pp.180-185.
4. Shinichi N., Kiyohiko H., Chisato S., Munehiro M., Sachiyo S., Sakahiro I., Koh S., Sevoflurane causes greater QTc interval prolongation in elderly patients than in younger patients. Tony Author Information Anesthesia & Analgesia, 2010, V. 110, pp. 775-779.

Математическое моделирование в задачах персонализированной оптимизации установки сосудистых шунтов

Куянова Ю.О.¹, Дубовой А.В.^{1,2}, Бервицкий А.В.^{1,2}, Шутов А.В.¹, Тагильцев И.И.¹, Чупахин А.П.¹,
Паршин Д.В.^{1*}

¹Институт гидродинамики им. М.А. Лаврентьева СО РАН;

²Федеральный нейрохирургический центр МинЗдрава РФ (Новосибирск);
danilo.skiman@gmail.com

Шунтирование широко используется при лечении сердечно-сосудистых патологий. Перед хирургом стоит ряд нетривиальных задач: необходимость байпасса как такового, оптимальный угол его установки, оптимальная форма стыковочного окна и другие. С точки зрения гидродинамики и механики это соответствует ряду конкретных задач, решение которых предлагалось в цикле работа [1,2,3]. В рамках задачи по определению оптимального угла установки сосудистого анастомоза в ходе нейрохирургической операции исследовалась гидродинамика тройника. Рассматривались четыре возможных угла установки: $\pi/6$, $\pi/4$, $\pi/3$ и $\pi/2$, отвечающих наиболее часто используемым реальным конфигурациям. Задача решалась численно в программе ANSYS CFX. В качестве критерия оптимальности используется условие минимальности величины диссипации кинетической энергии. Показано, что угол установки анастомоза $\pi/3$ является оптимальным, угол $\pi/4$ - наименее выгодным. Также построена электрическая схема рециркуляции крупных сосудов головного мозга на основе конфигураций виллизиева круга реальных пациентов, оптимальные параметры которой определялись численно с помощью методов роевого интеллекта. В качестве целевой функции оптимизации выбрана величина давления после шунтирования по сравнению с давлением до операции. Данный метод впервые использовался при решении проблемы формирования церебральных сосудистых анастомозов. Показано, что полученные результаты хорошо согласуются с данными реальных операций. Кроме того рассматривались различные варианты стыковки сосуда-реципиента с точки зрения оптимальности возникающих при сочленении с сосудом-донором зон концентраторов напряжений.

По результатам выполнения исследования была разработана и зарегистрирована программа для ЭВМ, позволяющая по данным реального пациента с использованием электрической аналогии системы кровообращения предложить оптимальное место установки сосудистого шунта. Полученные в ходе выполнения цикла работ результаты существенно расширяют фундаментальные знания о сосудистых бифуркациях, а также дают ответы на практические вопросы клинических специалистов-хирургов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 20-71-10034).

Публикации

[1] O. Kuyanov, S.S. Presnyakov, A.V. Dubovoi, A.P. Chupakhin, D.V. Parshin. Journal of Applied Mechanics and Technical Physics, 2019, Vol. 60, No. 6, pp. 1038–1045

[2] Yu.O. Kuyanov, A.V. Dubovoi, A.V. Bervitskii, D.V. Parshin. NUMERICAL OPTIMIZATION OF GEOMETRIC CHARACTERISTICS OF VASCULAR BYPASS USING SWARM INTELLIGENCE METHODS IN NEUROSURGERY Journal of Applied Mechanics and Technical Physics, 2022, Vol. 63, No. 4, pp. 606–613

[3] Igor I. Tagiltsev, Daniil V. Parshin and Alexey V. Shutov RATIONAL CHOICE OF MODELLING ASSUMPTIONS FOR SIMULATION OF BLOOD VESSEL END-TO-SIDE ANASTOMOSIS Math. Model. Nat. Phenom. 17 (2022) 20

Математическое моделирование квантовых выходов активированной кумаринами с–314, с-334 и с–525 хемилюминесценции под действием комплекса цитохрома С с кардиолипином

Левченко И.Н.^{1*}, Владимиров Г.К.², Володяев И.В.³

¹Московский Государственный Университет, Физический факультет, г. Москва, Россия, 119234, ул. Колмогорова, 1, стр. 2;;

²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Институт регенеративной медицины, г. Москва, Россия, 119048, ул. Трубецкая, д. 8;;

³Московский Государственный Университет, Биологический факультет, г. Москва, Россия, 119991 Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр.12;;
irnlevchenko@yandex.ru

Сравнивая математическое моделирование квантовых выходов физических активаторов С–314, С-334 и С–525, которые перехватывают возбуждение у триплетно-возбужденных кетонов и имеют значения квантовых выходов ХЛ на 3–4 порядка выше, чем сами возбужденные кетоны, получаем ХЛ, активированную кумаринами С–314, С-334 и С–525, которая показывает значение интенсивностей в ~1500 раз, в ~1600 раз и ~2000 раз выше, чем спонтанная ХЛ липидов, при этом не отличается от нее по параметрам кинетических кривых и имеет константы скорости одного порядка. Точность сравнения математического моделирования квантовых выходов определяется присутствием кардиолипина для стабилизации рН, гашением Fe²⁺ и наличием физическими активаторами С–314, С-334 и С–525. Среди факторов, которые искажают значение математического моделирования квантовых выходов, выделяется недостаточное добавление пероксида водорода, избыточное количество азота (II), метанола, денатурация белка, а также изменение конформации ЦитС в комплексе ЦитС–КЛ.

В поисках оптимальных условий возбуждения были проанализированы системы липопероксидазной и квази-липоксигеназной реакций, активированные физическими активаторами - кумаринами С–314, С-334 и С–525.

В нашей работе на основании анализа параметров цитохрома С с кардиолипином, физических активаторов С–314, С-334 и С–525, а также пероксидазы хрена и люминола, проведены сравнения исследований сенсibiliзирующей способности кумаринов С–314, С-334 и С–525, как физических активаторов с целью сравнения величины квантовых выходов С–314*, С-334* и С–525*.

Комплекс цитохрома С с кардиолипином отличается от нативного цитохрома С по следующим свойствам: (1) обладает флуоресценцией тирозиновых и триптофановых остатков; (2) теряет поглощение в полосе Core(405-410 нм), отражающей существование связи Fe(heme)···S(Met80); (3) обладает пероксидазной активностью и, катализирует образование липидных радикалов в мембране; (4) С–525 «классический» физический активатор ХЛ, так же как С–314 и С-334, активно окисляется комплексом ЦитС–КЛ, при этом скорость этого окисления ограничивается лишь концентрацией самого цитохрома С, который тоже разрушается в составе комплекса ЦитС–КЛ под действием пероксида водорода.

Математическое моделирование основного генератора ритма лимбических приступов в гиппокампе

Корнилов М.В.^{1,2*}, Сысоев И.В.^{1,2}

¹Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН;

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского;
kornilovmv@gmail.com

Вопрос возникновения и эволюции основной частоты колебаний нейронов головного мозга при различных нормальных и патологических состояниях является актуальной задачей современной науки. Для

изучения и моделирования эпилепсии очень важно математическое описание синхронизации [1], поскольку для эпилепсии характерны высокосинхронные паттерны активности [2]. В данной работе предлагается концепция, которая состоит в том, что основная частота не является результатом активности отдельной клетки, а формируется за счет коллективной динамики в кольце модельных нейронов, связанных с запаздыванием.

Для подтверждения данной гипотезы использовалась тестовая система, состоящая из кольца нейронов Ходжкина-Хаксли [3] (данная модель, описывающая распространение потенциалов действия в нейронах считается одной из эталонных), связанных однонаправленной связью с запаздыванием. При этом параметры нейронов считались одинаковыми и выбирались в соответствии с [4] так, чтобы они демонстрировали динамику кортикальных-пирамидальных нейронов. Параметры нейронов изменились таким образом, чтобы в режиме покоя колебаний не возникало. Динамический же режим достигался при помощи стартующего нейрона, который на протяжении 30 мс воздействовал на один из нейронов кольца. После чего в системе возбуждался колебательный процесс, основная частота которого оценивалась. Количество нейронов в кольце варьировалось от 10 до 100, время задержки в запаздывающей связи от 0.2 мс до 1 мс. Коэффициенты связи между нейронами считались одинаковыми и рассматривалось 4 значения (30, 40, 50, 60).

В результате численного эксперимента было показано, что предложенная схема может генерировать колебательную активность с частотами, близкими к экспериментально наблюдаемым. Изменяя количество нейронов в кольце, время запаздывания в связи, а также коэффициент связи можно управлять основной частотой сигнала в нейронах. При этом эффект от увеличения числа нейронов в кольце оказывает большее влияние на частоту сигнала. А увеличение значения коэффициента связи позволяет получить более высокие частоты. Дополнительно была предложена эмпирическая формула для оценки периода колебаний в зависимости от количества нейронов и времени задержки в связи. На её основе была проведена реконструкция зависимости, которая показала достаточную точность в сравнении с данными численного эксперимента.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект №19-72-10030-П, <https://rscf.ru/project/19-72-10030/>

Список литературы.

1. Jefferys, J.G.; Jiruska, P.; de Curtis, M.; Avoli, M. Limbic network synchronization and temporal lobe epilepsy. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition 2012.
2. Avoli, M.; D'Antuono, M.; Louvel, J.; Köhling, R.; Biagini, G.; Pumain, R.; D'Arcangelo, G.; Tancredi, V. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. Progress in Neurobiology 2002, 68, 167 – 207. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00077-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00077-1).
3. Hodgkin, A.; Huxley, A. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol. 1952, 117, 500–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
4. Talukdar, S.; Shrivastava, R.; Ghosh, S. Modeling activity-dependent reduction in after hyper-polarization with Hodgkin-Huxley equation of action potential. Biomedical Physics & Engineering Express 2019, 5, 047001. <https://doi.org/10.1088/2057-1976/ab1a1d>

Математическое моделирование роста эпителиальной ткани в порах твёрдого скаффолда

Красняков И.В.^{1*}, Браун Д.А.¹

¹*Пермский национальный исследовательский политехнический университет;*
krasnyakov_ivan@mail.ru

Основная проблема тканевой инженерии заключается в том, что любая ткань является многоклеточным образованием. Таким образом, исследователь, который ставит перед собой задачу вырастить искусственную ткань из одной клетки, стоит перед серьезным вызовом: каким образом организовать кооперацию между тысячами новых клеток таким образом, чтобы они образовывали бы правильно структурированные клеточные ансамбли, которые могли бы быть затем включены в уже работающий организм без неприятных последствий.

Основной инструмент, с помощью которого тканевая инженерия пытается собирать пазлы из отдельных клеток, является скаффолд. Под ним понимается либо пористая, либо фиброзная матрица произвольной структуры, которая засеивается стволовыми клетками будущей ткани. Важно отметить, что твёрдое тело, с которым входит в контакт клетка, не является естественной средой обитания клеток. Клетки эволюционировали либо в жидком многокомпонентном растворе, либо в составе многоклеточного организма. Таким образом, процессы вблизи поверхности ткань-твёрдое тело требуют отдельного исследования. Все детали взаимодействия клеток и твёрдой поверхности до сих пор неизвестны. В случае пористого скаффолда экспериментальные наблюдения показывают, что клетки предпочитают ложиться на стенки микроканалов плоским образом. Возможно, они воспринимают стенки пор как базальную мембрану, которая играет важную роль в структурировании эпителиальных тканей в организме. Деление клеток приводит к заполнению пор, при этом

клетки растут как вдоль канала, так и к его центру создавая многослойную структуру. В случае фиброзного скаффолда, клетки прикрепляются к фибрам матрицы и рост ткани происходит менее упорядоченно, так как непосредственный контакт между клетками ослабевает. Тем не менее, эксперименты показывают, что клетки могут изменить стратегию и прикрепляться поперек канала в пористом скаффолде, и наоборот, покрывать поверхность струн в фиброзном скаффолде.

Важно отметить, что скаффолд позволяет контролировать рост ткани таким образом, чтобы клетки дифференцировались в соответствии с требованиями того органа, для которого выращивается ткань. Матрица выполнена из материала, который со временем разлагается, оставляя после себя ткань из структурированных клеток. Важную роль в процессе засеивания и выращивания клеток играют гидродинамические явления. Клеточную культуру называют статической или динамической в зависимости от того покоиться или движется питательный раствор, насыщающий скаффолд. Утверждается, что фильтрация жидкости через поры скаффолда оказывает механическое воздействие на верхний слой клеток, которое стимулирует их к ускоренному делению. Таким образом принципиальную роль в росте клеток играет межфазная поверхность ткань–жидкость. Замечено, что ткань преимущественно растёт трансверсально потоку питательного раствора, который оказывает механический стресс на поверхностные клетки. В случае пористого скаффолда важную роль играет ширина пор, форма каналов, общая пористость материала.

В работе мы представляем математическую модель роста эпителиальной ткани в порах твёрдого скаффолда. Т.к. эпителиальные ткани выстилают поверхности органов, слизистые оболочки, а её клетки прикрепляются к базальной мембране, то задачу можно свести к двумерной постановке. Элементарная единица живой матери – клетка, представлена в модели в виде многоугольника, с динамически меняющимся числом вершин. Вся система откалибрована так, что наиболее вероятной формой клетки является шестиугольник, но появление клеток с другим числом вершин не исключено. Шестиугольная клетка наиболее выгодна энергетически в системе и по форме достаточно близка к окружности.

Для расчёта динамики системы мы задаём уравнение потенциальной энергии, в котором основными управляющими параметрами являются коэффициенты эластичности, которые определяют свойства деформации среды. Первое слагаемое в уравнении описывает сократимость периметра клеток, которое можно интерпретировать как сопротивление их чрезмерному растяжению, а второе характеризует стремление клеток сохранять свою среднюю площадь и сопротивляться действию сил растяжения и сжатия со стороны среды. Каждая клетка–многоугольник меняет своё положение в пространстве посредством перемещения её узлов (вершин). Равнодействующая механических сил, приложенных к узлу, является градиентом потенциальной энергии по радиус-вектору узла. Смещение узлов приводит к деформации клетки. Для описания уравнения скорости перемещения клеток мы используем механику Аристотеля. Во-первых, клеточная ткань является сильно диссипативной средой, где движение происходит без эффекта инерции, а во-вторых, такой подход позволяет существенно сократить объём вычислений. Так в уравнении движения силы напрямую определяют скорость движения объекта. Для клеток эпителия в модели предполагается, что вероятность деления клетки зависит от количества её узлов. Важное свойство эпителия – интеркаляция клеток. Она необходима для ослабления давления, оказываемого на клетку в ткани, для снятия локальных напряжений, а также для уменьшения потенциальной энергии всей ткани в случае её структурной перестройки. Этот механизм срабатывает, всякий раз, когда перемишка между соседними клетками становится меньше критического значения. Также в системе задано уравнение реакции-диффузии, описывающее обмен химическими сигналами между клетками через их общую границу. С помощью введения в модель такого уравнения мы можем задавать хемомеханическое взаимодействие элементов всей системы.

Разрабатываемая математическая модель способствует развитию методов математического моделирования в статических и динамических культурах клеточной ткани, растущих в скаффолдах.

Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку в рамках программы Мегагрантов, договор № 075-15-2021-578 от 31 мая 2021 г., размещён на базе Пермского национального исследовательского политехнического университета.

Механизмы регуляции размеров агрегатов в дискретной модели агрегации *Dyctiostelium discoideum*

Кручинин И.В.^{1*}, Яковенко Л.В.¹

¹МГУ, физический факультет;
iv.kruchinin@physics.msu.ru

Dyctiostelium discoideum (DD) — вид почвенных амёб (миксамёб), относящийся к подтипу *Mycetozoa* типа *Amoebozoa*. Жизненный цикл этого организма, обычно называемого слизевиком, состоит из одноклеточной и многоклеточной стадий: при недостатке пищи миксамёбы прекращают питаться, сползаются друг к другу,

сталкиваются и слипаются образуя промежуточные кластеры, которые затем агрегируют с образованием так называемого слизня, включающего в себя до 10^5 клеток. Этот процесс контролируется взаимодействующими друг с другом внутри- и внеклеточными системами сигнализации.

В настоящей работе предложена модель начальных стадий агрегации миксамеб, основанная на идеях и подходах, развитых в теориях конечных и клеточных автоматов. Модель включает в себя четыре виртуально связанные одинаковые двумерные решетки, заполнение ячеек которых описывает поведение популяции миксамеб. Одна из них, описывающая движение миксамеб, состоит из четырех параллельных слоев, то есть она фактически трехмерна. На нижнем слое исходно находятся подвижные конечные автоматы. Заполнение ячеек этой решетки происходит по определенным правилам и соответствует начальным стадиям агрегации вплоть до образования трехмерной четырехслойной холмоподобной структуры. Остальные три решетки моделируют выделение и диффузию трех основных сигнальных компонентов, образующих хемотаксическое поле, которое определяет поведение миксамеб [1].

Эта модель была модифицирована посредством учета зависимости движения миксамеб от внутриклеточной концентрации $[Ca]^{(2+)}$. Движение амёб может быть либо направленным по градиенту концентрации циклического аденозинмонофосфата, либо случайным блужданием. Также на направление движения амёб влияет концентрация $[Ca]^{(2+)}$ в ближайшем окружении.

Результаты расчетов показывают, что при достижении агрегатом некоторого размера его рост прекращается, и число клеток в нем колеблется вокруг среднего значения. Такое поведение указывает на то, что агрегация определяется двумя конкурирующими механизмами: один способствует росту агрегата, другой – отсоединению от него клеток или мелких кластеров [2].

Список литературы:

- [1] Кручинин И.В., Яковенко Л.В., Компьютерная модель начальных стадий агрегации миксамеб *Dictyostellium discoideum*. – Ученые записки физического факультета московского университета, 2021, №6, с. 1-9;
[2] Кручинин И.В., Яковенко Л.В., Два конкурирующих механизма при агрегации *Dictyostellium discoideum*. – Актуальные вопросы биологической физики и химии, изд-во СевГУ, 2022, том 7, №3 с. 393-398.

Механические модели ДНК

Беженар М.В.^{1*}

¹ *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный университет»;*
mia1610@yandex.ru

Экспериментальное исследование динамики ДНК и возникновения открытых состояний ограничено пространственным разрешением доступных биофизических инструментов [1]. По этой причине, основным методом исследования открытых состояний ДНК является математическое моделирование [2].

Л.В. Якушевич была предложена теоретическая модель ДНК, которая рассматривает открытое состояние как результат вращения пар оснований [3]. Эта модель учитывает водородные связи между парами оснований, а также стэкинг между соседними парами оснований, недостаток данной модели состоит в том, что не учитываются колебания оснований в крайних парах.

Л.В. Якушевич получила аналитическое решение данной модели в виде кинка при усреднении коэффициентов уравнений, данное решение не учитывает спиральный характер структуры ДНК и взаимодействие угловых смещений азотистых оснований. Кроме того, решение типа кинк может быть получено только в случае однородной синтетической ДНК. В работе [4] было показано, что ряд упрощений (усреднение характеристик цепочки ДНК) приводит к снижению достоверности решения.

Модель, представленная выше, является угловой, такие модели предсказывают движение солитонов по цепочке дезоксирибонуклеиновой кислоты. Хорошо известным примером трансляционных моделей является модель Пейярда – Бишоп (PB) [5, 6], а также две ее расширенные версии. Они представляют собой геликоидальные модели PB (HPB) и модель Пейярда – Бишоп – Доксуа (PBD). Основным требованием к трансляционному подходу является описание комплементарных Н-связей с помощью нелинейного потенциала. Модель Пейярда – Бишоп предполагает, что молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты состоит из двух цепочек полинуклеотидов и представляет собой две цепочки дисков, которые связаны между собой продольными и поперечными пружинами. Продольные взаимодействия представляют собой сильные ковалентные связи, моделируемые гармоническими потенциалами. Поперечные взаимодействия между нуклеотидами, принадлежащими к разным цепям, являются слабыми водородными взаимодействиями, требующими ангармонического потенциала.

Другим, не менее интересным механическим методом, является концепция самонапряженных конструкций или тенсегрити, его суть заключается в описании поведения биоконструктивных систем. Данная модель клетки объясняет, как ее механическое поведение возникает в результате физических взаимодействий между различными системами молекулярных нитей, которые формируют цитоскелет [7, 8].

Каждая модель имеет свои преимущества и недостатки. Так, угловая модель Якушевич позволяет моделировать водородные связи между основаниями. На основе расчетов, проведенных с помощью угловой модели, нами было установлено, что изотопный $^2\text{H}/^1\text{H}$ состав среды оказывает значительное влияние на вероятность возникновения открытых состояний [9, 10]. Представленное в работе [11] исследование показало, что наличие дейтерия в цепочке нуклеотидов может вызывать в зависимости от величины энергии разрыва водородной связи как увеличение, так и уменьшение вероятности возникновения открытых состояний. Также было показано влияние частот в диапазоне от $10^{(-11)} \text{ с}^{(-1)}$ до $10^{(-8)} \text{ с}^{(-1)}$ внешнего периодического воздействия на динамику молекулы ДНК. Под воздействием внешней периодической силы молекула ДНК может совершать колебательные движения с частотой отличной от частоты внешнего воздействия.

Численное решение механической математической модели молекулы ДНК для гена интерферона альфа 17 и фрагмента гена дрозофилы показало, что при увеличении вязкости среды скорость изменения угловых колебаний азотистых оснований уменьшается, что приводит к их стабилизации, в свою очередь, уменьшение вязкости среды приводит к обратному эффекту: увеличению скорости угловых отклонений азотистых оснований и увеличению угловых деформаций нитей ДНК. Таким образом, уменьшение вязкости среды вызывает нестабильность молекулы ДНК, которая со временем только увеличится [12].

При воздействии торсионного момента на молекулу ДНК возникают вращательные движения азотистых оснований, что приводит к возникновению открытых состояний, которые чаще всего образуются на краях молекулы ДНК и в областях с преобладанием А–Т азотистых пар оснований [13]. Вероятность появления открытых состояний при ситуации, когда торсионный момент прикладывается к определенной части гена, зависит от содержания в этой области А–Т пар, от размера этой области и времени воздействия торсионного момента на этот участок гена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A.L.B. Pyne, A. Noy, K.H.S. Main, et al., Nature Communications 12, 1053 (2021).
2. M. Manghi, N. Destainville, Physics Reports, 631 (2015).
3. L.V. Yakushevich, Physics Letters A. 136, 413 (1989).
4. М.И. Дроботенко, С.С. Джимаков, А.А. Свидлов и др., Биофизика 63 (2), 258 (2018).
5. M. Peyrard, A.R. Bishop, Physical Review Letters 62, 2755 (1989).
6. T. Dauxois, M. Peyrard, A.R. Bishop, Physical Review E. 47, 684 (1993).
7. D. E. Ingber, Journal of Cell Science, 116, 1397 (2003).
8. Ю.Д. Нечипуренко, Р.В. Полозов и Д.Ю. Нечипуренко в Математика. Компьютер. Образование., под ред. Г.Ю.Ризниченко (М.-Ижевск: НИЦ "Регулярная и хаотическая динамика", 2006), с. 392-402.
9. A. A. Basov, M.I. Drobotenko, A. A. Svidlov et al., Molecules 25 (16), 3753 (2020).
10. A.A. Svidlov, M.I. Drobotenko, A. A. Basov et al., Physics of Wave Phenomena 29 (2), 180 (2021).
11. A.A. Svidlov, M.I. Drobotenko, A.A. Basov et al., International Journal of Molecular Sciences 22 (15), 7873 (2021).
12. A.A. Svidlov, M.I. Drobotenko, A.A. Basov et al., Entropy 23 (11), 1446 (2021).
13. S. Dzhimak, A. Svidlov, A. Elkina et al., International Journal of Molecular Sciences 23 (8), 4428 (2022).

Моделирование аккумуляции заряженных фотосенсибилизаторов в клетках опухоли с переменными градиентами электрических полей на внутренних мембранах

Аскарова К.А.¹, Морозова Г.М.^{1*}

¹РУДН;

gimorozova@mail.ru

Эффективность фотодинамической терапии (ФДТ) онкобольных в значительной степени определяется аккумуляцией фотосенсибилизатора (ФС) в опухолевых клетках (ОК). Последнее зависит как от физико-химических свойств молекул ФС (заряда, гидрофобности), так и от метаболического состояния клеток в опухоли, сопряженного с их митотическим циклом и уровнем оксигенации [1-3]. Исходя из биофизического подхода, гетерогенность ОК в разных слоях опухоли может быть охарактеризована суммой трёх электрических трансмембранных потенциалов (ТМП) в клетках. Эта сумма включает отрицательные плазматический и митохондриальный ТМП-ы, а также энергозависимый положительный ядерный ТМП [3-6]. В соответствии с теорией Нернста кинетика проникновения амфифильных заряженных молекул в клетку и их аккумуляция в её

мембранных отсеках зависит от величины суммарного ТМП, который может различаться в клетках опухоли [3, 5]. В частности, это важно учитывать при использовании некоторых хлориновых ФС [1]. Ранее нами получены стационарные решения для распределения анионных ФС в клеточных отсеках при различных энергетических состояниях клеток в рамках кинетической модели с постоянными ТМП [5]. Целью данной работы является моделирование кинетики накопления заряженных ФС в клетках опухоли с переменными ТМП.

Предложена кинетическая модель, включающая систему нелинейных дифференциальных уравнений, описывающих накопление амфифильных заряженных молекул ФС в мембранной системе клетки. Система (внешняя среда-клетка) состоит из четырех параллельно-последовательных отсеков, разделенных проницаемыми мембранами с исходно различными ТМП-ми на плазматической и внутренних митохондриальной и ядерной мембранах. Для моделирования были использованы экспериментальные кинетические кривые роста интенсивности флуоресценции опухолевых клеток в культуре HT29, инкубированных с хлорином Е6 или с его производным – диметилловым эфиром Е6 (ДМЭ) согласно [1]. Исходные константы скоростей переноса (КС) ДМЭ и Е6 в ОК определяли по наклонам линейной части этих кривых. В нашей модели эти константы зависят от ТМП-ов в митохондриях и ядрах, которые изменяются со временем экспоненциально с заданными модулирующими параметрами α и β соответственно. При этом ТМП на плазматической мембране считаем постоянным в пределах времени эксперимента. На основе этой модели проведен вычислительный эксперимент с помощью специальной компьютерной программы. Получены теоретические кривые изменения концентрации хлориновых ФС в цитоплазме, митохондриях и ядрах ОК, которые оказались корректными в первые 10 минут от начала вычислительного эксперимента при выбранных параметрах модуляции. Из анализа результатов следует, что катионный ДМЭ может более эффективно аккумулироваться в зоне опухоли с активными митохондриями, напротив, скорость накопления анионного Е6 в ОК будет выше в условиях гипоксии.

Можно заключить, что кинетика накопления заряженных ФС в опухолевых клетках (как и некоторых цитостатиков) существенно зависит от соотношения КС через внутренние мембраны клетки, причем, эти константы являются функциями ТМП-ов. Изменение динамического взаимоотношения между ТМП-ми в митохондриях и ядре могут влиять на колебания ионного гомеостаза в ядрах и, следовательно, на митотическую активность клеток в различных опухолевых зонах. Сравнительные исследования и анализ данных позволяют выдвинуть гипотезу о существовании инварианта суммы трёх ТМП-ов для нормальных клеток разных гистологических типов. Изменение этого инварианта может быть фундаментальным критерием перехода клеток от нормы к определённым патологическим фазам.

1. Зорина Т.Е., Янковский И.В., Зорин В.П. Внутриклеточная локализация и накопление этерифицированных производных Е6. // Медико-биологические основы жизнедеятельности. Минск: 2012. С.153-155.

2. Колобов А.В., Анашкина А.А., Губернов В.В., Полежаев А.А. Математическая модель роста опухоли с учётом дихотомии миграции и пролиферации. //Компьютерные исследования и моделирование. 2009. Т.1, № 4. С. 415-422.

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

4. Морозова Г.И., Полетаев А.И., Борщевская Т.А. Инвертированный электрохимический потенциал на ядерной мембране клеток и его связь с клеточной энергетикой. // Труды 2-го съезда биофизиков России. 1999. С. 256-257.

5. Askarova K.Z., Morozova G.I., Anoshin A.A. Modeling the Accumulation Kinetics of Anionic Photosensitizers in Tumor Cells with Different Trans-membrane Potentials. //J. Mech.Cont.& Math. Sci., Special Issue-1, March. 2019. P. 483-490.

6. Морозова Г.И., Корнилаева Г.В., Подчерняева Р.Я., Куленич Т.М., Боженко В.К. Исследование влияния КВЧ-излучения миллиметрового диапазона на мембранные структуры в культуре Т-лимфобластоидных клеток с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ.//Биомедицинская радиоэлектроника. 2014. № 11. С. 31-38.

Моделирование воздействия аналога аутоиндуктора анабиоза бактерий 4-гексилрезорцина на биополимеры клетки *Escherichia coli*

Терешкин Э.В.^{1*}, Терешкина К.Б.¹, Крупянский Ю.Ф.¹

¹ФИЦ ХФ РАН;
ramm@mail.ru

Бактерии для повышения выживаемости используют малые молекулы, позволяющие изменять стратегию развития: образовывать биоплёнки, переходить в покоящееся состояние при воздействии стрессовых факторов и

др. Переход бактерий в подобные состояния сопровождается приобретением устойчивости к внешним воздействиям, что представляет собой серьёзную проблему в различных областях народного хозяйства и медицине. Одни из важных метаболитов бактерий, которые вырабатываются в цитоплазме к стационарной фазе роста бактериальной колонии – аутоиндукторы анабиоза, производные алкилрезорцинов. От их воздействия зависит регуляция перехода бактерий в покоящееся состояние [1]. Наиболее широко применяемым является химический аналог индукторов анабиоза – 4-гексилрезорцин (4ГР, 1,3-диокси-4-н-гексилбензол). Показано, что при внесении в питательную среду эффект зависит от дозы и стадии развития бактериальной колонии. Повышается стрессоустойчивость клеток, наблюдается переход в покоящееся либо мумифицированное состояние [2-3]. Дозозависимые эффекты обнаруживаются и при воздействии на белки [4] и ДНК [5-6] *in vitro*.

В настоящей работе методами молекулярной динамики исследована концентрационная зависимость и молекулярные механизмы взаимодействия 4ГР с биополимерами клетки *Escherichia coli*. Изучено воздействие 4ГР на внешнюю и внутреннюю мембраны, пептидогликан, мембранный белок порин, цитоплазматический ДНК-стабилизирующий белок Dps и ДНК. Расчёты в комплексе Gromacs с полноатомным силовым полем AMBER99-PARMBSC1. Постоянная температура (300 – 313 К) поддерживалась термостатом Ланжевена с постоянной трения 0.5 ps^{-1} . Постоянное давление – баростатом Парринелло-Рамана с постоянной времени 2 пс. Для систем ДНК, Dps и пептидогликана давление 1 атм. поддерживалось изотропным способом. При расчётах модельных мембран давление поддерживалось полуизотропным способом. Параметры взаимодействия связанных атомов и ближних взаимодействий рассчитывались для каждого временного шага. Электростатические взаимодействия на больших расстояниях рассчитывались методом суммирования по Эвальду (PME). Радиусы обрезания для всех типов взаимодействия брались равными 1.5 нм. Список соседей поддерживался с помощью схемы отсечки Верле и обновлялся каждые 10 фс. Быстрые степени свободы ограничивались с помощью алгоритма LINCS. Шаг интегрирования составлял 2 фс (для пептидогликана – 1 фс), длина траекторий – 0.1 мкс. Перед нахождением динамических характеристик ДНК и белков проводился анализ главных компонент. Для получения данных о свободной энергии миграции 4ГР через бислой использовались подходы управляемой молекулярной динамики и зонтичной выборки [2]. Для определения термодинамических характеристик связывания ДНК с Dps использовался метод поиска линейной энергии взаимодействия (LIE) с ранее подобранными параметрами [3].

Расчёты показали, что воздействие 4ГР не ограничивается каким-то определённым компартментом клетки, а характеризуется как комплексное влияние этого соединения на биополимеры оболочки бактериальной клетки и цитоплазмы. При миграции через мембраны 4ГР предпочтительно мигрирует через бислой, а не пориновые каналы. Он взаимодействует как с полисахаридными остатками внешней мембраны, так и с мембранными белками и липидами мембран. Толщина слоя 4ГР у наружной мембраны варьирует в зависимости от концентрации. Проникновение 4ГР в бислой, на границе порин–липиды, определяется его гидрофобным взаимодействием с трансмембранными участками белка порина. При прохождении наружной мембраны, 4ГР частично абсорбируется пептидогликаном, где остатки углеводов являются начальными связывающими сайтами. Во время роста такого комплекса, происходит изменение формы и размера пептидогликана за счёт того, что молекулы 4ГР переходят в область пептидов, порождая сжатие и растяжение. Молекулы 4ГР при взаимодействии с ДНК обладают способностью встраивать себя как в большую, так и малую бороздки с образованием связи O-H...O(-)-P (гидроксильной группой резорцина и фосфатной группой ДНК). Флуктуация атомов Dps значительно снижается присоединением ДНК. Способность адсорбции на поверхности Dps молекул 4ГР увеличивает или же понижает подвижность N-концов, при этом значительно возбуждаются колебания на внешней поверхности ДНК, что ярко заметно при средних концентрациях 4ГР. Данные колебания имеют способность ускорять связывание ДНК. Методом поиска линейной энергии взаимодействия была получена свободная энергия связывания ДНК с Dps, которая изменяется от -49 кДж/моль (при отсутствии 4ГР), несколько увеличиваясь при малых концентрациях, но оставаясь отрицательной. до -150 кДж/моль (при больших концентрациях). Таким образом, эффект динамического поведения рассмотренных компонентов бактериальной клетки, зависит от способности 4ГР его претворять, при этом прямо обусловлен его концентрацией и хорошо согласуется с экспериментальными данными, где при малых и средних концентрациях ауторегулятора увеличивается стрессоустойчивость бактерий, а при больших концентрациях 4ГР образуются устойчивые, но нежизнеспособные формы.

Расчеты проводились на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (МСЦ РАН). Работа выполнена в рамках Госзадания Минобрнауки России (FFZE-2022-0011, № 122040400089-6).

Литература:

1. Бухарин О. В., Гинцбург А. Л., Романова Ю. М., Эль-Регистан Г. И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005.
2. Терешкин Э. В., Лойко Н. Г., Терешкина К. Б., Крупянский Ю. Ф. // Химическая физика. 2021. Т. 40 (11). С. 48.
3. Tereshkin E.V., Loiko N.G., Tereshkina K.B., Kovalenko V.V., Krupyanskiy Y.F. // Russian Journal of Physical Chemistry B. 2022. V. 16. No. 4. P. 726. DOI: 10.1134/S1990793122040285

4. Крупянский Ю.Ф., Нокс П.П., Лойко Н.Г. и др. // Биофизика. 2011. Т. 56. № 1. С. 13.
5. Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Зеленихин П.В. и др. // Микробиология. 2002. Т. 71. № 2. С. 194
6. Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Эль-Регистан Г.И. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 5. С. 662

Моделирование работы глутамат-цистеин лигазы на основе стохастических методов

Бороновский С.Е.^{1*}, Копылова В.С.¹, Нарциссов Я.Р.^{1,2}

¹НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, Россия;

²Группа биомедицинских исследований, БиДиФарма ГмбХ, Зик, Германия;

scihazard@yandex.ru

Глутатион является одним из основных внутриклеточных антиоксидантов, выполняющих важную роль в функционировании клеток. В клетках млекопитающих он синтезируется в цитозоле посредством двух последовательных АТФ зависимых реакций, катализирующихся глутамат цистеин лигазой (GCL) и глутатион синтетазой (GS). Наибольший интерес представляет изучение GCL, так как активность данного фермента наряду с концентрацией цистеина являются лимитирующими факторами биосинтеза глутатиона. При повышении внутриклеточной концентрации глутатиона скорость его синтеза существенно снижается за счёт ингибирования GCL по отрицательной обратной связи. По результатам различных экспериментальных исследований кинетики глутамат-цистеин лигазы было высказано несколько предположений о порядке присоединения субстратов в ходе протекания реакции, предусматривающих как первичное связывание АТФ и случайное присоединение оставшихся субстратов, так и полностью случайное связывание субстратов, наряду с упорядоченным механизмом. Для разрешения неопределённости в выборе возможного механизма работы фермента в данной работе при моделировании активности глутамат цистеин лигазы применялся стохастический алгоритм на основе марковских цепей с непрерывным временем. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что только механизм, предусматривающий первичное связывание с АТФ, позволяет получить значение для скорости реакции, согласующееся с экспериментально измеренной при физиологических уровнях субстратов активностью глутамат-цистеин лигазы эритроцитов человека. Кроме того, моделирование биосинтеза глутатиона в предположении, что происходит насыщение по АТФ, не отвечает физиологическим условиям. При этом наибольшее влияние концентрация молекул АТФ на скорость работы глутамат-цистеин лигазы будет оказывать в условиях, приводящих к нарушению биохимических путей выработки АТФ.

Моделирование распространяющейся деполяризации коры мозга, вызываемой эпилептической аппликацией калия

Теренина М.С.^{1*}, Хазипов Р.Н.¹, Захаров А.В.^{1,2}

¹Kazan Federal University ;

²Казанский государственный медицинский университет;

mari_terenina@inbox.ru

Целью данной работы является моделирование локального полевого потенциала (ЛПП), соответствующего распространяющейся деполяризации (РД), индуцируемой эпилептической аппликацией калий-хлора [1]. Для этой цели использовали систему NEURON Python и экстраклеточный модуль [2], которые позволяют воспроизводить особенности функционирования одиночных нейронов и вычислять изменения макроскопических параметров моделируемого пространства (концентрации ионов, потенциалы и т.п.).

Для воспроизведения эффекта эпилептической аппликации калий-хлора были использованы следующие параметры и настройки модели: размер пространства 1600x1000x1000 мкм с граничными условиями Неймана, включены все соответствующие работе нейрона параметры. Плотность нейронов 90000 на мм³. Эпилептическую аппликацию имитировали путём задания болюса калия на одной из границ пространства. ЛПП вычислялся из суммарных трансмембранных токов калия и натрия на основе биофизической модели, реализованной в NEURON. Учитывались потенциалы действия нейронов, расположенных на расстоянии не более 200 микрон от каждого электрода [3].

Было проведено сравнение динамики локального потенциала при поверхностном расположении калия с результатами *in vivo* регистрации внеклеточного потенциала в коре мозга крысы при эпилептической аппликации

калий-хлора. Общая динамика характерного параметра – значения ЛПП – соответствует экспериментальным наблюдениям. Среднее значение амплитуды РД составляет ~ -22 мВ, что согласуется с экспериментом. Скорость вертикального распространения РД данных ЛПП составляет 60 мм/мин, что также соответствует экспериментальным данным [1]

Планируется дальнейшее моделирование сети нейронов с добавлением внешнего источника стимуляции током в частотном диапазоне эпилептических паттернов.

Список литературы

1. Nasretdinov A., Lotfullina N., Vinokurova D. et al. Direct current coupled recordings of cortical spreading depression using silicone probes // *Front. cell. neurosci.* 2017. № 11. P 408
2. Newton A.J.H., McDougal R.A., Hines M.L., Lytton W.W. Using NEURON for reaction-diffusion modeling of extracellular dynamics // *Front. neuroinformatics.* 2018. № 12. P 41
3. De Schutter, E. E. *Computational Modeling Methods for Neuroscientists.* Cambridge. 2009

Моделирование саморганизации гибридных молекул, состоящих из лизинового дендрона с несколькими гидрофобными хвостами

Михтанюк С.Е.¹, Фатуллаев Э.И.¹, Шавыкин О.В.¹, Неелов И.М.^{1*}

¹*Университет ИТМО;*

i.neelov@mail.ru

Самоорганизация амфифильных молекул в водном растворе - хорошо известный эффект, наблюдаемый во всех живых организмах. Варьирование архитектуры и химической структуры гидрофобной и гидрофильной частей приводит к образованию большого количества агрегатов различных размеров и морфологий. Дендромицеллы, образованные гибридными молекулами, содержащими гидрофильный дендронный и гидрофобные линейные блоки, являются прекрасными кандидатами для применения в качестве носителей лекарств и генов [1-4]. Для применения в биомедицине дендромицеллы должны обладать низкой токсичностью и высокой биосовместимостью. Этому требованию отвечают пептидные, и, в частности, лизиновые дендроны [5-7]. В данной работе с помощью численного метода самосогласованного поля были исследованы сферические мицеллы на основе линейно-дендритных амфифильных блок-сополимеров с несколькими линейными гидрофобными хвостами.

Сначала были определены границы между различными морфологиями мицелл, используя зависимости большого термодинамического потенциала и химического потенциала от агрегационного числа. Следующим шагом был выбор наиболее вероятной морфологии мицеллы, которая соответствует наименьшему значению химического потенциала молекулы ПАВ. При малых значениях длин хвостов наиболее предпочтительной является сферическая морфология, с ростом длины хвоста происходит переход к цилиндрической морфологии и только при больших значениях длин хвостов доминирует ламеллярная морфология. Также была изучена внутренняя структура сферических мицелл и то, как она зависит от структуры гибридных молекул. Было получено, что разбиение одного гидрофобного хвоста на несколько приводит к уменьшению агрегационного числа и радиуса ядра. Напоследок были рассмотрены электростатические характеристики мицелл, образованных гибридными молекулами с заряженными лизиновыми головками и гидрофобными хвостами. Максимумы кривых радиального распределения электростатического потенциала смещаются к ядру с увеличением числа поколения мицелл, что отражает уменьшение агрегационного числа. Рост числа хвостов при заданном количестве гидрофобных сегментов в ПАВ приводит к увеличению относительного эффективного заряда и уменьшению дзета-потенциала. Дендроны в короне мицеллы, как и их заряды, делятся на две группы: первая находится вблизи ядра, а вторая - вблизи поверхности мицеллы. Поскольку ширина промежуточной области довольно велика, биологически активные молекулы могут проникать в эту область. Последний результат представляет потенциальный интерес для использования изученных сферических дендромицелл в качестве наноконтейнеров для доставки лекарств.

Работа была поддержана грантом РФФИ 20-53-12036.

1. Frechet, M., Tomalia, D. *Dendrimers and Other Dendritic Polymer*, Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2001, p. 647.
2. Cheng, Y., Tomalia, D. *Dendrimer-Based Drug Delivery Systems: From Theory to Practice*, Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2012, p. 542.
3. Shavykin O.V. , Leermakers F.A.M., Neelov I.M., Darinskii A.A., Self-assembly of lysine-based dendritic surfactants modeled by the self-consistent field approach, *Langmuir*, 2018 34(4), 1613-1626.
4. Narain, R. *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy*, Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2016, p. 279.

5. Sheveleva N.N., Markelov D.A., Vovk M.A., Mikhailova M.E., Tarasenko I.I., Neelov I.M. Lysine-based dendrimer with double arginine residues, RSC advances, 2019, 9(31), 18018-18026

6. Sheveleva N.N., Markelov D.A., Vovk M.A., Tarasenko I.I., Mikhailova M.E., Neelov I.M. Stable deuterium labeling of histidine-rich lysine-based dendrimers, Molecules, 2019, 24(13), 2481

7. Okrugin B., Ilyash M., Markelov D., Neelov I., Lysine dendrigraft nanocontainers. influence of topology on their size and internal structure, Pharmaceutics, 2018, 10(3), 129

Моделирование циклических процессов по экспериментальным данным в виде временных рядов посредством решений кусочно-линейных разностных уравнений с постоянными коэффициентами

Смирнов В.Ю.^{2*}, Кузнецова А.В.¹
¹ФГБУН ИБХФ им. Н.М. Эмануэля;
²ООО "Азфорус"²;
azforus@yandex.ru

В работе предлагается моделирование циклических процессов реального макромира системой линейных разностных уравнений с постоянными коэффициентами. Такая модель может быть переведена из любого начального состояния в заданное конечное состояние за заданное число шагов. Получены условия существования циклического решения на плоскости или в пространстве любой размерности. Для циклического процесса системы уравнений переключаются при достижении интегральными кривыми границ на фазовой плоскости (пространстве). Проведен анализ скорости сходимости таких циклических решений.

Модель в виде авторегрессий связана с экспериментальными данными – временными рядами и аппроксимирует их по критерию минимизации среднеквадратичного отклонения. Модель позволяет решать задачи достижения заданного значения показателя (биологического, фармакологического и др.) к заданному моменту. Для моделирования биологических систем большое количество методов описано у Ризниченко Г.Ю. [2]. Указанные исследования служат, однако, для качественного описания систем и не предназначены для связи моделей с какими-либо экспериментальными данными.

Мы рассматриваем модели динамических, в частности циклических процессов, в виде двух (или большего числа) систем линейных разностных уравнений с постоянными коэффициентами, интегральные кривые систем состыковываются по непрерывности. Переключение с одной системы уравнений на другую происходит при достижении интегральными кривыми пороговых значений – границ на фазовой плоскости. Предлагаемые нами модели используют экспериментальные данные, представленные временными рядами, аппроксимация данных осуществляется функциями-решениями систем линейных разностных уравнений с постоянными коэффициентами, причем выполняется критерий минимизации среднеквадратичного отклонения.

Такой выбор аппроксимирующих функций представляется наиболее соответствующим физической сути многих реальных динамических процессов макромира, поскольку даже процессы релаксационного типа имеют описание фронтов в виде быстро затухающих экспонент. Для процессов накопления или расходования некоторых взаимосвязанных ресурсов, при которых скорость накопления (расходования) пропорциональна наличествующей массе ресурсов, такое описание вытекает из самих понятий массы и скорости накопления. Такой характер имеют процессы роста популяций организмов в условиях достаточной кормовой базы и отсутствия врагов [3], выведения лекарственных препаратов из организма [4], а также такие физиологические процессы, как реакция зрачка на световой импульс [5] и “натрий-калиевый насос” на клеточных мембранах [6].

Использование отдельных звеньев (уравнений) в нашей модели апеллирует к принципу управления по “узкому месту”, суть которого заключается в том, что величина тех ресурсов, которые накопились в избытке, никак уже не влияет на протекание процесса, соответствующего “узкому месту”. Примерами таких систем являются в частности: биологические ферментативные процессы [3], [4], работа сердца (стадия QRS-комплекса и стадия изменения концентраций ионов): электрическая активность миокарда на интервале времени, соответствующем QRS-комплексу, не зависит от процессов изменения концентраций ионов калия или кальция и, напротив, по завершении QRS-комплекса процессы изменений концентраций ионов не зависят от практически постоянного состояния (называемого изолинией) электрической активности клеток миокарда.

Мы представляем модели в виде решений линейных разностных уравнений с постоянными коэффициентами, предполагая, что такая модель применяется к процессам, для которых она физически логична в силу характера самого исследуемого материала. Кроме того, предлагаемые модели могут представлять интерес только в случаях, когда в качестве исследуемого материала имеются экспериментально полученные временные ряды. Предложенное описание динамических, в частности циклических, процессов моделью в виде кусочно-

линейных разностных уравнений представлено в виде двух (или большего числа) систем линейных разностных уравнений с постоянными коэффициентами; интегральные кривые систем состыковываются по непрерывности. Переключение с одной системы уравнений на другую происходит при достижении интегральными кривыми пороговых значений – границ на фазовой плоскости.

Увеличение размерности фазового пространства не вызывает появления принципиальных трудностей как со стороны условия существования цикла, так и со стороны алгоритма аппроксимации экспериментальных данных [1]. Данная модель может быть полезна для описания многих биологических, химических явлений, циклически или однократно протекающих во времени. В результате применения данного подхода экспериментальные данные оказываются аппроксимированными кривыми, являющимися решениями линейных разностных уравнений с постоянными коэффициентами (наборами действительных или комплексно-сопряженных экспонент, а также знакопеременными кривыми).

Список литературы

1. Smirnov V.Yu., Kuznetcova A.V. Approximation of Experimental Data by Solving Linear Differential Equations with Constant Coefficients (in Particular, by Exponentials and Exponential Cosines). Pattern Recognition and Image Analysis, 2017, Vol. 27, No. 2, pp. 175–183.
2. Ризниченко Г.Ю. Лекции по математическим моделям в биологии (изд. 2-е, испр. и дополн.) - М-Ижевск: НИЦ <<Регулярная и хаотическая динамика>>, 2011.
3. Рубин А.Б., Пытьева Н.Ф. Резниченко Г.Ю. Кинетика биологических процессов – М.: МГУ, 1987, стр. 64.
4. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н., Фармакокинетика, Ростов-на-Дону, "Феникс", 2001, стр. 163, 168.
5. Alpern M., Ohba N. The effect of bleaching and backgrounds on pupil size. Vision Res. Vol. 12, p. 943-951. Pergamon Press 1972. Great Britain.
6. Hodgkin A.L., Huxley A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, J. Physiol, 1952, p. 513.

Модель генерации и распространения потенциала действия, учитывающая зависимость ёмкости мембраны от напряжения

Эрнандес-Касерес Х.³, Джимаков С.С.^{1,2}, Дроботенко М.И.^{2*}, Нечипуренко Ю.Д.^{4,5}

¹Южный научный центр РАН;

²Кубанский государственный университет;

³Кубинский Центр Нейронаук;

⁴Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН;

⁵Севастопольский государственный университет;

mdrobotenko@mail.ru

При возбуждении мембрана аксона изменяет свою толщину, и это механическое изменение сопровождается распространением потенциала действия. Это явление не рассматривается в классической модели Ходжкина-Хаксли (Х.Х.) [1], и ряд авторов представляет возбуждение нерва как механический солитон, движущийся по бислою аксона [2].

Оставаясь в концептуальных рамках модели Х.-Х. [3], мы рассмотрели возможность того, что изменение толщины мембраны является следствием механического давления, вызванного действием мембранного потенциала на мембрану. Учитывая известные значения модуля Юнга аксональной мембраны, эта возможность представляется реалистичной. Мы модифицировали уравнения Х.-Х., сделав емкость мембраны функцией мембранного потенциала. Был исследован широкий диапазон возможных параметров, а также возможность линейной и квадратичной зависимости емкости от мембранного потенциала. Мы получили следующие результаты:

1. Для широкого диапазона зависимости мембранной емкости от мембранного потенциала, наблюдали генерацию и распространение потенциала действия.
2. Зависимость емкости от мембранного потенциала привела к изменению амплитуды и скорости распространения импульса.
3. Форма потенциала действия практически не изменилась.

При помощи этой модели мы показали, что, используя правдоподобные предположения, можно получить распространяющийся потенциал действия, который сопровождается волной механической деформации без необходимости постулировать существование механического солитона.

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

Литература

1. Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F., "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve," J. Physiol., 117, 500–544 (1952c)
2. Heimburg, T., Jackson, A.D., 2005. On soliton propagation in biomembranes and nerves. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 9790–9795. doi:10.1073/pnas.0503823102
3. Эрнандес Касерес Х.Л., Джимаков С.С., Семенов Д.А., Дроботенко М.И., Нечипуренко Ю.Д. Модели, описывающие генерацию и проведение нервного импульса. Биофизика. 2022. Т. 67. № 4. С. 728-740.

Молекулярное моделирование взаимодействия наночастицы золота с белком P2Y₁₂

Капитунова А.И.^{1*}, Кундалевич А.А.¹, Зюбин А.Ю.¹

¹Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, "Фундаментальная и прикладная фотоника. Нанопотоника", 14 А, Невского ул.;
AIKapitunova@mail.ru

Рецепторы P2Y (P2YRs), семейство пуриnergических рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), активируются внеклеточными нуклеотидами. Существует в общей сложности восемь различных функциональных P2YRs, экспрессируемых у человека, которые подразделяются на P2Y₁-подобные рецепторы и P2Y₁₂-подобные рецепторы. Их лиганды, как правило, представляют собой заряженные молекулы с относительно низкой биодоступностью и стабильностью *in vivo*, что ограничивает понимание этого семейства рецепторов. P2Y₁₂R регулирует активацию тромбоцитов и образование тромба. Тромб, вызванный аномальной активацией тромбоцитов, является патологической основой для формирования многих заболеваний. При различных физиологических и патологических состояниях тромбоциты могут активироваться и подвергаться таким процессам, как адгезия, деформация, агрегация, высвобождение частиц и синтез тромбосана A₂, что в конечном итоге приводит к физиологическому гемостазу или патологическому тромбозу.

В области сердечно-сосудистых заболеваний предпринимаются активные попытки использовать метод комбинационного рассеяния света (КРС) в биомедицинских исследованиях тромбоцитов. КРС - неинвазивный и высокочувствительный аналитический метод, который позволяет получить «отпечатки пальцев» молекул. Его можно использовать в качестве инструмента для анализа неизвестных образцов или молекул-мишеней в смеси компонентов. С целью увеличить сигналы исследуемых образцов используется метод гигантского комбинационного рассеяния света (ГКРС). Благодаря усилению электромагнитных полей вокруг металлических наночастиц возможно исследование молекулярной структуры, проведение детекции малоконцентрированных веществ. Наночастицы золота различной структуры могут быть использованы для получения спектров ГКРС плазмы, крови и тромбоцитов, в частности, от здоровых пациентов и тех, кто принимает лекарства от тромбоза. Однако неизвестно как влияют наночастицы на тромбоциты и его рецепторы, а также какое взаимодействие между ними происходит. Здесь мы впервые выполнили молекулярное моделирование белка P2Y₁₂ с золотой поверхностью. Результаты данного исследования могут дать понимание в механизмах взаимодействия наночастиц с биологическими объектами, а также стать началом для дальнейшего исследования и моделирования взаимодействия тромбоцитов с наночастицами.

Поскольку известна структура, полученная с помощью дифракции рентгеновского излучения, имеет артефакты и пустые места кристаллической решетки, мы выполнили достриаивание белка с помощью гомологичного моделирования. Аминокислотную последовательность P2Y₁₂ человека (PDB: 4NTJ) использовали в качестве последовательности запроса для поиска моделей гомологов с известными структурами из банка данных белков (PDB) с использованием NCBI-BLAST. Для гомологичного моделирования был выбран аналогичный белок P2Y₁₂ человека (PDB: 4PZX). Трехмерная модель P2Y₁₂ человека была создана с помощью программы MODELLER (версия 10.2).

Структуры белка и золота использовались как начальные координаты для моделирования. Был построен кубический ящик размером 160x160x200Å³ включающий молекулы воды TIP3P с добавлением ионов хлора для уравнивания заряда, белок и поверхность золота Au(111). Белок располагали на расстоянии примерно 60 Å от поверхности.

Все симуляции были выполнены с помощью пакета GROMACS 2021.5. Во всех симуляциях для моделирования пептида был выбран CHARMM27, а для представления воды был использован модифицированный потенциал TIP3P. Взаимодействия пептид-золото на каждой из различных водных границ раздела золота были описаны GoIP-CHARMM. Длины связей были ограничены h-bonds. Поверхностные атомы золота и объемные атомы золота были заморожены во время всех симуляций, но дипольные заряды золота оставались свободными. Классическое МД-моделирование проводилось при постоянном объеме и температуре

($T = 300 \text{ K}$). Использовались периодические граничные условия, алгоритм РМЕ и временной шаг интегрирования 2 фс.

Полные электростатические энергии систем (1-4 энергия ван-дер-Ваальса, 1-4 электростатическая энергия) были рассчитаны по параметрам элементарной ячейки, чтобы понять структурные перестройки белка.

Для оценки поведения белка в присутствии золотой наночастицы проводилось моделирование в течение 5000 пкс. В начале моделирования белок отдалается от наночастицы на расстоянии около 4 нм, после 1500 пкс происходит сближение до примерно 3,5 нм, а после 3500 пкс снова происходит отдаление до 4,5 нм.

Оценка эволюции радиуса вращения во времени в течение всего времени моделирования, показала уменьшение значения на десятки единицы с 3,4 до 3,15 нм, что свидетельствует о плотной упаковке белка. В основном, развертывание и изменение конформации связано с гибким внутриклеточным участком белка.

Далее были рассчитаны как потенциал Леннарда-Джонса, так и кулоновский электростатический потенциал. Потенциал Леннарда-Джонса описывает потенциальную энергию взаимодействия между двумя не связывающимися атомами или молекулами в зависимости от расстояния их разделения. Это полезно для учета отталкивания Паули и гидрофобных/Ван-дер-Ваальсовых притяжений. С другой стороны, кулоновский потенциал может описывать электростатические взаимодействия между атомными (частичными) зарядами. Полная энергия системы немного снижалась в ходе моделирования с -5278469 до -5280000 кдж/моль. Потенциал Леннарда-Джонса повышался в течении всего моделирования от 880250 до 883488 кдж/моль. Значение электростатического потенциала повышалось к 2200 пкс моделирования до уровня в 65000 кдж/моль, далее снизилось до 64500 кдж/моль в течение 1500 пкс, а после к 5000 пкс возвращалось к максимальному уровню около 64875 кдж/моль.

Результаты нашего моделирования свидетельствуют о том, что агрегации белка P2Y₁₂ на поверхности наночастицы не происходит, а конформации белка не изменяется. Эти данные могут создать базу для дальнейшего моделирования P2Y₁₂ с наночастицами других форм, а также для моделирования влияния наночастиц на участок тромбоцитарной мембраны с данным рецептором.

Мутационный анализ структуры транспортной молекулы аргинина

Колтовая Н.А.^{1*}, Душанов Э.Б.¹

¹Объединенный институт ядерных исследований;

²Объединенный институт ядерных исследований ;

koltovaya@jinr.ru

Суперсемейство APC (amino acid-polyamine-organocation)-транспортёров у человека состоит из многочисленных семейств растворимых носителей (SLC – solute carrier). Транспорт аминокислот через мембрану клеток осуществляется при помощи вторичного активного транспорта и глутатионовой транспортной системы. Вторичный активный транспорт – это перенос веществ с использованием градиента концентрации натрия или протонов между внутренней и наружной сторонами клеточной мембраны. Канонические APC-транспортёры включают SLC7 глутамат/цистеин натрий-независимый антипортёр, обменивающий внеклеточный цистеин на внутриклеточный глутамат [1, 2]. Катионные аминокислотные транспортёры (CATs – cationic amino acid transporter) также являются членами SLC7-семейства. Они поставляют аргинин для синтеза оксида азота, вносящего основной вклад в патогенез астмы [3]. В опухолях APC L-тип аминокислотный транспортёр I обеспечивает клетки аминокислотами, необходимыми для роста опухолевых клеток, нарушает регуляцию опухолевых клеток [4] и опосредует включение мелфалина, препарата, используемого в химиотерапии [5]. В центральной нервной системе транспортёры семейства SLC12 играют существенную роль в установлении концентрации хлорида и γ -аминомасляной кислоты (GABA) и глицин-опосредованной нейротрансмиссии [6]. Другие APC транспортёры участвуют в многообразных биохимических процессах в нервной системе, включая упаковку ингибиторов нейротрансмиттеров в синаптических везикулах [7] и натрий- или протон-зависимом симпорте глутамата, критическом этапе в рециклизации глутамата и GABA [8]. Для более глубокого понимания APC-транспортёров в целом и для понимания общих черт и различий между протон- и натрий-сцепленными транспортёрами мы изучали атомную структуру и механизм протон-зависимого эукариотического дрожжевого APC-транспортёра.

Включение аминокислот в клетки дрожжей опосредуется ~16 плазмo-мембранными пермиазами, большинство из которых принадлежат к APC-суперсемейству транспортёров, найденных во всех живых организмах. У дрожжей включение аргинина осуществляется в основном тремя пермиазами Gap1, Can1, Alp1, работающими и как транспортёр, и как рецептор. Основная аминокислотная пермиаза Gap1 транспортирует все аминокислоты, Alp1 – только аргинин, Can1 – аргинин и менее эффективно лизин. Can1 катализирует H⁺/аргинин симпорт и для переноса нужна протон-движущая сила [9].

Дрожжевая аргининовая пермиаза Can1 – гомодимер и состоит из 590 а.о. Кристаллическая структура эукариотических дрожжевых пермиаз в настоящее время в базе данных PDB отсутствует, однако имеются атомные структуры трех бактериальных белков семейства APC: антипортеры аргинин/агматин (AdiC) и глутамат/γ-аминомасляная кислота (GadC) и протон/аминокислотный симпортер широкой специфичности (ArcT). По структуре белки аналогичны и состоят из 12 альфа-спиральных трансмембранных сегментов (TM), фланкирующих гидрофильный хвост, направленный в цитоплазму. TM образуют два кольца «5+5», которые охватывают сайт связывания субстрата. TM11 и TM12 осуществляют связывание мономеров. Такая укладка типична для нескольких семейств транспортеров.

Ранее [10, 11] для моделирования мы использовали кристаллическую структуру мономера AdiC (PDB: 3L1L и 3OB6) [12, 13] в открытой конформации в водном окружении с аргинином в качестве субстрата. В данной работе в качестве базы для моделирования Can1 мы использовали кристаллическую структуру гомодимера AdiC высокого разрешения 1.7 Å (PDB: 7O82), встроенного в мембрану, гидратированную слоем воды толщиной 17 Å [14]. Эта система была собрана с помощью пакета CHARMM-GUI [15]. Далее система уравнивалась и моделировалась при температуре 310 K с помощью пакета Gromacs версии 2022.4 [16]. При моделировании системы использовался термостат Берендсена, давление поддерживалось равным 1 бар с помощью баростата Парринелло-Рахмана. Периодические граничные условия использовались во всех трех измерениях. Интегрирование уравнений движения проводилось по алгоритму leap-frog с шагом по времени 1 фс. Уравнивание системы проводили примерно в течение 10 нс. Моделирование проводилось примерно 0,5 мкс. Полученные результаты анализировались с помощью встроенных утилит пакета Gromacs. В результате моделирования получили структуру эукариотического протонного транспортера, что позволило уточнить взаимодействие пермиазы Can1 с мембраной и молекулами воды. Были проанализированы 1712 мутации, нарушающие транспорт аналога аргинина канаваина в клетку и приводящие к устойчивости к этому фунгициду. Среди них отобрали 322 одиночные миссенс-мутации, инактивирующие фермент. Они локализовались в 158 а.о. Анализ их локализации позволяет уточнить механизмы функционирования аминокислотного транспорта.

1. Sato H. et al. J. Biol. Chem. 274, 11455 (1999).
2. Bannai S., Kitamuri E. J. Biol. Chem. 255, 2372 (1980).
3. Zimmermann N. et al. J. Clin. Invest. 111, 1863 (2003).
4. Yanagida O. et al. Biochim. Biophys. Acta 1514, 291 (2001).
5. Harada N. et al. Acta Haematol. 103, 144 (2000).
6. Blaesse P. et al. Neuron 61, 820 (2009).
7. McIntire S. L. et al. Nature 389, 870 (1997).
8. Chaudhry F., Reimer R., Edwards R., J. Cell Biol. 157, 349 (2002).
9. Opekarova M., Caspari T., Tanner W. Europ. J. Biochem. 211, 683 (1993).
10. Koltovaya N., Zhuchkina N., Dushanov E. Rus. J. Biol. Phys. Chem. 5, 644 (2020).
11. Koltovaya N., Dushanov E. Rus. J. Biol. Phys. Chem. 7, 565 (2022).
12. Gao X., Zhou L., Shi Y. Nature, 463, 828 (2010).
13. Kowalczyk L. et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 108, 3935 (2011).
14. Ilgu H. et al. BMC Biology, 19, 179 (2021).
15. Jo S. et al. J. Comput. Chem., 29, 1859 (2008).
16. Van der Spoel D. et al. J. Comp. Chem., 26, 1701 (2005).

Некоторые термодинамические особенности процессинга самокомплементарных микроРНК (миРНК)

Кузьмичев С.А.^{1,2*}

¹МГМСУ им А.И.Евдокимова, НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина, НИИ Канцерогенеза;

²НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Москва, РФ;

kuzs19782005@mail.ru

Предсказание возможных мишеней эпигенетической регуляции для миРНК, отличающихся нуклеотидными последовательностями, основывается не только на наличии комплементарных им нуклеотидных мотивов, но и на анализе параметров межмолекулярной гибридизации [1], в том числе минимальной свободной энергии (minimum free energy, MFE). Особенности процессинга самокомплементарных миРНК, способных образовывать гомодуплексы, т.е. дуплексы между миРНК, имеющими одинаковые нуклеотидные последовательности, изучены не достаточно, учитывая, что содержание разных миРНК может изменяться в широких пределах в различных клетках [2]. Для восполнения этого пробела нами были исследованы некоторые

термодинамические параметры процессинга. Учитывая, что стабильность структуры дуплексов миРНК и премикроРНК (пре-миРНК) может влиять на скорость процессинга молекул миРНК рибонуклеазой РНКазой III Dicer [3], проведен сравнительный анализ параметра MFE фолдинга между пре-миРНК, с которых процессируются миРНК, имеющие разную MFE их гомодуплексов. Для анализа взяты последовательности миРНК и пре-миРНК из базы miRBase, версия 22.1, у видов, отличающихся количеством продуцируемых миРНК: у вируса герпеса человека 1 типа (HSV-1)- 27 миРНК, у мухи дрозофилы ананасса (*D. ananassae*) - 74 миРНК, и у домового мыши (*M. musculus*) - 1479 миРНК. Биоинформатический анализ для выявления миРНК, способных образовывать гомодуплексы и определения их MFE выполнен с помощью программы RNAup, как описано ранее [2]. Для вычисления MFE фолдинга премиРНК использовалась программа RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at>). Статистический анализ полученных данных проводился с помощью программы Statistica 10. Результаты и обсуждение: Корреляции данных расчета параметра MFE (в ккал/моль), полученных для премиРНК и гомодуплексов миРНК на основе метода, базирующегося на модели свободной энергии Тернера, Мэтьюза, и метода генерации ограничений [1] были высокими (коэффициент корреляции, $R = 0,97-0,98$). В тоже время, наш анализ показал, что с увеличением (по модулю) MFE гомодуплексов самокомплементарных миРНК от $MFE \geq 14-16$ ккал/моль у 3-х видов (HSV-1, *D. ananassae*, *M. musculus*) из разных таксонов, значительно отличающихся в том числе по количеству генов и миРНК, достоверно возрастает MFE фолдинга их пре-миРНК (для HSV-1 - $R = 0,85$, для *M. musculus* - $R = 0,6$, для *D. ananassae* - $R = 0,58$). Для домовой мыши анализ также показал отличие в распределении генов, кодирующих последовательности самокомплементарных миРНК, между разными хромосомами - с наибольшим количеством на 2, 7 и 12 хромосомах - 9%, 11% и 10%, соответственно, и наименьшим (порядка 1%) на 3, 6 и 13 хромосомах. Корреляции между MFE гомодуплексов миРНК и MFE фолдинга их пре-миРНК на разных хромосомах у мыши тоже были достоверными. При снижении MFE пре-миРНК у них значительно возрастает содержание нуклеотидов G и C, что отражают высокие R (для HSV-1 - $R = 0,93$, для *M. musculus* - $R = 0,8$, для *D. ananassae* - $R = 0,82$). Это согласуется с установленной ранее зависимостью между увеличением содержания G и C в пре-миРНК, и уменьшением их MFE, что позволяет образовывать более стабильную структуру пре-миРНК [4]. Обнаружено увеличение G и C в самокомплементарных миРНК, обладающих большей по модулю MFE гомодуплексов, однако здесь R были меньше (от 0,28 для *M. musculus* до 0,52 *D. ananassae*), что указывает на влияние других пар нуклеотидов (A,U) на MFE гомодуплексов. Ранее показана возможность ингибирования процессинга некоторых пре-миРНК с помощью гибридизации с ними комплементарных им миРНК [5]. Увеличение количества G и C в пре-миРНК, с которых происходит процессинг самокомплементарных миРНК, по мере роста по модулю их MFE, предполагает возможность образования более высокоэнергетических вторичных структур (гетеродуплексов) пре-миРНК и комплементарных им миРНК. Последнее указывает на наличие механизма регуляции процессинга самокомплементарных миРНК по типу отрицательной обратной связи. Разные R между MFE гомодуплексов миРНК и MFE фолдинга пре-миРНК у разных видов указывают на то, что влияние нуклеотидной структуры их пре-миРНК на саморегуляцию процессинга миРНК может отличаться. Обнаруженная тенденция показывает возможность существования у разных видов молекулярного механизма, позволяющего увеличивать эффективность контроля процессинга пре-миРНК для самокомплементарных миРНК, способных образовывать более стабильные гомодуплексы.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Andronescu M., Condon A., Hoos H. et al. // RNA. 2010. 16(12):2304-2318. 2. Кузьмичев С.А., Комельков А.В., Чевкина Е.М. // Успехи молекулярной онкологии. 2018. 5(3): 83-91. 3. Chakravarthy S., Sternberg S.H., Kellenberger C., Doudna J.F. // J Mol Biol. 2010. 404(3): 392-402. 4. Warris S., Boymans S., Muiser I., et al. // BMC Research Notes. 2014. 7 (34). 5. Koralewska N., Hoffmann W., Pokornowska M et al. // Acta Biochim Pol. 2016; 63(4):773-783.

Нелинейные свойства сигналов пик-волновой активности

Долинина А.Ю.^{1,2,3*}, Сысоева М.В.^{1,2}, Сысоев И.В.^{1,3}

¹Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН;

²Саратовский государственный технический университет им. Гагарина Ю.А.;

³Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского;

dolinina13nastya@yandex.ru

Заболевания нервной системы в наше время относятся к достаточно распространенным недугам для людей. Эпилепсия, как один из видов такого расстройства, в общем случае характеризуется возникновением в мозге высокоамплитудных электрических разрядов, синхронных в нескольких структурах мозга и являющихся результатом одновременного возбуждения большого числа нейронов. Для регистрации таких разрядов используют достаточно распространенный метод - электроэнцефалография (ЭЭГ). В случае животных

генетических моделей (крысы линий WAG/Rij и GAERS) или фармакологических моделей (каинатная и пилокарпиновая модели) также используются внутричерепные измерения локальных потенциалов мозга.

В электроэнцефалограмме человека основная частота эпилептической активности может быть одна, а у животных-моделей — другая. Например, у человека пик-волновые разряды имеют частоту около 3 Гц, а у крыс преимущественно — 6-8 Гц. Но частотно-временная структура спонтанных пик-волновых разрядов у людей и животных является сходной (масштабируемой).

В ряде случаев начало разряда характеризуется резким увеличением частоты сигнала и быстрым её снижением только в самом начале до некоторого определенного значения, причём подобная динамика может быть характерна как для абсансных приступов, так и для лимбических. Такие изменения структуры разряда рассматриваются и учитываются чаще всего только в некотором диапазоне, соответствующем основной (первой) гармонике, например, в диапазоне 7–12 Гц у крыс линии WAG/Rij.

В данной работе был проведен частотно-временной анализ динамики эпилептических разрядов в двух диапазонах, соответствующих первой и второй гармоникам сигнала. В качестве исследуемых данных выступали временные ряды локальных потенциалов мозга крыс.

Для проведения анализа использовалось оконное преобразование Фурье. В качестве окна было выбрано окно Ханна длиной в $\Delta T=1$ с, что соответствовало приемлемому компромиссу между временным разрешением ΔT и частотным разрешением Δf . В нашем случае основная частота лежала в диапазоне $[7\Delta f; 12\Delta f]$, а вторая гармоника — в диапазоне $[14\Delta f; 24\Delta f]$. Временное окно смещалось вдоль всего исследуемого сигнала с шагом по времени равным шагу выборки. Полученные после преобразования частотные и временные характеристики использовались для построения скелетонов — структур, представляющих из себя зависимость основной частоты приступа от его продолжительности. Такие структуры позволяют охарактеризовать динамику изменения частоты приступа, а также визуально оценить его частотную структуру в указанном диапазоне. Полученные скелетоны имели большое число быстрых кратковременных бросков между частотами, поэтому производилась фильтрация (сглаживание) скелетонов во временной области с временем отсечки 0.1 с. Скелетоны двух гармоник совмещались, при этом для визуальной оценки схожести динамики частоты значения частот, соответствующих второй гармонике, делились пополам (будем называть такие частоты приведёнными).

В результате для подавляющего большинства проанализированных разрядов частотно-временная структура второй гармоники повторяла структуру первой с погрешностью не более 1 Гц. Вне разряда скелетоны двух гармоник выглядели, наоборот, достаточно независимо. Моменты времени, когда гармоники не различаются больше, чем на указанный частотный порог (1 Гц в приведённых значениях), могут соответствовать моментам времени приступа. Для тестирования предложенного способа были использованы 200 с интервалы сигнала локальных потенциалов включающих как разряды, так и фоновую динамику. Всего было исследовано 240 интервалов.

По полученным графикам можно сказать, что в местах размеченных разрядов метод отмечает совпадение частот сплошной линией без разрывов, а в промежутках между разрядами отметки расположились эпизодически, без системы, с различными по длине промежутками между ними. Это означает, что обнаруженные там частотные совпадения имеют случайный или краткосрочный характер. Для их исключения была произведена фильтрация временных рядов, соответствующих совпадению двух гармоник. Для этого рассчитывалась разница между следующим и предыдущим значением времени и если она была больше 0.4 секунд, то следующий момент времени не запоминался. Таким образом формировались ряды, состоящие из определенного количества значений. При этом если длина такого ряда состояла менее чем из 350 точек, то данный ряд не рассматривался и исключался из всей цепочки.

После удаления краткосрочных совпадений приведенных частот двух гармоник остались только те ряды моментов времени, когда данные частоты изменялись синхронно, что было свойственно для большинства исследуемых интервалов.

Оценка динамики эволюции частоты двух гармоник показала, что основные частоты в указанных диапазонах жёстко связаны во время разряда, то есть обладают синхронизацией. При этом во время фоновой динамики синхронность двух гармоник отсутствовала. Это свидетельствует о том, что пик-волновой разряд является нелинейным процессом.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 19-72-10030-P, <https://rscf.ru/project/19-72-10030/>.

Новые методы анализа стохастической нелинейной динамики живых систем

Ряшко Л.Б.^{1*}

¹Уральский федеральный университет;
lev.ryashko@urfu.ru

Переход от традиционных методов статистической обработки временных рядов к построению и анализу адекватных математических моделей является отличительной чертой современных исследований в науках о живом. Актуальные задачи анализа сложных режимов поведения в биологических системах решаются с помощью современной математической теории бифуркаций. Случайные возмущения, неизбежно присутствующие в таких системах, могут существенно изменить сценарии поведения и вызвать явления, причины которых не объясняются в рамках исходных детерминированных моделей. Здесь можно отметить такие явления, как индуцированные шумами переходы между качественно различными режимами, стохастические бифуркации, индуцированные шумом переходы от порядка к хаосу и возбудимость, стохастический резонанс, фантомные аттракторы. Построение адекватных стохастических моделей и разработка конструктивных методов их анализа является актуальной задачей современной математической биофизики.

Широко используемый метод прямого численного моделирования решений соответствующих стохастических динамических моделей является весьма затратным и позволяет лишь констатировать те или иные феномены, не давая ответ на вопрос о лежащих в их основе механизмах. В цикле последних работ авторов развивается аналитический подход, использующий технику стохастической чувствительности и метод доверительных областей, ориентированный на конструктивный параметрический анализ воздействия случайных возмущений на динамические режимы нелинейных систем с непрерывным и дискретным временем. Математическая техника стохастической чувствительности, разработанная для регулярных аттракторов (равновесных, периодических и квазипериодических), так и для хаотических, позволяет аппроксимировать разброс случайных состояний в форме доверительных областей (эллипсоидов и полос) [1,2].

В анализе индуцированных шумом переходов между аттракторами важную роль играет геометрия бассейнов притяжения и сепаратрис, их разделяющих. При этом оценка критических значений интенсивности шума, вызывающего переходы, может быть получена из анализа взаимного расположения доверительных областей и этих сепаратрис.

Данный подход успешно применяется к анализу механизмов индуцированных шумом явлений в биофизических моделях, относящихся к разным иерархическим уровням и имеющих различную физическую природу: в процессах внутри- и межклеточных обменов [3], нейронной динамике [4], сердечной активности [5], динамике популяций [6] и метапопуляций [7], процессах распространения инфекций [8], иммуно-опухолевых взаимодействиях [9].

Универсальность разработанных методов вероятностного анализа позволяет использовать их в активно развиваемой современной области нелинейной стохастической динамики сложных биофизических процессов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №21-11-00062).

Литература

1. I. Bashkirtseva, A. B. Neiman, L. Ryashko, Stochastic sensitivity analysis of noise-induced suppression of firing and giant variability of spiking in a Hodgkin-Huxley neuron model. *Phys. Rev. E* 91 (2015) 052920.
2. I. Bashkirtseva, L. Ryashko, Stochastic Sensitivity Analysis of Noise-Induced Phenomena in Discrete Systems, in *Recent Trends in Chaotic, Nonlinear and Complex Dynamics*, World Scientific Series on Nonlinear Science Series B, pp. 173-192 (2021).
3. I. Bashkirtseva, L. Ryashko, How noise can generate calcium spike-type oscillations in deterministic equilibrium modes. *Phys.Rev.E*, 105(5-1) (2022) 054404.
4. L. Ryashko, E. Slepukhina, Noise-induced toroidal excitability in neuron model *Commun. Nonlinear Sci. Numer. Simulat.* 82 (2020) 105071.
5. E. Slepukhina, I. Bashkirtseva, L. Ryashko, P. K  gler, Stochastic mixed-mode oscillations in the canards region of a cardiac action potential model, *Chaos, Solitons and Fractals* 164 (2022) 112640.
6. I. Bashkirtseva, T. Perevalova, L. Ryashko, A stochastic hierarchical population system: excitement, extinction and transition to chaos. *International Journal of Bifurcation and Chaos*, Vol. 31, No. 14 (2021) 2130043.
7. A. Belyaev, I. Bashkirtseva, L. Ryashko, Stochastic variability of regular and chaotic dynamics in 2D metapopulation model, *Chaos, Solitons and Fractals* 151 (2021) 111270.
8. I. Bashkirtseva, T. Perevalova, L. Ryashko, Analysis of stochastic bifurcations in the eco-epidemiological oscillatory model with weak Allee effect. *International Journal of Bifurcation and Chaos*, Vol. 32, No. 8 (2022) 2250124.
9. I. Bashkirtseva, L. Ryashko, J. Duarte, J. M. Seoane, M.A.F. Sanjuan, The role of noise in the tumor dynamics under chemotherapy treatment. *Eur. Phys. J. Plus* 136 (2021) 1123.

Новый математический метод построения множественного выравнивания сильно дивергировавших нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Коротков Е.В.^{1*}

¹ФИЦ Биотехнологии РАН;
bioinf@yandex.ru

Проблема множественного выравнивания является одной из центральных проблем биоинформатики. Развитию математических алгоритмов для построения множественного выравнивания уделяется большое внимание и были разработаны различные математических методы. Динамическое программирование, прогрессивное выравнивание, итеративные методы, а также скрытые марковские модели и генетические алгоритмы наиболее часто используются для построения множественного выравнивания. Однако, все разработанные подходы в настоящее время методы и алгоритмы не позволят построить множественное выравнивание, если в анализируемых последовательностях отсутствует статистически значимое парное выравнивание. В этом случае невозможно построить статистически значимое направляющее дерево (guide tree) для прогрессивного выравнивания. Если последовательности сильно различаются, то также невозможно найти статистически значимые "зародыши" или же общие "слова". Получается, что построить множественное выравнивание для сильно отличающихся последовательностей в настоящее время крайне трудно или невозможно. Под сильно различающимися последовательностями будем понимать последовательности, накопившие более 2.5 случайных замен (х) на один нуклеотид относительно друг друга ($x > 2.5$). Найти такое выравнивание можно было бы, если построить множественное выравнивание с применением N-мерного динамического программирования для всех анализируемых последовательностей. Но такой подход требует огромных компьютерных ресурсов и в настоящее время его реализация невозможна. Получается, что в современных методах развитых для множественного выравнивания аминокислотных или нуклеотидных последовательностей присутствует определенный пробел. В настоящей работе мы восполнили этот пробел и разработали математический метод для создания множественного выравнивания для сильно различающихся последовательностей (MAHDS), который позволяет построить множественные выравнивания для таких последовательностей, где любое парное выравнивание не обладает достаточной статистической значимостью. Мы изучили возможности программ ClustalW, Clustal-omega, T-coffee, Kalign, Mafft, Muscle and AllAlign и некоторых других по созданию множественного выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей в зависимости от степени их эволюционной дивергенции (х). Удалось показать, что эти программы хорошо работают до значений $x < 2.4$. Однако MAHDS позволяет строить статистически значимые выравнивания при степени эволюционной дивергенции х в интервале от 2.4 до 4.4. Это открывает новые возможности для изучения эволюционной дивергенции как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей.

Основная идея метода MAHDS состоит в том, чтобы найти такой образ множественного выравнивания случайных последовательностей который бы наиболее точно описывал множественное выравнивание анализируемых последовательностей. В этом случае мы не строим множественное выравнивание для анализируемых последовательностей каким-либо методом, а только оптимизируем какие-либо образы множественных выравниваний. Оптимизация заключается в том, чтобы брать образы различных множественных выравниваний и адаптировать их к имеющимся последовательностям. В качестве оптимального множественного выравнивания для анализируемых последовательностей удобно брать такой образ (или PWM), который будет иметь экстремум функции сходства.

Разработанный нами математический метод был применен для выравнивания промоторных последовательностей из геномов *A.thaliana* [Korotkov и др., 2021a], *Oriza sativa* [Korotkov и др., 2021b], *Capsicum annuum* [Rudenko, Korotkov, 2022]. Промоторные последовательности были взяты из банка данных EPD (<https://epd.epfl.ch//index.php>). В данной работе показано, что многие районы промоторных последовательностей от -499 до +1 являются сильно консервативными. Также участки от +1 до +70 вносят большой вклад в создание множественного выравнивания промоторов. Всего удалось получить от 5 до 16 классов множественных выравниваний промоторов для изученных геномов, которые содержат от 55 до 75% известных промоторов. Созданные множественные выравнивания были использованы для поиска потенциальных промоторных последовательностей в геноме риса [Korotkov и др., 2021b]. В геноме *Oriza sativa* было обнаружено 145277 потенциальных промоторных последовательностей (ППП). Из них 18563 есть промоторные последовательности известных генов, 87,233 ППП входят в состав транспозонов и 37390 ППС найдены в неаннотированных последовательностях. Для генома *Capsicum annuum* (размер генома ~3 миллиарда нуклеотидов) число ППП примерно 960 тысяч при числе ложных позитивов менее 1%. Для генома человека нами было найдено ППП более 1 миллиона.

Разработанный метод был также применен для выравнивания аминокислотных последовательностей из сильно дивергировавших белковых семейств [Kostenko, Korotkov, 2022]. Было показано на примере 21 белкового

семейства, что MASHDS позволяет найти более статистически значимые выравнивания, чем все ранее разработанные методы. Любой пользователь может построить множественное выравнивание методом MAHDS на сайте <http://victoria.biengi.ac.ru/mahds/auth>.

1. Korotkov E. V. и др. Multiple alignment of promoter sequences from the arabidopsis thaliana l. Genome // Genes (Basel). 2021a. T. 12. № 2. С. 1–21.

2. Korotkov E. V. и др. Mathematical Algorithm for Identification of Eukaryotic Promoter Sequences // Symmetry 2021, Vol. 13, Page 917. 2021b. T. 13. № 6. С. 917.

3. Kostenko D.O., Korotkov E. V. Application of the MAHDS Method for Multiple Alignment of Highly Diverged Amino Acid Sequences // Int. J. Mol. Sci. 2022. T. 23. № 7. С. 3764.

4. Rudenko V., Korotkov E. Database of Potential Promoter Sequences in the Capsicum annuum Genome // Biol. 2022, Vol. 11, Page 1117. 2022. T. 11. № 8. С. 1117.

Новый меганалоб данных в сочетании с глубокой нейронной сетью позволил добиться прогресса в предсказании эффекта мутаций на стабильность белков

Пак М.А.^{1*}, Довидченко Н.В.^{2,3}, Sharma S.M.¹, Иванков Д.Н.¹

¹Сколковский институт науки и технологий ;

²Институт белка РАН;

³Atlas Biomed Group-Knomx LLC;

Marina.Pak@skoltech.ru

Предсказание изменения стабильности белка ($\Delta\Delta G$) вследствие мутации является одной из важнейших нерешенных проблем структурной биоинформатики. Недавний успех AlphaFold в предсказании трехмерных структур белков с точностью, близкой к экспериментальной, показал перспективность методов глубокого обучения для решения биологических задач. Огромное количество известных белковых последовательностей (Uniprot Consortium, 2012) и известные кристаллографические структуры сыграли решающую роль в успехе AlphaFold. Недостаток данных всегда был главной проблемой предсказания $\Delta\Delta G$: к середине 2022 года было собрано всего ~14 тысяч экспериментальных записей, что может быть слишком мало для обучения предсказанию $\Delta\Delta G$ с помощью глубокой нейронной сети.

Недавно Цубояма и др. опубликовали экспериментально измеренные значения $\Delta\Delta G$ для 851 552 мутаций, из которых 376 918 - высококачественные одиночные мутации [1]. Этот набор данных намного больше, чем любой другой, использовавшийся ранее, и в нем нет смещения в сторону мутаций на малые аминокислоты, в частности до аланина. Таким образом, это дает уникальную возможность разработать несмещенный современный предиктор $\Delta\Delta G$ с использованием одной из мощных моделей глубокого обучения.

В данной работе представлен инструмент ABYSSAL (Mega dataset и Deep neural network with attention-like mechanism), первый предиктор изменения стабильности белка вследствие единичной мутации, обученный на таком большом объеме данных. ABYSSAL использует преимущества современной модели глубокой нейронной сети ESM2 [2]. ABYSSAL предсказывает экспериментальные значения $\Delta\Delta G$ с коэффициентом корреляции Пирсона 0,85, что соответствует качеству, близкому к экспериментальному [1]. Мы показали, что обучающий набор данных должен содержать около ~100 000 мутаций - этого достаточно, чтобы в полной мере использовать преимущества современных моделей глубоких нейронных сетей, таких как ESM2 [2].

1. Tsuboyama et al. (2022). Mega-scale experimental analysis of protein folding stability in biology and protein design. bioRxiv 2022.12.06.519132.

2. Lin et al. (2022). Evolutionary-scale prediction of atomic level protein structure with a language model. bioRxiv 2022.07.20.500902.

О времени возникновения познавательной способности в ходе биологической эволюции

Антонец В.А.^{1,2*}

¹Институт прикладной физики РАН;

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского;
antonetsva@gmail.com

За последний век для многих видов животных этологами достоверно установлено наличие познавательной способности, т.е. способности в определенном объеме воспринимать окружающий мир и, в соответствии с этим, управлять своими действиями. Разумеется, у разных исследованных биологических видов она оказалась реализованной в разных формах и использует разные способы получения и использования информации об окружающем мире и о себе.

В силу разнообразия как механизмов познавательной способности, так и занимаемых эволюционных ниш выработать разумные критерии сравнения этой способности у различных видов, включая человека, не так легко.

Различные направления палеонтологии позволяют по обнаруженным следам с той или иной точностью реконструировать время происхождения и условия жизни тех или иных видов. Поэтому вопрос об установлении времени возникновения познавательной способности у многоклеточных животных смотрится как естественный.

Проведенный в работе анализ опирается на то общеизвестное обстоятельство, что характерный размер одноклеточных организмов, составлял и до нынешнего времени составляет 10 – 100 мкм. Из самого факта существования одноклеточных следует, что такой размер позволяет использовать диффузионную доставку внутрь клетки кислорода из окружающей среды в качестве механизма дыхания, обеспечивающего пластические и энергетические процессы, необходимые для существования и воспроизводства одноклеточных.

При появлении многоклеточных механизм дыхания каждой из клеток остался диффузионным, каким и был у одноклеточных. Механизм питания изменился и стал диффузионным, так как встроенные в единый организм клетки не могут поглощать себе подобных, как это происходит у одноклеточных.

Однако энергетическое и пластическое обеспечение каждой из клеток макроскопического организма за счет прямого диффузионного всасывания веществ из окружающей среды через его внешнюю оболочку, невозможно поскольку это весьма медленный процесс.

Многоклеточные животные оказались жизнеспособными, осуществив переход к другому типу питания. Не являясь автотрофами, они могут быть только консументами, употребляющими в пищу сопоставимые с ними по размеру фрагменты других многоклеточных – растений и животных, вплоть до поглощения добычи целиком.

Однако, для этого надо, чтобы консумент и его жертва могли приблизиться друг к другу. Поэтому многоклеточные животные должны обладать макроскопической подвижностью в масштабах существенно превышающих размер их тела.

Но если в локомоторный аппарат не интегрирована навигационная система, то перемещения многоклеточного организма не могут быть упорядоченно направленными. Трассатория такого мотивированного, но неупорядоченного движения выглядит как запутанная кривая с самопересечениями. Поэтому консумент и пища могут приблизиться друг к другу только случайно. В примитивных случаях, скажем, когда мелкое многоклеточное поглощает одноклеточных, вероятность приближения, по-видимому, бывает достаточной для жизнеобеспечения.

Таким образом, направленное (не хаотическое) движение — это признак наличия у многоклеточного животного механизма навигации. Этот механизм, в свою очередь, предполагает наличие сенсоров той или иной физической природы, которые позволяют обнаружить в окружающем мире удаленную цель (пищу или угрозу). Он также предполагает способность животного использовать навигационную информацию для управления локомоциями. Это возможно только при наличии у него внутренней модели и сенсоров состояния собственного тела.

Всё вместе это и есть самостоятельный элемент познавательной способности, т.е. способности воспринять окружающий мир и использовать полученные сведения для осуществления необходимых для выживания действий. Любой факт направленного движения животного однозначно подтверждает наличие у него познавательной способности.

Таким образом, время возникновения познавательной способности у многоклеточных животных может быть оценено двумя способами: а) по датировке первых палеонтологических следов направленного движения и б) по сопоставлению эволюционного возраста последнего общего предка способных и неспособных к упорядоченному движению родственных видов.

Можно определенно утверждать, что когнитивная способность (интеллект) возникла не позднее 520 миллионов лет назад. Это соответствует возрасту *Diania cactiformis*, которая, как известно, была способна двигаться направленно ([doi:10.1038/nature09704](https://doi.org/10.1038/nature09704)).

Полученный вывод несколько обескураживает своей простотой. Однако подобные простые доказательства важных научных положений, меняющих представление о мире, встречались и раньше. Например, так же просто

выглядит демонстрация гелиоцентрической организации нашей планетной системы, основанная на открытии Галилеем фаз Венеры с помощью простейшего телескопа.

Предложенный подход намеренно укрупнен. Он не предназначен для рассмотрения всех деталей и исключений. Но он позволяет сформулировать новые задачи для когнитивных и палеонтологических наук, направить их внимание на изучение эволюции познавательной способности вплоть до возникновения мышления, как элемента познавательной способности.

Автор благодарен А.К. Лабуцкому, С.В. Голубеву, В.Е. Турлапову и А.Ю. Журавлеву за поддержку и плодотворные обсуждения.

Работа профинансирована Министерством науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ИПФ РАН, проект № FFUF-2021-0014

Обезразмеренная модель неоднородной ДНК

Краснобаева Л.А.^{1,2*}, Якушевич Л.В.³

¹Томский государственный университет;

²Сибирский государственный медицинский университет;

³Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр

«Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»;

kla1983@mail.ru

Математические модели, имитирующие внутреннюю подвижность молекулы ДНК, содержат множество динамических параметров, таких как моменты инерции азотистых оснований, расстояния между парами оснований, расстояния от центров масс оснований до сахара-фосфатных цепочек, жесткость сахара-фосфатного остова, величины взаимодействия между основаниями внутри пар. Оценки значений этих параметров часто затруднены, а гарантировать их точность весьма проблематично.

В математике вместо системы дифференциальных уравнений со многими параметрами часто используют их безразмерные аналоги. Считается, что использование безразмерных аналогов позволяет уменьшить число параметров, облегчить анализ уравнений и нахождение их решений. Кроме того, безразмерные уравнения представляют интерес в связи с тем, что они не «привязаны» к конкретному объекту и могут иметь более широкое применение. Так они могут описывать нелинейную динамику не только молекулы ДНК, но и механических, электронных и других нелинейных систем.

В данной работе мы рассмотрели безразмерные уравнения, моделирующие движение нелинейных конформационных возмущений – кинков в неоднородной ДНК. Оказалось, что процедура обезразмеривания действительно приводит к уменьшению числа параметров модели. Кроме того, безразмерная модель позволяет обосновать правомерность применения теории возмущений и основанного на ней метода Маклафлина-Скотта, что значительно облегчает поиск решений и понимание поведения транскрипционных пузырей.

Получены безразмерные односолитонные решения (кинки) и уравнение МакЛафлина-Скотта, рассчитана скорость транскрипционных пузырей и построены траектории их движения.

Обзор маркеров хронических заболеваний и механизмов молекулярного исследования на основе высокопроизводительного секвенирования

Орлов Ю.Л.^{1,3}, Чен В.Л.², Волков И.А.¹, Цай Г.⁴, Чжао С.⁵, Ли Х.^{5*}

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия;

²Шанхайский университет традиционной китайской медицины, Шанхай, Китай ;

³Новосибирский государственный университет, Россия;

⁴Университет Южной Каролины, Колумбия, Южная Каролина, США ;

⁵Шанхайский университет Цзяо Тун, Шанхай, Китай ;

kaikaixinxin@sjtu.edu.cn

Мы подготовили специальный выпуск журнала «Исследование маркеров и механизмов хронических заболеваний на основе высокопроизводительного секвенирования» в журнале *Frontiers in Genetics*, в котором обсуждаются геномные исследования рака и хронических заболеваний (Orlov et al., 2022). Благодаря недавнему развитию технологии секвенирования и быстрому снижению затрат, технологии высокопроизводительного секвенирования (включая секвенирование второго и третьего поколения) революционизируют фундаментальные исследования в области наук о жизни и клинические исследования. Высокопроизводительное секвенирование производит миллионы прочтений секвенирования за один прогон (эксперимент), а выравнивание или сборка этих прочтений позволяет определять различные мутации на геномном уровне, точную количественную оценку экспрессии генов на транскриптомном уровне и идентифицировать модификацию гистонов или ДНК на эпигеномном уровне. Полученное в результате накопление огромной мультиомиксной информации открыло новую эру поиска эффективных маркеров заболеваний и изучения их роли в возникновении и развитии заболеваний (Anashkina et al., 2021).

С помощью высокопроизводительного секвенирования разработаны различные маркеры хронических заболеваний на всех уровнях омики, которые используются для диагностики и классификации заболеваний, прогнозирования эффектов лечения и профилактики заболеваний. К хроническим заболеваниям относятся рак, болезни сердца, диабет, артрит. Быстро и массово полученные мультиомные данные вместе с недавно разработанными алгоритмами предоставляют отличные возможности для идентификации более надежных биомаркеров. Эта тема исследования направлена на 1) разработку новых маркеров хронических заболеваний на четырех уровнях (т. е. генома, эпигенома, транскриптома и транслятома) с помощью высокопроизводительного секвенирования и 2) определение потенциальных связанных с маркерами механизмов возникновения хронических заболеваний или разработка. В частности, тема исследования содержит материалы, в том числе:

Идентификация новых биомаркеров и прогностических сигнатур для выявления хронических заболеваний или предсказания прогноза с использованием высокопроизводительного секвенирования;

Анализ возможных патологических причин появления маркеров, а также потенциальной роли, которую они играют в возникновении и развитии заболевания;

Применение новых высокопроизводительных методов секвенирования, способствующих разработке более эффективных биомаркеров хронических заболеваний;

Новые алгоритмы или инструменты для *in silico* идентификации эффективных маркеров хронических заболеваний на основе данных высокопроизводительного секвенирования.

Таким образом, мы организовали эту тему исследования, чтобы собрать документы, посвященные границам маркеров хронических заболеваний. Эта тема дополняет недавние темы исследований “Bioinformatics of Genome Regulation” (<https://www.frontiersin.org/research-topics/17947/bioinformatics-of-genome-regulation-volume-ii>), и “Bioinformatics of Genome Regulation” (<https://www.frontiersin.org/research-topics/17947/bioinformatics-of-genome-regulation-volume-ii>), в журнале *Frontiers in Genetics* (Das et al., 2022). В более позднем выпуске журнала собраны статьи, посвященные генетическому происхождению и происхождению, а не молекулярным механизмам болезней человека. В связи с важностью этой темы, коллекции статей продлены на 2023 год как «Том II» (“Volume II”, <https://www.frontiersin.org/research-topics/53085/high-throughput-sequencing-based-investigation-of-chronic-disease-markers-and-mechanisms---volume-ii>)

Литература

Orlov Y.L., Chen W.L., Sekacheva M.I., Cai G., Li H. Editorial: High-Throughput Sequencing-Based Investigation of Chronic Disease Markers and Mechanisms. *Front Genet.* 2022;13:922206. doi:10.3389/fgene.2022.922206.

Anashkina A.A., Leberfarb E.Y., Orlov Y.L. Recent Trends in Cancer Genomics and Bioinformatics Tools Development. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22, 12146. doi:10.3390/ijms222212146

Das R., Tatarinova T.V., Galieva E.R., Orlov Y.L. Editorial: Association between Individuals' Genomic Ancestry and Variation in Disease Susceptibility. *Front. Genet.* 2022; 13, 831320. doi:10.3389/fgene.2022.831320

Обработка данных морфологии клеток сердца для создания математической модели ткани предсердий

Сергеева Т.О.^{1*}

¹(НИУ МФТИ) Московский физико-технический институт;
sergeeva4247@gmail.com

Сердечно-сосудистые заболевания представляют собой группу болезней сердца и кровеносных сосудов, в которую входят ишемическая болезнь сердца, сердечная недостаточность, пороки сердца и другие патологии. Данная группа заболеваний является одной из наиболее частых причин смерти в развитых странах [1]. Одним из наиболее распространенных заболеваний сердечно-сосудистой системы является персистирующая форма фибрилляции предсердий (ФП) – нарушения ритма сердца, способного привести к развитию сердечной недостаточности и внезапной сердечной смерти [2].

Распространенным методом лечения фибрилляции предсердий является хирургическая абляция – создание в ткани предсердия непроводящих зон топологии, способной предотвратить возникновение и развитие спиральных волн реентри. Эффективность этой процедуры крайне мала: на повторную операцию возвращается более половины пациентов [3], известны случаи проведения до 10-ти повторных операций. В данной работе описано создание системы помощи врачу при проведении хирургических абляций, позволяющее повысить эффективность процедуры.

В основе системы лежит учёт гистологического анализа морфологии предсердной ткани. Ключевыми для данной работы являются идеи влияния клеточной морфологии на волновую динамику в ткани, а также роли фиброза в возникновении и развитии спиральных волн реентри (фиброз выступает в качестве субстрата для возникновения спиральных волн) [4].

По результатам исследования создается математическая модель ткани предсердий пациента, с использованием которой можно определить оптимальные протоколы абляции.

Математическая модель морфологии клеток основана на клеточной модели Поттса [5]. Данная модель характеризует морфологию сердечной ткани с рассмотрением двух типов клеток – кардиомиоцитов и фибробластов. Электромеханическая функция сердца выполняется возбудимыми клетками – кардиомиоцитами, которые способны генерировать потенциал действия и механическое сокращение. Невозбудимые клетки – фибробласты, их взаимное расположение с возбудимыми клетками может существенно повлиять на распространение волны. Взаимодействие между кардиомиоцитами, фибробластами и внеклеточными белками приводит к формированию сложной текстуры ткани. Данная ячеистая структура взаимодействия лежит в основе модели Поттса.

Создание пациент-специфичной компьютерной модели происходит в несколько этапов. Изначально снимаются электрофизиологические данные одиночных клеток с биоптата пациентов методом patch-clamp [6], далее на основе математической модели морфологии клеток генерируется неоднородная сердечная ткань.

В ходе разработки модели выполняются следующие задачи:

- получение, иммуногистохимия и конфокальная микроскопия срезов предсердной ткани пациентов (патанатомический материал) с фиброзом и без. Окрашивание тонких срезов, подготовленных на криотоме, осуществляется красителями DAPI, f-actin, a-actinin для оценки количественного и структурного анализа морфологии клеток;
- разработка модели морфологии одиночного предсердного кардиомиоцита и фибробласта в 2D по данным срезов пациентов с учетом наблюдаемых и варьируемых (итерационных) параметров морфологии (площадь клетки, поперечные размеры клетки, число выступов в мембране – подий, энергия взаимодействия клеток и др.);
- разработка и адаптация предсердной модели электрофизиологии по данным электрофизиологии клеточного материала пациентов (полученных с помощью метода patch-clamp и оптического картирования);
- разработка модели человеческой предсердной ткани, воспроизводящей проведение возбуждения и предсказывающей вероятность возникновения спиральной волны в 2D-ткани на основе полученных данных морфологии клеток и их электрофизиологии.

В результате будет создана система поддержки принятия хирургических решений в форме программного обеспечения, выполняющая следующие функции:

- определение фиброзных участков и характера фиброза по данным МРТ- и КТ- снимков пациентов;
- анализ и моделирование выявленных участков с точки зрения структуры ткани предсердий;
- представление результата анализа в форме визуализирующей карты предсердий с возможными очагами аритмий и предсказанными местами для проведения операции абляции.

Использованные источники:

1. ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association of Cardio-Thoracic Surgery, 2020.

2. Verma MS, Terricabras M, Verma A. The Cutting Edge of Atrial Fibrillation Ablation. *Arrhythm Electrophysiol Rev.* 2021 Jul;10(2):101-107. doi: 10.15420/aer.2020.40. PMID: 34401182; PMCID: PMC8335866.
3. Goulden CJ, Hagana A, Ulucay E, Zaman S, Ahmed A, Harky A. Optimising risk factors for atrial fibrillation post-cardiac surgery. *Perfusion.* 2022;37(7):675-683. doi:10.1177/02676591211019319.
4. Kudryashova, N., Tsvelaya, V., Agladze, K. et al. Virtual cardiac monolayers for electrical wave propagation. *Sci Rep* 7, 7887, 2017, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07653-3>.
5. Marée, A.F.M., Grieneisen, V.A., Hogeweg, P. (2007). The Cellular Potts Model and Biophysical Properties of Cells, Tissues and Morphogenesis. In: Anderson, A.R.A., Chaplain, M.A.J., Rejniak, K.A. (eds) *Single-Cell-Based Models in Biology and Medicine. Mathematics and Biosciences in Interaction.* Birkhäuser Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8123-3_5.
6. Neher, Erwin, and Bert Sakmann. The Patch Clamp Technique. *Scientific American* 266, no. 3 (1992): 44–51. <http://www.jstor.org/stable/24938980>.

Оптимизация размера наносенсибилизаторов при противоопухолевой радиотерапии с помощью математического моделирования

Колобов А.В.^{1*}, Кузнецов М.Б.¹

¹Физический институт им.П.Н.Лебедева Российской академии наук (ФИАН);
kolobov@lebedev.ru

Одной из перспективных технологий для повышения эффективности противоопухолевой радиотерапии является использование нерадиоактивных наносенсибилизаторов, испускающих вторичное излучение при активации первичным пучком [1]. Рациональным подходом на практике является использование наночастиц, каждая из которых представляет собой небольшой объем действующего радиосенсибилизирующего вещества, покрытый слоем полимеров шириной в несколько нанометров со встроенными в него антигенами, специфическими к облучаемым опухолевым клеткам. Такой подход облегчает накопление действующего вещества в опухоли и препятствует его накоплению в нормальных тканях, что должно приводить к повышению эффективности лечения при одновременной минимизации побочных эффектов, связанных с облучением нормальных тканей. Важнейшим фактором, определяющим успешность применения наносенсибилизаторов в этом случае, является эффективность доставки действующего вещества в опухоль, которая существенным образом зависит от размера используемых наночастиц. С его увеличением растет объемная доля действующего вещества в наночастицах, но также затрудняется их проникновение в опухоль через поры в стенках капилляров [2], затрудняется их движение по ткани вследствие уменьшения их коэффициента диффузии, а также ускоряется их выведение из организма посредством фильтрации печенью.

В докладе будет представлена математическая модель роста опухоли и ее радиотерапии с использованием специфических к опухолевым клеткам наносенсибилизаторов, вводимых в организм внутривенно. Результаты математического моделирования показывают, что оптимальный размер наночастиц для максимальной радиосенсибилизации опухоли при однократном внутривенном введении заданного суммарного объема частиц зависит от степени проницаемости капилляров, образованных в результате опухолевого ангиогенеза. При физиологически обоснованных значениях спектра пор таких капилляров, ширине полимерного слоя наночастиц в 7 нм, и физиологически обоснованных остальных значениях параметров математической модели оптимальный радиус наночастиц находится в пределах 13-17 нм, при этом верхнее значение достигается при использовании весьма экстремального спектра пор опухолевых капилляров, в котором присутствуют поры с диаметром до 100 нм.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения №075-15-2021-1347

1. Joiner M. C., van der Kogel A. J. Basic clinical radiobiology. — CRC press, 2018.
2. Herring N., Paterson D. J. Levick's introduction to cardiovascular physiology. — CRC press, 2018.

Основные закономерности межклеточных взаимодействий через проницаемые контакты

Асланиди К.Б.^{1*}

¹*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН;
kbaslanidi@gmail.com*

Основные закономерности межклеточных взаимодействий через проницаемые контакты

В.В.Смолянинов¹, Т.В.Потапова², К.Б.Асланиди¹

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

²Институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия. e-mail: kbaslanidi@gmail.com

В работе проведен анализ функционирования разнообразных многоклеточных систем, включая трихомы синезеленных водорослей, гифы мицелиальных грибов, а также ткани планарии и культуры клеток млекопитающих. Выявлена близость параметров электрической связи у далёких в таксономическом отношении биологических систем, имеющих разное строение гидрофильных межклеточных каналов и различные механизмы мембранного электрогенеза.

На основании собственных экспериментальных результатов и результатов других исследователей показано, что передача энергии в виде ионных потоков через проницаемые контакты является универсальной функцией всех проницаемых контактов и присуща всем клеточным популяциям. Проведена оценка преобразования энергии гидролиза АТР в энергию электрического потенциала на плазматической мембране. Показано, что перенос единицы заряда из цитоплазмы через плазматическую мембрану во внешнюю среду или перенос единицы заряда через проницаемые контакты эквивалентен 5,1 10-20 Дж. Если потоки ионов Na⁺ и K⁺ через плазматическую мембрану составляет 10⁷ ионов/сек, то на поддержание мембранного потенциала отдельной клеткой потребляется порядка 10-13 Дж/сек.

Необходимым и достаточным условием передачи энергии через проницаемые контакты является наличие электрического тока между клетками. Мощность, передаваемая от клетки донора к клетке акцептора, пропорциональна электрическому току, текущему через проницаемые контакты. Потоки энергии через отдельные клетки в многоклеточной системе могут значительно различаться. Эксперименты с клетками, различающимися по чувствительности к оубаину показали, что эффективная связь через высоко проницаемые контакты уменьшает наблюдаемое различие. Более того, энергетическая кооперация посредством электрических токов через проницаемые контакты увеличивает поток энергии через систему в целом и создаёт условия для развития функциональной специализации отдельных клеток. Отметим, что в многоядерных клетках мицелиальных грибов, существуют градиенты активностей неорганических ионов, что должно привести к специализации отдельных ядер. Проверка этого предположения требует экспериментального подтверждения.

Экспериментально показано, что после образования проницаемых контактов значения мембранных потенциалов всех деполяризованных клеток сдвигались в сторону значений мембранного потенциала гиперполяризованной клетки. Изменения активности Na⁺, K⁺-АТР-азы или ионных потоков через проницаемые контакты практически не повлияли на величину мембранного потенциала и ионный состав цитоплазмы гиперполяризованной клетки – донора энергии, а привели к изменению величины мембранного потенциала деполяризованных клеток, что, в свою очередь, изменило активности неорганических ионов в цитоплазмах клеток – акцепторов энергии. Это означает, что гиперполяризованная клетка является донором энергии для деполяризованных соседей, а мембранный потенциал гиперполяризованной клетки управляет мембранными потенциалами всех деполяризованных соседей.

В работе особое внимание уделено существованию функциональных компартментов, внутри которых создаётся и используется энергия градиента электро-химического потенциала. С одной стороны, увеличение количества клеток в системе создаёт условия для более узкой функциональной специализации отдельных клеток, увеличивающей эффективность системы в целом. С другой стороны, увеличение расстояния между краевыми клетками неизбежно приводит к ухудшению координации поведения отдельных клеток. Это означает, что размер компартмента определяется динамическим равновесием между эффективностью электродиффузионных взаимодействий через проницаемые контакты и процессами функциональной специализации. Функциональные компартменты в системах клеток, связанных проницаемыми контактами обнаружены у всех классов многоклеточных организмов.

В наших экспериментах размеры компартмента у самых разнообразных организмов и тканей не превышали 1,0 – 1,5 мм. Таким образом, непрерывные биоэлектрические сети не могут хранить морфогенетическую информацию на объектах, размеры которых превышают 1,0 мм. Влияние ионного состава цитоплазмы на экспрессию различных генов нами было исследовано экспериментально на культуре клеток злокачественной опухоли нейробластомы мыши NIE=115(клон C-1300). Регистрировалась степень морфологической дифференцировки, время дифференцировки и время жизни клеточной популяции.

Однозначные соответствия времени дифференцировки и времени жизни выявлены только для концентрации ионов $[Na^+]_o$ в среде. Как время дифференцировки, так и время жизни, существенно зависели от pH и от концентрации ионов $[Na^+]_o$ в среде. При этом, как время дифференцировки, так и время жизни, были минимальны при низких концентрациях ионов $[Na^+]_o$ в среде и pH 7,5. Наши результаты подтверждаются многочисленными работами других исследователей.

В работе показано, что содержание неорганических ионов в цитоплазме клетки управляет экспрессией генов, ответственных за пролиферацию, дифференцировку или апоптоз. Высокие значения $[Na^+]_i$ и pH 8,2 вызывали экспрессию генов, ответственных за процессы пролиферации и дифференцировки. Низкие значения $[Na^+]_i$ и слегка закисленная цитоплазма вызывали экспрессию генов, свойственных взрослой дифференцированной клетке. Высокие значения $[Na^+]_i$ и закисление цитоплазмы вызывали экспрессию генов, ответственных за процессы программируемой гибели клетки.

Из вышесказанного с очевидностью следует, что поток энергии, поступающий в живую систему из внешней среды, управляет потоками неорганических ионов через плазматическую мембрану и далее всеми остальными процессами жизнедеятельности.

Особенности морфологии и механизм структурного превращения оболочки флавивируса при созревании

Коневцова О.В.^{2*}, Голушко И.Ю.², Подгорник Р.¹, Рошаль С.Б.²

¹Университет Китайской академии наук;

²Южный федеральный университет;
khelgla@yandex.ru

Флавивирусы передаются преимущественно через укусы инфицированных комаров и клещей как животным, так и людям и вызывают различные патологии от бессимптомных до угрожающих жизни, включая энцефалит и геморрагическую лихорадку. Несмотря на то, что ежегодно миллионы людей заражаются флавивирусами, не существует одобренных противовирусных препаратов для лечения вызываемых ими инфекций, а известные вакцины эффективны только против определенных серотипов. Понимание принципов структурной организации белков и механизмов, управляющих морфологическими преобразованиями в вирусных оболочках (капсидах) во время их созревания, может иметь решающее значение для разработки новых противовирусных стратегий.

Все флавивирусы имеют сходную структурную организацию. Внутренняя белковая оболочка, окружена липидной мембраной, которая затем покрывается внешней белковой оболочкой, состоящей из 180 сложных белков, называемых гетеродимерами. Внешняя оболочка собирается на мембране эндоплазматического ретикула из 60 предварительно собранных симметричных тримеров, состоящих из трех идентичных гетеродимеров. При транспортировке на поверхность клетки через сеть аппарата Гольджи происходит созревание вируса и его тримерная внешняя оболочка перестраивается в гладкую плотно упакованную структуру, образованную из 90 димеров. Внутренний капсид состоит из 60 димеров, сформированных из С белка. Несмотря на относительную простоту, структура капсида была расшифрована лишь в 2020 г. и только для незрелой оболочки.

Используя последние данные о структуре флавивирусов, мы выявляем скрытые особенности порядка белков в сложной оболочке флавивируса, самособирающейся одновременно на двух противоположных сторонах липидной мембраны [1]. Поверхность незрелых флавивирусов основана на тригексагональной решетке, а радиальные проекции центров масс, рассчитанные для белков как внутренней, так и внешней незрелых оболочек, образуют общую икосаэдрическую треугольную сферическую решетку (геодезический полиэдр) (5,0). Таким образом, несмотря на липидную мембрану, разделяющую белковые слои, их структурная организация согласуется с принципом плотной упаковки слоистых структур: положения гетеродимеров (внешняя сторона) находятся между позициями капсидных белков (внутренняя сторона), что делает всю структуру более однородной и, возможно, также более стабильной. В рамках предложенной структурной модели мы дополнительно рационализируем структурную организацию неправильно собираемых *in vitro* неинфекционных субвирусных частиц, не имеющих внутреннего капсида.

После перестройки центры масс гетеродимеров практически совпадают с узлами сферической решетки (3,2), что выявляет скрытую симметрию димерной структуры [1]. К сожалению, нет подробных структурных данных о внутренней оболочке флавивирусов в зрелом состоянии. Однако, поскольку капсид защищен липидной мембраной, представляется разумным предположить, что при переходе структура капсида остается неизменной. В этом случае центры масс димеров капсида С должны по-прежнему соответствовать сферической решетке (5,0), тогда как в димерной внешней оболочке центры масс гетеродимеров принадлежат сферической решетке (3,2).

Так как указанные выше сферических решеток не имеют общих узлов, соразмерность между слоями значительно уменьшается.

Установив соответствие между положениями гетеродимеров в тримерном и димерном состоянии, можно полностью определить до сих пор неясный структурный механизм перестройки внешней белковой оболочки. Для этого мы накладываем друг на друга центры масс гетеродимеров до и после перестройки и предполагаем, что смещения центров масс белков малы. Такое предположение приводит к вполне конкретной рассматриваемой в докладе перегруппировке тримеров в димеры [2].

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-12-00105).

1. Konevtsova O. V., Golushko I. Y., Podgornik R., Rochal S. B., Hidden symmetry of the flavivirus protein shell and pH-controlled reconstruction of the viral surface// Biomater. Sci. 2023. Vol. 11. P. 225.

2. Rochal S. B., Konevtsova O. V., Roshal D. S., Božić A., Golushko I. Y., Podgornik R. Packing and trimer-to-dimer protein reconstruction in icosahedral viral shells with a single type of symmetrical structural unit// Nanoscale Adv. 2022. Vol. 4. P. 4677.

Особенности поведения магнитомаркированных биологических клеток при фазовых переходах в пленке феррита-граната

Сирюк Ю.А.¹, Безус А.В.^{1*}, Капшуков Р.А.¹, Кононенко В.В.², Бондарев И.С.¹

¹Донецкий национальный университет;

²Донецкий физико-технический институт им.А.А.Галкина;

a.bezus@donnu.ru

Введение. Доменные структуры магнетиков на протяжении многих лет являются объектом интенсивных экспериментальных и теоретических исследований, вызванных интересами как прикладной, так и фундаментальной науки. Интерес к исследованию пленок ферритов-гранатов объясняется тем, что степень проявления различных свойств в таких пленках гораздо выше, чем у объемных монокристаллов того же свойства.

В последние годы публикуется много работ, связанных с контролируемым переносом парамагнитных коллоидных частиц по поверхности пленки феррита-граната [1]. Исследуется перемещение частиц как на поверхности полосовых доменов, так и на поверхности решетки цилиндрических магнитных доменов (ЦМД). Перемещение парамагнитных частиц по поверхности рисунка доменных структур происходит под влиянием внешних магнитных полей. Но эти поля влияют и на доменную структуру, вызывая в ней фазовые переходы. Такое влияние необходимо учитывать при контролируемой транспортировке магнитных частиц по поверхности пленки.

Цель данной работы – изучить особенности поведения парамагнитных коллоидных частиц на поверхности пленки феррита-граната при индуцированных внешним магнитным полем фазовых переходов (ФП) в доменных структурах.

Такие исследования актуальны. Как показывает время, эти результаты могут быть востребованы в разных областях: микроэлектронике – запись и хранение информации; в медицине – направленная транспортировка биологических частиц, т.е. локальное лечение; в химии – сортировка частиц по их размерам. К тому же, при создании микроустройств можно совместить указанные области применения.

Основная часть. Для исследования выбрана феррит-гранатовая пленка с развитой поверхностью <111>, выращенная методом жидкофазной эпитаксии на гадолиний-галлиевой подложке, состав редкоземельной подрешетки YSmLuCa. Толщина пленки $h=6.8\text{ мкм}$. При комнатной температуре намагниченность насыщения пленки 0.258 мТл , фактор качества $Q>5$.

В качестве магнитных частиц используются магнитомаркированные ионами железной окалины дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* [2]. Исследуемый раствор готовится следующим образом: 10 микролитров суспензии магнитомаркированных клеток помещается в пробирку Эппендорфа. Затем в нее добавляется 5 микролитров 10% додецилсульфата натрия и 1 миллилитр дистиллированной воды. Содержимое пробирки тщательно перемешивается. На очищенную спиртом поверхность пленки феррита граната наносится 5 микролитров подготовленной суспензии.

Транспортировка магнитомаркированных клеток происходит под действием магнитного поля, имеющего следующие параметры: индукция $B=54\text{ мТл}$, частота $\nu=2\text{ Гц}$, форма управляющего сигнала пилообразная. Формирование внешних магнитных полей осуществляется с помощью магнитной системы. Визуальную картину доменной структуры наблюдаются благодаря эффекту Фарадея на поляризационном микроскопе МКД-Р и регистрируют цифровым фотоаппаратом. Под действием импульсного магнитного поля в феррит-гранатовой пленке формируется решетка ЦМД.

В работе исследовано локализованное движение магнитомаркированных клеток вокруг цилиндрических магнитных доменов. Такое движение создается управляющим магнитным круговым полем индукции $B=22\text{ мТл}$ в диапазоне частот (1-10)Гц. Наиболее яркие эффекты локализованного движения клеток вокруг ЦМД наблюдается в диапазоне намагниченности насыщения пленки $(0.1-0.22)4\pi\text{MS}$. Замечено, что динамика локализованного движения клетки зависит от величины индукции поля, нормального к поверхности пленки (поле смещения). Движение клетки наблюдается при увеличении поля смещения в пределах $(2.97-5.69)\text{ мТл}$. Это объясняется тем, что в таком диапазоне величины поля смещения сохраняется решетка ЦМД. В поле смещения, антипараллельном намагниченности внутри ЦМД, при величине индукции $B \geq 5.69\text{ мТл}$ в решетке ЦМД происходит фазовый переход первого рода путем исчезновения центрального домена гексагональной упаковки в новую решетку с меньшим диаметром ЦМД и большим периодом.

В поле смещения, совпадающим по направлению с намагниченностью внутри ЦМД, при величине индукции $B \geq 2.97\text{ мТл}$ в решетке происходит фазовый переход второго рода в сотовую структуру. При этом сохраняется число доменов, а ЦМД приобретают форму шестиугольника. Магнитомаркированные клетки выстраиваются вдоль доменных границ и визуализируют доменную структуру.

При последующем увеличении индукции поля совпадающего с направлением намагниченности внутри ЦМД, в сотовой структуре происходит фазовый переход первого рода в кластерную структуру. Магнитомаркированные клетки визуализируют доменные границы и этой структуры.

При увеличении индукции поля в кластерной структуре происходят изменения. Размеры некоторых доменов уменьшаются, а также уменьшается и длина доменных границ. В этом случае под влиянием градиента магнитного поля рисунка доменов парамагнитные клетки перемещаются на поверхности домена.

Заключение. Под действием небольшой величины индукции внешнего магнитного поля (по сравнению с величиной намагниченности насыщения пленки феррита-граната) в доменной структуре происходят фазовые переходы. Доменная граница генерирует сильный локальный градиент магнитного поля, который оказывает влияние на особенности поведения магнитомаркированных биологических клеток. Таким образом, клетки локализуются вблизи доменных границ и визуализируют магнитный рисунок, полученный при фазовых переходах в пленке феррита-граната.

1. Tierno P., Arthur V. Transport and selective chaining of bidisperse particles in a travelling wave potential // Eur. Phys J E Soft Matter. 2016, V.39(5), N54. DOI: 10.1140/epje/i2016-16054-1.

2. Беспалова С.В., Легенский Ю.А., Холявка М.Г., Солопов М.В. Инверсия сахарозы и биосорбция ионов Cu^{2+} магнитомаркированными клетками *Saccharomyces cerevisiae* // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2017, №1. -С.98-101.

Особенности топологии пролиферативных и непролиферативных эпителиальных монослоев

Рошаль Д.С.^{1*}, Аззаг К.², Федоренко К.К.¹, Рошаль С.Б.¹, Багдигян С.³

¹Южный федеральный университет;

²Миннесотский университет;

³Университет Монпелье;

rochal.d@yandex.ru

На ранних стадиях эмбрионального развития у млекопитающих плоские эпителиальные монослои могут образовывать структуры сложной геометрии. Например, примитивная эндодерма трансформируется в желточный мешок, который выполняет множество функций в зародыше. Изменение формы также происходит во время образования эпителиальных трубок, которые затем войдут в состав различных желез, легких, почек и других органов животных и человека. Изгиб, наблюдаемый при формировании кишечных ворсинок, является еще одним примером трансформации плоской структуры.

Данное исследование посвящено рассмотрению топологических аспектов изменения формы и кривизны эпителия. Основные задачи работы: исследовать глобальные и локальные топологические характеристики плоских и сферических пролиферативных монослоев клеток почек обезьян (COS), а также сравнить результаты с характеристиками непролиферативного эпителия разных видов асцидий и различных модельных (теоретических) клеточных упаковок.

В ходе исследования проанализировано более 50 изображений плоских и сферических монослоев клеток COS, полученных с помощью лазерного конфокального микроскопа. Написана программа, выявляющая на снимках центры ядер клеток, а также строящая на них триангуляцию Делоне. Это позволило вычислить топологические заряды клеток ($q=6-i$, где i – число соседей у клетки), а также построить распределения клеток по числу их соседей. Получено, что процент клеток, имеющих 6 соседей, в сферических монослоях равен 41%, а

в плоских 36%. Этот результат хорошо согласуется с экспериментальными данными для других пролиферативных эпителиев растений и животных [1]. Разница в количестве клеток с 6 соседями в плоских и сферических монослоях может быть связана с разными условиями их выращивания: плоские монослои высевали в обычные чашки Петри, а сферические – в гидрофобные. Показано, что главное отличие в топологии плоских и сферических монослоев заключается в наличии асимметрии в распределении клеток по числу их соседей. В частности, кривизна сферы приводит к тому, что доля клеток с пятью соседями больше в сферическом эпителии, а доля клеток с семью соседями меньше в плоском.

Также в работе разработан новый метод парных корреляционных функций для более глубокого анализа топологии монослоя. В нем сравниваются вероятности соседства клетки с числом соседей i с клеткой с числом соседей j в некоторой абсолютно случайной теоретической упаковке и в реальном монослое. Подробные теоретические выкладки будут представлены в докладе. Показано, что и в сферических, и в плоских монослоях клеток COS наблюдается тенденция к расположению рядом клеток с разным по знаку топологическим зарядом, например, клеток с пятью и семью соседями. Похожие тенденции в абиотических структурах, например, в сферических коллоидных кристаллах [2], приводят к образованию линейных топологических дефектов (рубцов и складок) – цепочек частиц с пятью и семью соседями. В пролиферативном эпителии выделить отдельные топологические дефекты невозможно, поскольку их топологическая дефектность (количество клеток, имеющих ненулевой топологический заряд) гораздо выше.

Аналогичный анализ топологии также проведен для 140 образцов непролиферативных эпителиальных монослоев со сферической геометрией, покрывающих личинки 8 различных видов асцидий [3]. Найдены распределения клеток по числу их соседей, а также парные корреляционные функции. Показано, что эпителий асцидий является менее топологически дефектным, чем пролиферативный эпителий COS. В монослоях асцидий выявлена заметная тенденция к агрегации 6-валентных клеток, которой нет в монослоях клеток COS. Мы связываем этот факт с наличием в эпителии асцидий щелевых соединений, осуществляющих обмен веществ между разными клетками, которых нет в монослоях клеток COS. Также в асцидиях наблюдается более вырожденная тенденция к расположению рядом клеток с разным по знаку топологическим зарядом, чем в эпителии COS.

Также проведено сравнение морфологических особенностей, обнаруженных в монослоях клеток COS и эпителии асцидий, с особенностями модельных структур, представляющих собой случайную упаковку клеток на сфере, а также менее случайные теоретические упаковки с меньшим разбросом клеток по их размерам. Было показано, что чем более сильно упорядочена модельная упаковка клеток, то есть чем больше в ней клеток имеют 6 соседей, тем больше корреляции между клетками с 5 и 7 соседями. Тенденция к агрегации клеток с 6 соседями, наблюдаемая в эпителии асцидий, полностью отсутствует во всех модельных структурах.

Таким образом, в данной работе были рассмотрены особенности топологии плоских и сферических монослоев клеток COS, а также сферического эпителия яиц асцидий. Мы предполагаем, что в пролиферативном и непролиферативном эпителии специфические структурные особенности, включая специфические топологические дефекты и определенные парные корреляции, порождают тонкую связь между порядком и беспорядком, определяющую эластичность эпителиальной ткани на протяжении морфогенетических процессов. Развиваемые в работе топологические методы также могут быть полезны для создания компьютерных алгоритмов по поиску различий в топологии между изображениями раковых и здоровых тканей [4].

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-72-00128, <https://rscf.ru/project/22-72-00128/>.

1. Gibson M.C., Patel A.B., Nagpal R., Perrimon N. (2006). The emergence of geometric order in proliferating metazoan epithelia. *Nature*, vol. 442, pp. 1038-1041.

2. Roshal D.S., Konevtsova O.V., Myasnikova A.E., Rochal S.B. (2016). Assembly of the most topologically regular two-dimensional micro and nanocrystals with spherical, conical, and tubular shapes. *Phys. Rev. E*, vol. 94, pp. 052605.

3. Roshal D.S., Azzag K., Le Goff E., Rochal S.B., Baghdiguian S. (2020) Crystal-like order and defects in metazoan epithelia with spherical geometry. *Sci. Rep.*, vol. 10, pp. 7652.

4. Roshal D.S., et al. (2022). Random nature of epithelial cancer cell monolayers. *J. R. Soc., Interface*, vol. 19, pp. 20220026.

**Особенности электрон-фононного взаимодействия у фотосинтетических пигментов,
выявленные при моделировании оптического отклика**

Чесалин Д.Д.^{1*}, Пищальников Р.Ю.¹
¹ИОФ РАН;

genoa-and-pittsburgh@mail.ru

В течение последних 20-30 лет развитие вычислительной техники и искусственного интеллекта позволило по-новому взглянуть на проблему теоретического описания оптических свойств пигментов фотосинтетических антенных комплексов. Объектом исследования в данной работе являются каротиноиды – молекулы, химическая структура которых содержит два основных элемента: полиеновую цепь и концевые радикалы. Несмотря на кажущуюся простоту, спектры поглощения каротиноидов нетривиальны и расчет оптического отклика может представлять определенные трудности. Для каротиноидов характерны четыре колебательные частоты химических связей: ν_1 и ν_2 – колебания двойных и одинарных углеродных связей, ν_3 – колебания метильной группы и ν_4 – колебания водорода. Для корректного моделирования оптического отклика каротиноидов полуклассическими методами, которые описывают набор эффективных параметров системы, необходимо экспериментальные данные (например, спектры поглощения) сопоставлять с соответствующей теорией. Для таких расчетов в основу берется подход, известный как модель многомодового броуновского осциллятора (ММБО), в которой бесконечный набор вибронных состояний, взаимодействующих с электронным переходом, заменяется конечным набором эффективных вибронных мод. В расчетах помимо этих четырех основных мод мы использовали два обертона $[2\nu]_1$ и $[2\nu]_2$ и суммарную моду $\nu_1 + \nu_2$. Каждая мода представлена тремя значениями $\{\omega_j, S_j, \gamma_j\}$, где ω_j – частота электронного перехода; S_j – Хуан-Рис фактор, характеризующий электрон-фононное взаимодействие; γ_j – коэффициент затухания. В то время как ω_j и γ_j могут быть найдены экспериментально, S_j является эффективным параметром модели, который не может быть непосредственно измерен. По мере увеличения числа свободных параметров подгонка экспериментальных данных становится невозможной, поэтому для решения этой проблемы необходимо использовать оптимизационные методы, например, алгоритм дифференциальной эволюции [1]. Это метод глобальной оптимизации, основанный на идее естественного отбора и представляющий собой более усовершенствованную и продвинутую версию генетических алгоритмов. Его преимуществом является то, что исследуемая функция может нелинейной и недифференцируемой. В работе были смоделированы спектры поглощения каротиноидов в различных органических растворителях с помощью ММБО. Всего было 12 свободных параметров: Ω_{eg} – энергия электронного перехода между основным и возбужденным состоянием системы, $[FWHM]_{\Omega}$ – полуширина спектра поглощения, $\{\omega_{low}, S_{low}, \gamma_{low}\}$ – параметры низшей вибронной моды и 7 Хуан-Рис факторов [2,3]. В результате вычислений было показано, что при моделировании практически идентичных спектров дифференциальная эволюция позволяет с высокой точностью определить влияние полярных и неполярных растворителей на ряд микропараметров среды. 9 из 12 параметров были определены с высокой точностью, только для параметров низшей вибронной моды значения стандартного отклонения были значительными. Таким образом, использование алгоритма дифференциальной эволюции позволяет создавать правдоподобные модели оптического отклика биологических пигментов и использовать их для моделирования данных в оптической спектроскопии.

Исследование выполнено за счёт гранта РНФ № 22-21-00905, <https://rscf.ru/project/22-21-00905/>

Список литературы

1. Pishchalnikov, R. Application of the differential evolution for simulation of the linear optical response of photosynthetic pigments. *Journal of Computational Physics* 2018, 372, 603-615, doi:10.1016/j.jcp.2018.06.040.
2. Chesalin, D.D.; Kulikov, E.A.; Yaroshevich, I.A.; Maksimov, E.G.; Selishcheva, A.A.; Pishchalnikov, R.Y. Differential evolution reveals the effect of polar and nonpolar solvents on carotenoids: A case study of astaxanthin optical response modeling. *Swarm Evol. Comput.* 2022, 75, 101210, doi:10.1016/j.swevo.2022.101210.
3. Pishchalnikov, R.Y.; Yaroshevich, I.A.; Zlenko, D.V.; Tsoraev, G.V.; Osipov, E.M.; Lazarenko, V.A.; Parshina, E.Y.; Chesalin, D.D.; Sluchanko, N.N.; Maksimov, E.G. The role of the local environment on the structural heterogeneity of carotenoid β -ionone rings. *Photosynthesis Research* 2022, doi:10.1007/s11120-022-00955-2.

Оценка лингвистической сложности генетических последовательностей штаммов SARS-CoV-2

Митина А.В.^{1*}, Орлов Ю.Л.¹

¹*Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет);
alinamitina44@gmail.com*

Мотивация и цели. Активное распространение коронавирусной инфекции требует разработки новых моделей вариантов связи нуклеотидных последовательностей вирусов и их функциональной значимости и возможной патогенности. На сегодняшний день описано несколько тысяч штаммов SARS-CoV-2, являющихся возбудителями COVID-19. Отдельные варианты представляют особый интерес, так как отличаются высокими показателями трансмиссивности и летальности. Существующее разнообразие данных, полученных путём секвенирования, позволяет провести анализ геномных последовательностей различных штаммов коронавируса, используя математические методы оценки структуры генома, исследования «горячих точек» мутаций.

Методы. Анализ последовательностей штаммов SARS-CoV-2, полученных из Genbank, проводился путем оценки лингвистической (комбинаторной) сложности текста (Orlov, Potapov, 2004). Значение комбинаторной сложности определяется отношением числа встретившихся слов к количеству возможных слов в последовательности фиксированной длины. Данный метод позволяет установить уровень насыщенности генетического текста повторами. Оценка фланкирующих районов точек нуклеотидных полиморфизмов показала присутствие участков низкой сложности текста, что связано с повторами, повышенной вероятностью разрывов ДНК с последующими ошибками репарации. Участки низкой сложности текста менее эволюционно консервативны и подвержены мутациям с большей частотой.

Результаты. Применен алгоритм оценки лингвистической сложности генома для дельта- и омикрон-вариантов SARS-CoV-2. Определены участки, соответствующие низкому и высокому уровню насыщенности генетического текста. Проведено сравнение профиля сложности текста с расположением открытых рамок считывания коронавируса. Данные были сопоставлены с вариабельностью генома по расчетам Пекинского Института Геномики (Beijing Institute of Genomics).

Заключение. Заражение вирусом SARS-CoV-2 может иметь ряд неблагоприятных последствий для организма человека, начиная от легкого недомогания и заканчивая летальным исходом. В мире на данный момент продолжается рост числа заболевших, а количество смертей от COVID-19 приближается к отметке в 7 млн. человек. Сложность для диагностики и лечения обусловлена непрерывным процессом мутирования, что приводит к появлению новых вариантов коронавируса. Предполагается, что компьютерные методы позволят проводить оценку патогенности новых штаммов на основе их генетической последовательности.

Оценка связности между полушариями мозга при эпилептиформной активности, вызванной введением пентилентетразола

Ершова А.С.^{2,1*}, Грищенко А.А.^{1,2}, Сулеймановна Е.М.³, Виноградова Л.В.³, Сысоев И.В.^{1,2}
¹*Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН,
Саратов, Россия;*

²*Саратовский Государственный Университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия;*

³*Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва, Россия;
anshova2002@gmail.com*

Пептилентетразол традиционно используется для провоцирования эпилептических приступов у здоровых животных: крыс, мышей и морских свинок. Такие фармакологические модели эпилепсии позволяют изучать работу глубоких структур мозга, включая таламус и гиппокамп, активно вовлечённых в развитие патологической активности [1], [2]. Для исследования связности между полушариями применялись различные методы, такие как расчёт значений тестов Колмогорова-Смирнова и Манна-Уитни и коэффициента фазовой синхронизации.

В работе были использованы данные 9 животных: 6-7 месячные самцы линии Wistar из питомника «Столбовая» Московской области. Все эксперименты проводились в соответствии с принципами Европейского сообщества по проведению экспериментов на животных и одобрены Комитетом по этике экспериментов на животных. Электрическую активность неокортекса регистрировали с помощью электродов [3] (винтов из нержавеющей стали), имплантированных в симметричные области лобной коры обоих полушарий. Средняя

продолжительность записей составляла один час, количество выделений для каждого животного составляло от 42 до 477.

Для использования различных методов расчёта связности необходимо было получить точную разметку. Для этого был создан алгоритм, основанный на обнаружении единичного разряда по одноканальным данным. Точность метода подтверждалась расчётом специфичности и чувствительности [4]. Полученные значения оказались достаточно высокими для двух характеристик одновременно, что указывало на то, что метод работает достаточно точно.

В данной работе оценивалась связность между полушариями мозга используя два различных метода. Первый был основан на применении и получении результатов, используя тесты Колмогорова-Смирнова и Манна-Уитни. В основе тестов лежит схожая логика, заключённая в определении соответствующего распределения в выборке [5]. Была выдвинута гипотеза о том, что полушария мозга связаны между собой, таким образом сравнивались распределения двух выборок этих самых полушарий. Значение 0,05 было взято в качестве стандартного р-значения. Если результат тестов ниже p , то гипотеза верна, а если выше – то нет. Особенностью было то, что полученные значения рассчитывались для всех разрядов у каждой крысы. Вторым подходом стал расчёт коэффициента фазовой синхронизации, показывающий количественную характеристику синхронизации между двумя отведениями каждого разряда. Для изучения фазовой синхронизации из выделенных разметкой сигналов с помощью преобразования Гильберта выделялись сигналы мгновенных фаз и рассчитывалась их разность. Получение значений коэффициента фазовой синхронизации I_{xy} осуществлялось путём нахождения модуля среднего арифметического экспоненты, возведённой в степень мнимой единицы, умноженной на разность фаз. Соответственно значение I_{xy} изменялось от 0 (полная асинхронность) до 1 (полная синхронность). В результате был выявлена необычная закономерность: достаточно часто значения коэффициента были высоки у разрядов, выделенных алгоритмом в двух полушариях, так и у тех разрядов, которые проявились только в одном полушарии. Практическая важность обнаружения явления синхронизации обуславливает необходимость получения надежных оценок коэффициентов синхронизации по наблюдаемым данным. При этом в большинстве случаев приходится иметь дело с короткими сигналами. В этом случае приходится учитывать, что велика вероятность получить большое значение оценки для несвязных систем и ошибочно истолковать его как характеристику существующей связи систем.

В ходе работы был написан алгоритм по обнаружению разрядов, а также реализованы методы расчёта значений тестов Колмогорова-Смирнова и Манна-Уитни и коэффициента фазовой синхронизации. Продемонстрированы количественные условия, при которых наблюдались большие (близкие к единице) значения оценки фазой синхронизации, которые указывали на высокую связность между разрядами в одно время в разных полушариях мозга.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 19-72-10030-Р, <https://rscf.ru/project/19-72-10030/>.

1. I. Solmaz, D. Gürkanlar, Z. Gökcil, C. Göksoy, M. Özkan, and E. Erdogan, “Antiepileptic activity of melatonin in guinea pigs with pentylenetetrazol-induced seizures,” *Neurological Research* 31(9), pp. 989–995, 2009.

2. V. I. Koroleva, L. V. Vinogradova, and J. Bures, “Reduced incidence of cortical spreading depression in the course of pentylenetetrazol kindling in rats,” *Brain Research* 608(1), pp. 107–114, 1993.

3. G. van Luijtelaar, A. L. uttjohann, V. V. Makarov, V. A. Maksimenko, A. A. Koronovskii, and A. E. Hramov, “Methods of automated absence seizure detection, interference by stimulation, and possibilities for prediction in genetic absence models,” *Journal of Neuroscience Methods* 260, pp. 144–158, 2016.

4. A. Ovchinnikov, A. L. uttjohann, A. Hramov, and G. van Luijtelaar, “An algorithm for real-time detection of spike-wave discharges in rodents,” *Journal of Neuroscience Methods* 194(1), pp. 172–178, 2010.

5. A. A. Grishchenko, M. V. Sysoeva, and I. V. Sysoev, “Detecting the primary time scale of evolution of information properties for local field potentials in brain at absence epilepsy,” *Izvestiya VUZ. Applied Nonlinear Dynamics* 28(1), pp. 98–110, 2020.

Пандемия SARS-Cov-2 как система «хищник-жертва»: биофизические, социальные и гелиофизические факторы развития локальных эпидемий

Рагульская М.В.^{1*}
¹ИЗМИРАН;
ra_mary@mail.ru

Рассматриваются особенности развития пандемии коронавируса в различных странах, в рамках системы «хищник – жертва» под внешним модулирующим воздействием солнечной активности. Обсуждается, что в условиях глобального минимума солнечной активности генетический состав населения оказался главным фактором различия динамики локальных эпидемии SARS-Cov-2. Страны с максимальным значением

относительной смертности от коронавируса имеют доминантное население с гаплогруппой R1b. Соотношение заболеваемости в гаплогруппах R1b : R1a : N в первую и вторую волны коронавируса (до начала всеобщей вакцинации в декабре 2020 года) составляло примерно 7:2:1, и практически не зависело от строгости карантинных мер и уровня медицинского обслуживания населения. Показано совпадение динамики заболеваемости и смертности в странах с близким генетическим составом, вне зависимости от введения или отсутствия локдауна на их территории. Выявлено возникновение автоколебательных волн в небольших странах с жестким локдауном в первую волну пандемии, что привело к существенному увеличению количества жертв в последующие волны. Обсуждается, что для стран с гаплогруппой R1b всеобщая вакцинация понизила уровень относительной смертности в 5-8 раз. Однако для стран с гаплогруппой N и R1a + N к середине 2022 года относительная смертность возросла в 2-4 раза по сравнению с 2020 годом. К сожалению, эффект от вакцинации в странах с гаплогруппой R1b также снизился к середине 2022 года. Возможно, это связано с ростом солнечной активности в процессе развития 25 цикла. Влияние этих разнонаправленных процессов на пандемию коронавируса в максимуме 25-го цикла солнечной активности требует дальнейшего изучения.

Литература

1. M. Ragulskaaya, Space weather and COVID-19 pandemic genogeography., J Nov Physiother Phys Rehabil 7(1), 031 (2020).
2. M. Ragulskaaya, Solar activity and COVID-19 pandemic. Open Astron. 30 (1), 149 (2021).
3. M. V. Ragulskaaya, V. N. Obridko, E. G. Khramova Galactic Factors, the Young Sun, the Earth, and the Biophysics of Living Systems. Biophysics, 65 (4), 686 (2020).
4. N. Belisheva, H. Lammer, H. Biernar, E. Vashenuyk, The effect of cosmic rays on biological systems. ASST. 8, 7 (2012).
5. M. H. Nasirpour, A. Sharifi, M. Ahmadi, S. J. Ghouschi, Revealing the relationship between solar activity and COVID-19 and forecasting of possible future viruses using multi-step autoregression. ESPR 28, 38074 (2021).
6. A. Nguyen et al, Human leukocyte antigen susceptibility map for SARS-CoV 2. JVI 00510 (2020).
7. Y. Souilmi et al. , An ancient viral epidemic involving host coronavirus interacting genes more than 20,000 years ago in East Asia . Current biology 31 (16), 3504 (2021).

Перколяционная модель ветвящейся сети активных сосудов

Антонец В.А.^{1,2*}, Антонец М.А.³

¹Институт прикладной физики РАН;

²Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского;

³АО Ма-тек;

antonetsva@gmail.com

Предлагаемая работа посвящена теоретическому анализу механизма пространственного распределения и регулирования потока крови в тканях, т.е. механизма перфузии (промыывания) тканей кровью.

В начале прошлого 20-го века Крог (Krough) ввел в научный оборот представление о том, что управление поступлением кровотока в капилляры мышц происходит за счет открытия/закрытия просвета артериол, обладающих мышечной стенкой. Впоследствии это представление было распространено и на другие органы. Именно такое представление использовано нами как основное для построения перколяционной модели регулирования кровотока.

Мы будем исходить из того, что кровь попадает в капилляры тканей по древообразной системе ветвящихся сосудов начиная от аорты. На некотором уровне ветвления она попадает в артериолы с активной гладкомышечной стенкой, сокращения которой и меняют просвет сосуда. На самых тонких веточка этого дерева – терминальных артериолах находятся капиллярные ячейки, содержащие несколько параллельных капилляров. Одновременно эти ячейки принадлежат самым тонким веточкам венозного дерева – венам. Таким образом, большой круг кровообращения можно представить как два сросшиеся «кронами» дерева - артериальное и венозное.

В модели мы рассмотрим только его артериальную часть и будем отождествлять артериальное дерево с дихотомически ветвящимся графом. В качестве основного элемента древообразной сети будем рассматривать тройник сосудов, состоящий из предка и двух его потомков. Таким образом, каждый сосуд A входит в состав двух тройников – в один как предок, а в другой как потомок.

Состояние некоего сосуда A в дискретный момент времени t будем описывать логической переменной X(A,t), имеющей в дискретный момент времени t значение «истина», если сосуд открыт и «ложь», если сосуд закрыт.

Введем естественные условия неразрывности потока в сети: если сосуд А открыт, то и его предок А0 тоже открыт. Иначе потоку в сосуде А неоткуда взяться.

Активные вазомоции будем описывать случайными логическими переменными. Положительная активность $m(A,t)$ означает открытие сосуда А в момент времени $(t+1)$, т.е. истинность $X(A,t+1)$. Отрицательная активность $n(A,t)$ означает закрытие сосуда А в момент времени $(t+1)$. Переменные $m(A,t)$ и $n(A,t)$ описывают взаимодействие сосудов между собой, но мы ограничим его предположением, что каждый сосуд А взаимодействует лишь со своим предком А0 и двумя потомками А1 и А2. Тогда поведение сети активных сосудов описывается следующими рекуррентными логическими уравнениями:

$$X(A,t+1) = [X(A,t) * (1 - n(A,t))] + [m(A,t) * (1 - X(A,t) * X(A0,t))] + [X(A1,t) + X(A2,t)] \quad (1)$$

Если предположить, что состояние сосудов в сети меняется только из-за собственной активности, а взаимодействие с предком и потомками сводится к соблюдению условия неразрывности, то стационарным решением системы уравнений (1) является либо полностью открытая сеть, либо набор конечных по размеру поддеревьев сети, т.е. ситуации, когда сквозного кровотока нет. Из этого следует, что для регулирования кровотока необходимо более сложное взаимодействие сосудов.

Стационарные состояния при более сложном взаимодействии будем рассматривать путем введения условных вероятностей того, что при открытом сосуда А с вероятностью P_{11} открыты оба его потомка, с вероятностью P_{10} - открыт потомок А1, с вероятностью P_{01} открыт потомок А2, с вероятностью P_{22} , что оба потомка закрыты. Сумма вероятностей $P_{11}+P_{12}+P_{21}+P_{22} = 1$.

Рассмотрим последовательность случайных чисел N_k , каждое из которых обозначает число открытых сосудов в k -том поколении ветвления сети. Она образует ветвящийся процесс. Анализ его производящей функции, показывает, что если $P_{22}/P_{11} > 1$, то сквозное протекание в сети невозможно. Если же $P_{22}/P_{11} < 1$, то вероятность P сквозного протекания, т.е. образование бесконечных кластеров равна $P = 1 - P_{22}/P_{11} = (P_{11} - P_{22}) / P_{11}$. Так как среднее число M ближайших открытых потомков открытого сосуда равно $M = 1 * P_{12} + 1 * P_{21} + 2 * P_{11}$, то $P = (M - 1) / P_{11}$. Т.е. протекание возникает при $M > 1$, когда среднее число открытых потомков сосуда больше 1. Образуется смесь конечных и бесконечных кластеров. Это означает, что перфузия тканей может возникать при не полностью открытой сосудистой сети. Это соответствует тому известному факту, что объем циркулирующей крови меньше суммарного объема сосудов сети.

Если предположить, что каждый из сосудов сети проявляет свою активность независимо от других и открыт с вероятностью P , то вероятность протекания $P = (2P-1)/P$. При этом протекание возникает при $P > 1/2$. Это соответствует выводам перколяционной теории для древообразных графов. В них порог протекания достигается при $P = 1/K$, где K – кратность ветвления графа.

Зависимость вероятности протекания P от превышения P над порогом весьма сильная. Превышение P над порогом на 10%, увеличивает вероятность протекания P от 0 до 0,56. Это и означает эффективность регулирования кровотока за счет изменения его структуры. В частности, это может быть объяснением того факта, что увеличение минутного объема кровообращения в 3 – 5 раз при увеличении систолического давления всего на 30 – 40 %.

Дополнительная возможность регулирования кровотока может быть обеспечена коллатеральными, которые могли бы соединять конечные кластеры. В них среднее число открытых сосудов равно $S = 1 / (P_{22} - P_{11})$, а среднее число тех из них, у которых нет открытых потомков, $\Gamma = P_{22} / (P_{22} - P_{11})$. Его можно рассматривать как количественную меру границы конечного кластера или как кратность ветвления исходного сосуда. Тогда при концентрации коллатералей $C = (P_{22} - P_{11})/P_{22}$ достигается порог протекания в системе этих кластеров.

Авторы благодарны А.К. Лабуцкому и И.А. Шерешевскому за плодотворные обсуждения.

Работа профинансирована Министерством науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ИПФ РАН, проект № FFUF-2021-0014

Построение множественных выравниваний аминокислотных последовательностей методом MAHDS

Костенко Д.О.^{1,2*}, Коротков Е.В.^{1,2}

¹Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»;

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН;
dk0stenko@yandex.ru

Построение множественных выравниваний символьных последовательностей является важной задачей биоинформатики и позволяет находить эволюционные и функциональные взаимосвязи в цепочках нуклеиновых кислот и белков живых организмов. Однако данная задача является NP-полной. Это означает, что время, затрачиваемое на вычисление её детерминированного решения, экспоненциально зависит от размера входных данных (в частности количества последовательностей). По этой причине все используемые на практике

методы построения множественных выравниваний применяют разнообразные эвристики, позволяющие решать данную задачу за приемлемое время, однако с потерей точности.

Ранее нами был разработан метод MAHDS, который позволяет строить множественные выравнивания за время, линейно зависящее от количества последовательностей и квадратично от их средней длины. Данный метод показал, что он способен строить статистически значимые выравнивания последовательностей ДНК даже с количеством замен на символ равным $x=4.4$. В то же время для других сравниваемых с MAHDS методов (T-Coffee, Muscle, ClustalW, MAFFT, Kalign) этот показатель составил $x<2.5$.

Мы адаптировали MAHDS для выравнивания аминокислотных последовательностей [1]. MAHDS сравнивался с методами построения множественных выравниваний, представленными на ресурсе EMBL-EBI, для которых доступно Web API. В их число входит T-Coffee, MUSCLE, PRANK, Clustal Omega, Kalign, MAFFT. Для сравнения MAHDS с другими методами построения выравниваний использовались следующие тестовые данные: база эталонных выравниваний белковых семейств BALiBASE, искусственные последовательности с определёнными свойствами и реальные белковые семейства с низким процентом идентичности ($<20\%$), взятые из баз данных Pfam и HOMSTRAD. Для оценивания качества выравниваний использовались критерии CS и Z. CS отражает меру сходства двух выравниваний (эталонного и оцениваемого), а Z – статистическую значимость выравнивания.

В ходе тестирования на BALiBASE считались средние значения CS и Z по выравниваниям всех белковых семейств, представленных в этой базе. Целью тестирования было не только сравнение MAHDS с другими методами, но выбор наиболее биологически адекватных параметров метода MAHDS (которые также влияют и на оценку Z). Для подбора параметров мы максимизировали CS, стараясь не допустить существенных падений Z. В дальнейшем для построения и оценивания выравниваний мы использовали набор параметров, зафиксированный на данном шаге. В рамках тестирования на BALiBASE в сравнении с другими методами MAHDS показал превосходство по Z, однако отставание по CS.

Перед проведением дальнейших тестов по правилу 3 сигма был определён порог статистической значимости, при котором выравнивание можно считать не случайным. Для этого оценивалось Z выравниваний множеств случайных последовательностей. Порог Z_t оказался равен 10.

Для тестирования на искусственных последовательностях из случайных предковых последовательностей генерировались множества потомков путём внесения случайных вставок, делеций и замен (в итоговое множество предковая последовательность не входила). Было сгенерировано 81 различное множество искусственных последовательностей. Длина родительской последовательности составляла 600 символов. Количество дочерних последовательностей – 100. Создавались множества со свойствами из следующего диапазона. Количество вставок (и столько же делеций): [2, 5, 10]. Длина вставок (и такая же у делеций): [1, 5, 20]. Количество замен на символ: [0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.4, 2.7], соответственно, расстояние x между дочерними последовательностями (в заменах на символ) в сгенерированных множествах последовательностей составляло [0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8, 5.4]. Было показано, что MAHDS при малом количестве и длине вставок и делеций способен строить статистически значимые выравнивания даже при расстоянии между выравниваемыми последовательностями $x=4.8$ замен на символ. Из остальных протестированных методов, наилучшие результаты показал MUSCLE. В таких же условиях MUSCLE способен строить статистически значимые выравнивания при $x=2.4$ замен на символ, что существенно хуже, чем показатель MAHDS.

При тестировании на реальных белковых последовательностях мы сравнивали MAHDS с методами T-Coffee и MUSCLE, так как именно эти 2 метода показали хорошие результаты в предыдущих тестах. Мы построили выравнивания тремя методами для 21 белкового семейства и оценили Z полученных выравниваний. Для 16 из 21 семейства MAHDS построил наиболее статистически значимые выравнивания (для других 5 семейств либо выравнивания всеми методами оказались значимыми, либо наоборот незначимыми также у всех методов). В то же время для 4 семейств (PF00915, PF10846, PF10895 и PF13944) только MAHDS оказался способен построить статистически значимое выравнивание.

1. Kostenko, D.O.; Korotkov, E.V. Application of the MAHDS Method for Multiple Alignment of Highly Diverged Amino Acid Sequences. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3764 <https://doi.org/10.3390/ijms23073764>.

Применение методов оценки сложности текста к анализу геномных кластеров сайтов связывания транскрипционных факторов

Дергилев А.И.^{1,2*}, Орлова Н.Г.³, Митина А.В.⁴, Орлов Ю.Л.^{1,4}

¹Новосибирский государственный университет,;

²Институт цитологии и генетики СО РАН;

³Финансовый Университет при Правительстве РФ;

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);
arturd1993@yandex.ru

Представлено программное приложение для исследования молекулярных механизмов образованию комплексов белок-ДНК на примере оценки информационной сложности геномных последовательностей, содержащих сайты связывания транскрипционных факторов. Работа опирается на применение современных математических и компьютерных методов теории передачи информации и сжатия данных (Orlov and Potapov, 2004), а также теории анализа данных и поиска закономерностей к исследованию генетических последовательностей Витяев и др., 2001; Orlov et al., 2002).

Понимание биологических процессов требует разработки новых программных средств (Dergilev A.I. et al., 2021) для определения сайтов связывания (участков последовательности) по данным секвенирования, в том числе в новых модельных геномах растений, на основе обработки больших массивов данных и реализации алгоритмов оценок сложности, в том числе алгоритма Лемпеля-Зива и оценок энтропии Шеннона.

Удобство использования программ анализа генетических текстов на персональных компьютерах и возможность обработки больших объемов данных делают их необходимым инструментом в экспериментальной работе молекулярных биологов. Огромное количество экспериментальных данных о последовательностях ДНК, накопленное в специализированных базах данных, дает возможность получения качественно новых знаний о структуре и эволюции геномов. Так, ранее было показано понижение сложности текста (включая энтропию Шеннона и оценки лингвистической сложности) в районах ДНК, содержащих участки однонуклеотидных полиморфизмов (Сафронова и др., 2015). Далее ставились задачи оценки групп (кластеров) совместно расположенных сайтов связывания транскрипционных факторов на ДНК (Dergilev and Orlov, 2020). Показано изменение сложности текста ДНК в среднем (в скользящем окне) для выборок нуклеотидных последовательностей, содержащих кластеры сайтов связывания транскрипционных факторов. На большем объеме данных подтверждено различие в сложности текста для кодирующих и регуляторных частей генома, к которым относятся кластеры сайтов.

В представленной работе поставлены задачи разработки и применения новых компьютерных методов статистического анализа сложности генетических текстов (Орлов et al., 2006), предсказания функциональных сайтов и регуляторных районов в геномной ДНК, поиска повторов в геномах и анализа их структуры. Разработаны скрипты на языке Python для быстрого кодирования и декодирования методом LZ77. Получена программа для работы с компактным сжатием текстов большого объема информации, методы и скрипты проверены на экспериментальных данных.

Разработан собственный набор инструментов Genomic Texts Complexity Analysis на последней версии языка Python в среде программирования PyCharm, с использованием графического модуля Qt5, обладающий удобством и простотой интерфейса, позволяющий удобно работать в одном окне с несколькими задачами, предоставляющий пользователю возможности кодирования / декодирования текстов, процедуру вычисления профиля сложности по модифицированному алгоритму Лемпеля-Зива в скользящем окне, визуализацию полученных профилей сложности. Таким образом, обновлен программный инструмент для анализа информационного содержания ДНК, сделаны новые оценки информационного содержания и энтропии регуляторных районов генов.

Благодарности: Работа поддержана грантом РНФ 23-44-00030.

Литература

1. Витяев Е.Е., Орлов Ю.Л., Вишневский О.В., Беленок А.С., Колчанов Н.А. (2001) Компьютерная система "GENE DISCOVERY" для поиска закономерностей организации регуляторных последовательностей эукариот. Молекулярная биология, 2001, Т. 35(6), С. 952-960. / Vityaev E.E., Orlov Yu.L., Vishnevsky O.V., Belenok A.S., Kolchanov N.A. Computer system "Gene Discovery" to search for patterns in eukaryotic regulatory nucleotide sequences. Molecular Biology. 2001; 35(6):810-817.

2. Сафронова Н.С., Пономаренко М.П., Абнизова И.И., Орлова Г.В., Чадаева И.В., Орлов Ю.Л. Фланкирующие повторы мономеров определяют пониженную контекстную сложность сайтов однонуклеотидных полиморфизмов в геноме человека. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(6): 668-674 DOI 10.18699/VJ15.092 (РИНЦ IF=0,389) / Safronova N.S., Ponomarenko M.P., Abnizova I.I., ..., Chadaeva

I.V., Orlov Y.L. Flanking monomer repeats determine decreased context complexity of single nucleotide polymorphism sites in the human genome

3. Dergilev A.I., Orlova N.G., Dobrovolskaya O.B., Orlov Y.L. Statistical estimates of transcription factor binding site clusters in plant genomes based on genome-wide data. *Journal of Integrative Bioinformatics*. 2021; 18, 20200036 doi: 10.1515/jib-2020-0036

4. Orlov Y.L., Te Boekhorst R., Abnizova I.I. Statistical measures of the structure of genomic sequences: entropy, complexity, and position information. *J Bioinform Comput Biol*. 2006; 4:523-36.

5. Orlov Yu.L., Filippov V.P., Potapov V.N., Kolchanov N.A. (2002) Construction of stochastic context trees for genetic texts. *In Silico Biology* 2(3), 257-262.

6. Orlov Yu.L., Potapov V.N. Complexity: Internet-resource for analysis of DNA sequence complexity. *Nucleic Acids Res*. 2004; Web-issue 2004, V. 32: 628-633.

7. Dergilev A.I., Orlov Y.L. Statistical problems of clusters of transcription factor binding sites in plant genomes. 2020; *Cognitive Sciences, Genomics and Bioinformatics (CSGB) IEEE Xplore digital library*. eCF Paper ID: 264845, pp 233-235. Doi: 10.1109/CSGB51356.2020.9214705

Применение модели артериальной системы мозга крысы для оценки интегрального распределения концентраций кислорода и глюкозы

Копылова В.С.^{1*}, Бороновский С.Е.¹, Нарциссов Я.Р.^{1,2}

¹*НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, Россия;*

²*Группа биомедицинских исследований, БиДиФарма ГмбХ, Зик, Германия;*

kopilova.veronika@yandex.ru

Непрерывное обеспечение головного мозга кислородом имеет фундаментальное значение для нормального функционирования организма. Снижение концентрации кислорода в тканях мозга ниже физиологического уровня в течение даже непродолжительного времени может приводить к катастрофическим последствиям. Наряду с кислородом глюкоза является еще одним жизненно важным метаболитом, поддерживающим работу нейронов. Следует отметить, что при измерении концентрации кислорода и других метаболитов в тканях мозга *in vivo* исследователи сталкиваются с целым рядом проблем, затрудняющих получение результатов. Артериальная сеть головного мозга является сложной многоуровневой системой, состоящей из огромного количества разнокалиберных сосудов, обеспечивающих кровотоком все области мозга. В связи с этим применение методов математического моделирования как для оценки транспорта метаболитов в полном артериальном дереве, так и для расчета концентрации кислорода и других веществ во всем объеме мозга требует серьезных вычислительных мощностей. В данной работе оценка распределения кислорода и глюкозы в тканях проводилась на основе модели артериальной системы мозга крысы путем сегментации объема мозга на локальные области и дальнейшего расчета концентрации в каждом из единичных элементов разбиения. Расчет концентрации метаболитов вблизи соответствующих сосудов осуществлялся по методу диффузионного поля сферических источников, а валидация проводилась методом конечных элементов. С использованием построенной модели артериальной системы мозга крысы с оптимальными значениями параметров ветвления были получены кривые распределения концентрации кислорода и глюкозы во всем мозге, соответствующие средние значения для указанных веществ, в свою очередь, согласуются с экспериментальными данными. Особенность предложенного в работе подхода состоит в том, что при рассмотрении больших анатомических структур мозга и всего органа в целом он позволяет количественно оценивать плотности распределения концентрации метаболитов и, соответственно, такие статистические характеристики, как, например, средние значения, учитывая архитектуру артериальной сети. При этом описанный механизм разбиения объема мозга на локальные области позволяет существенно снизить вычислительную сложность как процесса сегментации, так и оценки концентрации в единичном сегменте.

Применение редуцированной математической модели реакционных центров фотосистемы II для определения гетерогенности ее антенны в условиях стресса

Плюснина Т.Ю.^{1*}, Хрущев С.С.¹, Дегтерева Н.С.¹, Ризниченко Г.Ю.¹, Рубин А.Б.¹

¹МГУ, биологический факультет;

plusn@yandex.ru

Реакционные центры (РЦ) фотосистемы II (ФС II) представляют собой сложные молекулярные комплексы со светособирающей антенной, эффективное сечение которой может меняться. В зависимости от размера антенны РЦ могут быть трех типов: α -центры – димеры РЦ с пристыкованными светособирающими комплексами, β -центры – отсутствует периферическая антенна, γ -центры – отсутствует периферическая и внутренняя антенны (остается только коровая часть). В неблагоприятных условиях часто наблюдается увеличение доли РЦ с редуцированной антенной, β - и γ -центрами. Соотношение РЦ ФС II с разными размерами светособирающей антенны зависит от условий роста и действия факторов стресса. Изменение соотношения различных типов РЦ ФС II может служить индикатором действия стресса на клетки растений и водорослей. Оценка таких изменений может быть полезна для биотехнологических задач и экологического мониторинга. Распространенным способом оценки соотношения реакционных центров с антеннами разного размера является анализ кривой индукции флуоресценции хлорофилла (ИК) в образцах, обработанных 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевиной (DCMU) [1]. Для количественной оценки долей α - β - и γ -центров обычно используется мультиэкспоненциальное разложение площади над ИК. Однако этот подход имеет определенные ограничения, поскольку небольшая ошибка в определении максимального значения флуоресценции приводит к значительной ошибке в оценке долей [2, 3]. Для преодоления этих ограничений мы предлагаем подход, основанный на математическом моделировании. Построенная детальная математическая модель процессов в РЦ ФС II, обработанном DCMU, содержит 24 обыкновенных дифференциальных уравнения (ОДУ) и включает окислительно-восстановительные изменения кислородовывделяющего комплекса (КВК), фотовозбуждение и окислительно-восстановительные изменения пигмента P680, окислительно-восстановительные изменения феофитина и первичного хинона QA. Иерархия характерных времен этих процессов позволяет свести модель к системе трех ОДУ. Решение редуцированной модели с тремя состояниями точно воспроизводит решение полной системы в диапазоне от микросекунд до секунд. Комбинация нескольких таких моделей позволила описать излучение флуоресценции α -, β - и γ -центрами. Параметры сокращенной модели были определены путем аппроксимации решений модели по ИК для микроводорослей *Chlorella* при истощении азота в среде и микроводорослей *Chlamydomonas* при культивировании на среде без серы. С помощью модели были проверены существующие гипотезы о природе многофазного характера ИК, зарегистрированных после обработки DCMU: отражают ли они существование РЦ с различным размером светособирающей антенны, или являются проявлением каких-то ранее неучтенных процессов в РЦ. Модель показала, что наличие или отсутствие дополнительной фазы на ИК, измеренной для образцов, обработанных DCMU, может зависеть от соотношения скоростей реакции на донорной и акцепторной сторонах ФС II. Если характерное время реакций на донорной стороне больше характерного времени реакций на акцепторной стороне, то начальная часть ИК, до ~100 мкс, демонстрирует более медленное нарастание интенсивности флуоресценции по сравнению с экспоненциальным ростом, дополнительные фазы не наблюдаются. Если, например, из-за стресса замедляются переходы в КВК и характерное время процессов на донорной стороне становится меньше характерного времени процессов на акцепторной стороне, то появляется дополнительная положительная фаза с характерным временем 1–10 мс. Анализ экспериментальных кривых показал, что при минеральном голодании дополнительные фазы на индукционной кривой могут свидетельствовать как о появлении РЦ с уменьшенными размерами антенны, так и о замедлении перехода S1–S2 в КВК. Модель показывает принципиальную возможность появления дополнительной фазы на ИК, полученных на клетках микроводорослей после воздействия DCMU, за счет процессов в КВК. Предполагается, что в нормальных условиях фазы на кривой отражают наличие α -, β - и γ -центров, а в условиях стресса одна из положительных фаз может отражать замедление процессов на донорной стороне ФС II.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №22-11-00009.

Литература

1. Melis A and Homann PH (1976) Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. *Photochem Photobiol* 23: 343–350
2. Bell DH and Hipkins MF (1985) Analysis of fluorescence induction curves from pea chloroplasts. *Photosystem II reaction centre heterogeneity*. *Biochim Biophys Acta* 807: 255–262
3. Sinclair J and Spence SM (1988) The analysis of fluorescence induction transients from dichlorophenyldimethylurea-poisoned chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 935: 184–194

Промоторы РНК-полимеразы II: сходства и различия между областями базальных промоторов мРНК и некодирующих РНК

Савина Е.А.², Анашкина А.А.^{1,2}, Туманян В.Г.¹, Ильичева И.А.^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия;

²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, (Сеченовский Университет), Москва, Россия;
imb_irina@rambler.ru

РНК-полимераза II (POL II) отвечает за транскрипцию матричных РНК (mRNA) и ряда длинных некодирующих РНК (lncRNA), включая антисмысловую РНК (asRNA). Известные в настоящее время экзоны mRNA, кодирующие белки, составляют менее 3% всех транскриптов. Остальные 97% транскриптов, присутствующие в клетке, не кодируют белки, являясь предшественниками некодирующих РНК. Значительная их часть – это транскрипты POL II, используемый аппарат которой одинаков при транскрипции mRNA и lncRNA. Стадия инициации транскрипции происходит на базальных промоторах, имеющих длину около 100 н.п., последовательности которых чрезвычайно разнообразны. Эти регуляторные фрагменты могут отличаться друг от друга мотивами коротких элементов, от присутствия и сочетания которых зависит уровень экспрессии генов. Однако общая схема инициации транскрипции всегда одинакова. Ее началом служит распознавание ТАТА-связывающим белком (TBP) октануклеотидного фрагмента базального промотора, расположенного на расстоянии ~-28 н.п. от позиции старта транскрипции.

В этой работе мы сравнили текстовые и структурные характеристики базальных промоторов *H.sapiens*, влияющих на процессы инициации транскрипции мРНК и lncRNA. Использованы представительные выборки нуклеотидных последовательностей промоторов, выровненные относительно старта транскрипции, содержащиеся в базе EPD New (<http://epd.vital-it.ch>). Для mRNA выборка представлена 29597 промоторами, а для lncRNA 2339 промоторами. Построены профили частот встречаемости нуклеотидов на фрагментах длиной 80 н.п. (-50 — +30), их лого-представления, а также профили параметров, характеризующих изменения локальной пространственной структуры двойной спирали ДНК и ее динамику. Текстовые и структурные характеристики промоторов мРНК были получены ранее [1]. Все характеристики промоторов lncRNA будут подробно описаны в работе, которая готовится к печати.

Изменения структуры ДНК и ее динамики на профилях промоторов lncRNA оказался полностью аналогичным их изменениям на профилях промоторов мРНК. А именно, архитектура базального промотора также включает в себя две сингулярные области — гексануклеотид в окрестности позиции старта транскрипции (TSS), где равновесные параметры динуклеотидов двойной спирали резко меняются с каждым шагом, и октануклеотид (ТАТА-бокс), расположенный на расстоянии ~ -28 н.п. от него, для которого характерно расширение малого желоба и снижение интенсивности конформационной динамики.

Однако, лого-представления нуклеотидных последовательностей базальных промоторов mRNA и lncRNA выявляют существенные отличия. Эти отличия касаются энтропийной составляющей их нуклеотидных текстов. Исключение составляет ТАТА-бокс, где для обоих типов промоторов характерна предельно высокая энтропийная составляющая. Другой сингулярный участок промоторов – гексануклеотид в окрестности TSS, у промоторов lncRNA имеет более низкую энтропийную составляющую, чем у промоторов mRNA. В остальных же участках текста, напротив, более низкая энтропийная составляющая у промоторов mRNA. Возможно, именно поэтому короткие мотивы в промоторах mRNA могут играть роль регуляторов уровня генной экспрессии. Они могут взаимодействовать с белками транскрипционного аппарата POLII по механизму прямого узнавания, что для промоторов lncRNA представляется нам маловероятным.

Более высокий процент Рупи в положении TSS у базальных промоторов lncRNA указывает на то, что образование открытого комплекса в этих промоторах должно происходить легче (в среднем), чем в базальных промоторах mRNA. И это может обеспечивать им достаточно высокий уровень экспрессии.

Исследование частично выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 22-24-00936) (Рук. Туманян В.Г.)

[1] Melikhova, A.V.; Anashkina, A.A.; Il'icheva, I.A. Evolutionary Invariant of the Structure of DNA Double Helix in RNAP II Core Promoters. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 10873. <https://doi.org/10.3390/ijms231810873>

Радиотехническая модель связанных нейронов с синапсами

Егоров Н.М.^{1,2*}, Пономаренко В.И.^{3,2}, Сысоев И.В.^{3,2}, Сысоева М.В.^{1,2}

¹СГТУ имени Гагарина Ю.А.;

²Саратовский филиал Института радиотехники и электроники (СФ ИРЭ) им. В.А.Котельникова РАН;

³Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского;
egorovnm@sstu.ru

В настоящее время устройство, строение и принципы работы головного мозга являются одним из наиболее актуальных направлений современных исследований в области биологических наук и биомедицины. Наиболее полное понимание механизмов работы головного мозга позволит ускорить разработку новых вещей, зависящих от наших знаний об устройстве мозга, например, создание нейроинтерфейсов или нахождение новых эффективных способов борьбы с патологиями мозга. Об изучении патологии далее и пойдёт речь, а конкретно, а моделировании эпилепсии. Эпилепсия является одним из наиболее распространённых заболеваний, которое по большей части является результатом патологических структурно-функциональных связей между корой и глубокими структурами мозга.

Традиционно изучение процессов в биосистемах разделён на несколько этапов, одним из которых является создание моделей. Целью данной работы является реализация радиотехнической модели, связанных в сеть, нейронов с синапсами для моделирования электромагнитной активности мозга во время патологического состояния приступа абсансной эпилепсии. При помощи радиотехнического моделирования можно проверить грубость модельных представлений, таких чувствительность к шумам или достижимость модельного поведения в реальном эксперименте.

Для воспроизведения патологического состояния в виде электромагнитного сигнала была спаяна радиотехническая установка на базе аналоговых компонентов для реализации модели таламо-кортикальной сети головного мозга. В качестве одного узла данной сети была выбрана популярная простая модель возбудимой клетки – осциллятор ФитцХью-Нагумо. За счёт того, что модель обладает низким порядком нелинейности и безразмерными величинами, её удалось относительно несложно реализовать. Архитектура связей между нейронами характеризуется моделью, предложенной ранее в [1]. Клетки разделены на пирамидальные, ретикулярные, таламокортикальные и интернейроны. Все нейроны выполнены подобными друг другу, отличие между типами клеток в том, на какие клетки они могут воздействовать и с какой силой связи. Для реализации тормозной функции синаптической связи линейная связь в модели была заменена на сигмоидную функцию половинного гиперболического тангенса со смещением [2]. Такой тип связи воспроизводит механизм торможения сигнала между клетками через тормозные связи и при этом продолжает оказывать возбуждающее воздействие на нейроны, связанные возбуждающей связью. Согласно современным представлениям инициации эпилептического воздействия на внешний триггер, в сеть также введён модельный нейрон, подобный остальным, за тем отличием, что он настроен на автоколебательный режим, то есть представляет собой внешнее воздействие от трюничного воздействия.

Таким образом, в данной работе была реализована радиотехническая модель таламо-кортикальной сети головного мозга крысы в патологическом состоянии приступа абсансной эпилепсии. Между собой нейроны соединены по определённым правилам иерархической модели посредством сигмоидной функции, имитирующей свойства синапсов. Сеть состоит из 14 осцилляторов, включая тройничные нервы. Были получены временные реализации, имеющие характерные сходства с реальными данными эпилептических разрядов у крыс.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-72-00015.

Список литературы

[1] Egorov, N. & Ponomarenko, Vladimir & Sysoev, Ilya & Sysoeva, M.. (2021). Simulation of Epileptiform Activity Using Network of Neuron-Like Radio Technical Oscillators. Technical Physics. 66. 505-514. 10.1134/S1063784221030063.

[2] Egorov, Nikita & Sysoev, Ilya & Ponomarenko, Vladimir & Sysoeva, Marina. (2022). Epileptiform activity generation by an ensemble of complete electronic FitzHugh-Nagumo oscillators connected by a sigmoid couplings. 2. 10.1117/12.2623993.

Разработка алгоритма анализа изображений, полученных методом время-разрешенной микроскопии FLIM

Щечкин И.Д.^{1,2*}, Родимова С.А.^{1,2}, Бобров Н.В.^{1,3}, Можеров А.М.^{1,2}, Кузнецова Д.С.^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий,
Приволжский исследовательский медицинский университет;

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И.
Лобачевского;

³Приволжский Окружной Медицинский Центр ФМБА России;
iliahasa1992@gmail.com

Ключевые слова: время-разрешенная микроскопия, FLIM, машинное обучение, нейронные сети

Введение. Мультифотонная время-разрешенная микроскопия FLIM представляет собой метод исследования, основанный на анализе времени жизни флуоресценции эндогенных флуорофоров, в частности никотинамидадениндинуклеотида (НАД(Ф)Н). Для описания затухания флуоресценции НАД(Ф)Н обычно используется двухэкспоненциальная модель, где t_1 и t_2 соответствуют временам жизни свободной и связанной форм НАД(Ф)Н соответственно. Относительные амплитуды a_1 и a_2 в этом случае представляют собой вклады времен жизни, свободной и связанной форм кофермента соответственно. Так же используется трехэкспоненциальная модель, дополнительно включающая в себя фосфорилированную форму НАДФН, которой соответствуют параметры t_3 и a_3 . Известно, что кривая затухания флуоресценции НАД(Ф)Н может служить индикатором метаболических изменений. Так, увеличение доли свободного НАД(Ф)Н (a_1) коррелирует с усилением анаэробного гликолиза, а увеличение вклада связанной формы (a_2) может быть связано с переходом к окислительному фосфорилированию. Увеличение вклада фосфорилированной формы (a_3), в свою очередь, соответствует активизации синтетической функции ткани. Данный метод широко применяется для изучения клеточного метаболизма биологических тканей. Однако, к настоящему времени не существует установленного подхода к анализу данных, полученных методом FLIM. Существующие автоматизированные методы вычислительного анализа, использующие машинное обучение, способны извлекать большее количество данных из полученных изображений по сравнению с традиционными методами анализа. Один из новых подходов заключается в применении методов машинного обучения к изображениям, полученным с помощью мультифотонной микроскопии FLIM с целью объективизации полученных результатов и получении большего количества информации о структурно-функциональном состоянии биологических тканей.

Цель работы: разработать алгоритм на основе методов машинного обучения, способный автоматически определять характеристики флуоресценции (t_1 , t_2 , t_3 , a_1 , a_2 , a_3) ткани печени на основе FLIM изображений.

Материалы и методы. Для получения FLIM изображений была выбрана модель регенерации печени. С целью запуска регенераторного процесса проводили хирургическую резекцию печени на 18 крысах линии Wistar с удалением разного объема (30 и 70% массы) печени. На 7 день после резекции, печень забирали и проводили визуализацию *ex vivo* образцов методом FLIM. В целом, пул изображений включал: контроль (образцы печени перед резекцией) в количестве 80 изображений; образцы печени при 30% резекции на 7 сутки после запуска регенерации в количестве 11 изображений; образцы печени при 70% резекции на 7 сутки в количестве 17 изображений. На изображениях в программе ImageJ (Fiji) размечали границы клеток для последующего обучения нейронной сети. После чего изображения были аугментированы для увеличения количества обучающего материала.

Результаты. С помощью полученного пула FLIM изображений была обучена нейронная сеть на основе Unet++ с мультикомпонентной функцией потерь, состоящей из BSA, Focal и Dice функций. Нейронную сеть обучили определять границы клеток, точность предсказаний составила 80%. Предсказанные результаты были использованы для Instance сегментации с последующим расчетом кинетик полученных ROI, соответствующих цитоплазме клеток, на основе восстановленных функций по предоставленным для SPImage мануалам.

Заключение. Таким образом, был разработан алгоритм, способный с высокой точностью определять границы клеток, выделять их на FLIM-изображении и рассчитывать соответствующие им параметры флуоресценции: времена жизни компонент (t_1 , t_2 , t_3) и их вклады (a_1 , a_2 , a_3).

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-15-00263).

Разработка пациент-специфичной методики корректировки абляции

Бережной А.К.^{1,2,3*}, Слотвицкий М.М.^{1,2,3}, Сергеева Т.О.^{1,3}, Цвеляя В.А.^{1,2,3}, Калинин А.И.^{1,3}, Агладзе К.И.¹

¹Московский физико-технический институт;

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского;

³альметьевский государственный нефтяной институт;
[bereznoi.ak@phystech.edu](mailto:berezhnoi.ak@phystech.edu)

Сердечно-сосудистые заболевания – группа заболеваний сердца и сосудов, в которую входят ишемическая болезнь сердца, сердечная недостаточность и другие патологии. Эта группа заболеваний является одной из самых частых причин смерти среди населения развитых стран. Одним из наиболее распространенных заболеваний сердечно-сосудистой системы является персистирующая форма мерцательной аритмии (фбрилляция предсердий)- нарушения сердечного ритма, которое может привести к развитию сердечной недостаточности и внезапной сердечной смерти.

Основной методикой лечения этого заболевания является хирургическая абляция - создания очагов фиброза, предотвращающих развитию аритмии (вращение спиральной волны). К сожалению, более половины пациентов возвращаются для повторной абляции, известны случаи проведения до 10 операций.

В данной работе описано создание системы помощи врачу при хирургических абляциях, позволяющей повысить эффективность процедуры. Система основана на рассмотрении гистологического анализа морфологии ткани предсердий и МРТ/КТ-исследований.

Ключевыми идеями данной работы являются влияние клеточной морфологии на динамику волн в ткани, а также роль фиброза в возникновении и развитии спиральных реэнтри-волн (фиброз выступает субстратом для их возникновения).

На заключительном этапе разработки система будет создавать индивидуальную для пациента модель сердечной ткани, с помощью которой хирург сможет протестировать различные протоколы абляции для уменьшения количества рецидивов.

Важной особенностью системы по сравнению с существующими аналогами является учет разных типов фиброза (как инфарктных шрамов, так и разной степени диффузного).

Разработка подходов к моделированию скольжения ДНК в нуклеосоме методом полноатомной МД

Князева А.С.^{1*}, Армеев Г.А.¹, Шайтан А.К.¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова ;
kniazeva.anastasiia.2015@post.bio.msu.ru

ДНК в клетках существует в комплексе с белками в виде хроматина. На нижнем уровне организации хроматин представляет собой последовательность нуклеосом - белковых дисков, вокруг которых ДНК образует два неполных витка. Нуклеосомы, как и хроматин в целом, являются динамическими структурами. В зависимости от последовательности ДНК наблюдается разное равновесное состояние скрученности ДНК в супервитке нуклеосомы (145, 146 или 147 пар нуклеотидов входят в ее состав). ДНК в нуклеосомах может частично откручиваться, формировать дефекты кручения (петли) и скользить относительно белкового кора нуклеосомы. Скольжение ДНК внутри нуклеосомы является принятым на данный момент способом перемещения нуклеосом в хроматине, показана подвижность нуклеосом на ДНК экспериментально [1,2]. Методом криоэлектронной микрокопии проводилось исследование АТФ-зависимого скольжения ДНК в нуклеосоме, осуществляемое ремоделерами [3]. В этих работах были получены структуры нуклеосом на разных этапах цикла работы ремоделера с помощью негидролизующих аналогов АТФ, что позволило показать наличие связи между перестройками ДНК и белкового кора нуклеосомы (представленного в виде октамера белков-гистонов). Также проводились работы по численному моделированию динамики скольжения ДНК в нуклеосомах в огрубленном представлении [4]. Но такое представление не дает динамической картины процесса в атомистическом масштабе и не позволяет исследовать связь динамических мод внутри нуклеосомы. Скольжение ДНК относится к микро-/миллисекундной динамике нуклеосом, и в настоящее время не доступен для прямого моделирования методом классической молекулярной динамики (МД). Ранее в нашей работе [5] видели сдвиг ДНК на одну пару нуклеотидов близко выходу нуклеосомы (в сайте SSHL 5) - только в одной из ряда

микросекундных траекторий. Сейчас стоит задача моделирования скольжения ДНК в МД с использованием эвристик и усиленных методов.

В работе мы использовали три подхода. В первую очередь были проведены расчеты классической МД нуклеосом, в которых уже имелись крупные дефекты кручения ДНК во внутреннем сайте нуклеосомы (SHL 2). Такое состояние было открыто для нуклеосомы в комплексе с ремоделером Snf2 (PDB ID 5Z3L). Наблюдалась ожидаемая релаксация дефекта кручения в сторону ближайшего выхода из нуклеосомы. Это движение сопровождалось перестройкой ДНК-белковых контактов; ключевые контакты гистонов сместились на одну пару нуклеотидов и перешли на соседнюю цепь ДНК. Таким образом, скольжение в данном эксперименте проходило согласно принятой модели штопорообразного механизма. Последующие расчеты проводились методами усиленной МД с применением внешних потенциалов на кристаллических структурах нуклеосом без дефектов кручения ДНК (PDB ID 3LZ0). В частности, проводилось силовое формирование дефекта кручения ДНК в сайте нуклеосомы SHL 5 с помощью наложения гармонического потенциала на коллективную переменную, описывающую кручение. Во втором подходе провиделось “раскачивание” диадной области нуклеосомы методом метадинамики. В обоих случаях были зафиксированы сдвиги цепей ДНК внутри нуклеосомы. Интересным наблюдением оказалось то, что нуклеосомы показали устойчивость к такому внешнему воздействию и увиденные малые сдвиги не вызывали откручивания ДНК. Отметим, что откручивание ДНК происходит спонтанно в микросекундном масштабе времен и показана в классических МД экспериментах. Дальнейшая работа предполагает как дальнейшее развитие методов задания коллективных переменных, описывающих состояния кручения ДНК, так и разработке протоколов моделирования, т.к. классический подход плохо воспроизводит динамические переходы между разными формами ДНК, стабилизируя В-форму.

Таким образом, на данный момент еще не удалось смоделировать полный цикл скольжения ДНК по нуклеосоме, однако были получены динамические модели локального скольжения ДНК в нуклеосоме. Работа поддержана грантом РНФ № 18-74-10006. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

Список используемой литературы:

1. Becker, P.B. Nucleosome Sliding: Facts and Fiction. *EMBO J.* 2002, 21, 4749–4753, doi:10.1093/emboj/cdf486.
2. Nodelman, I.M.; Bowman, G.D. Biophysics of Chromatin Remodeling. *Annu. Rev. Biophys.* 2021, 50, 73–93, doi:10.1146/annurev-biophys-082520-080201.
3. Bilokapic, S.; Strauss, M.; Halic, M. Structural Rearrangements of the Histone Octamer Translocate DNA. *Nat. Commun.* 2018, 9, doi:10.1038/s41467-018-03677-z.
4. Brandani, G.B.; Niina, T.; Tan, C.; Takada, S. DNA Sliding in Nucleosomes via Twist Defect Propagation Revealed by Molecular Simulations. *Nucleic Acids Res.* 2018, 46, 2788–2801, doi:10.1093/nar/gky158.
5. Armeev, G.A.; Kniazeva, A.S.; Komarova, G.A.; Kirpichnikov, M.P.; Shaytan, A.K. Histone Dynamics Mediate DNA Unwrapping and Sliding in Nucleosomes. *Nat. Commun.* 2021, 12, doi:10.1038/s41467-021-22636-9.

Распределение значений GC-состава фрагментов в пространственной структуре геномов хлоропластов, бактерий и митохондрий

Сенашова М.Ю.^{1*}, Садовский М.Г.¹

¹ИВМ СО РАН;

msen@icm.krasn.ru

Введение

Изучение особенностей и деталей структуры нуклеотидных последовательностей является важнейшей задачей биологии в настоящее время. Выявление связи между структурными компонентами и соответствующим им функциями представляет собой классическую проблему молекулярной и системной биологии и, несмотря на обширный поток публикаций и исследований в этом направлении, она всё ещё далека от завершения.

-состав геномов как в целом, так и отдельных участков очень часто используется в исследованиях структуры и функций геномов. Этому вопросу посвящено много работ, как в случае геномов хлоропластов [1-2] и митохондрий [3-4], так и бактерий [5-6]. В данной работе мы рассматриваем, как распределяются значения GC-состава выделенных фрагментов этих геномов в пространственной структуре генома, полученной на основе частотных словарей фрагментов.

Материалы и методы.

Рассматривается генетическая последовательность длины L , состоящая из символов алфавита $\{A, C, G, T\}$. Эта последовательность делится на подпоследовательности длины d . Для каждой из подпоследовательностей

составляются частотные словари W толщины 3. Под частотным словарем толщины 3 подразумевается список всех троек $w=v_1v_2v_3$ идущих подряд нуклеотидов, с указанием частот этих троек. Частота fw — это отношение числа копий nw данного слова к общему числу всех триплетов N , где N — сумма всех nw : $fw=nw/N$.

Словарь W задает отображение генома в 64-мерное метрическое пространство. Для построения частотных словарей триплетов последовательность каждого генома сканировалась окном длины d с шагом t . Для каждого положения i окна определялся участок генетической последовательности, совпадающий с рамкой считывания, для которого вычислялся частотный словарь W_i , соответствующий i -ой точке в 64-мерном пространстве.

Для исследования были использованы данные, содержащиеся в открытом до-ступе в базе EMBL-банка. Визуализация полученных данных проводилась программой VidaExpert, которая проецирует точки многомерного пространства в пространство первых трех главных компонент. В ходе работы анализировался вид полученных проекций в этом пространстве.

Пространственная структура величины GC-состава фрагментов геномов хлоропластов, бактерий и митохондрий.

Было рассмотрено 570 геномов хлоропластов, 280 геномов бактерий и 488 геномов митохондрий из базы EMBL. Для всех геномов интервал имеющихся значений GC-состава разбивался на 7 подинтервалов равной длины. Интервалу с минимальными значениями соответствует фиолетовый цвет, с максимальными — красный. Было обнаружено, что распределение величины GC-состава фрагментов геномов хлоропластов по пространственной структуре однотипно. GC-состав фрагментов распределен по градиенту вдоль оси симметрии пространственной структуры генома.

Для GC-бедных геномов бактерий (значение GC-состава меньше 50%) характерно центрально-симметричное распределение значений. При центрально-симметричном распределении минимальные значения преимущественно располагаются в центре структуры, а максимальные по краям. Для GC-богатых геномов наблюдается градиентное распределение значений.

Геномы митохондрий наземных растений, печеночных мхов, одноклеточных водорослей, обычных мхов и высших грибов имеют ярко выраженное градиентное распределение значений GC-состава. Многоклеточные водоросли, лишайники и низшие грибы также имеют градиентное распределение, но оно не так явно выражено. Для геномов митохондрий насекомых, паукообразных и ракообразных характерно центрально-симметричное распределение значений GC-состава. У геномов губок, моллюсков, плоских, кольчатых и круглых червей встречаются распределения значений GC-состава в виде неявного градиентного распределения и центрально-симметричного. Для позвоночных животных не удалось выявить какую-либо типичную картину распределения GC-состава фрагментов внутри классов и между классами.

Было обнаружено, что все выявленные распределения GC-состава фрагментов геномов являются устойчивыми относительно различной длины окна.

Выводы.

Результаты, описанные выше, показывают, что существует упорядоченность в распределении значений GC-состава фрагментов различных геномов. Причем эта упорядоченность имеет типичный вид для отдельных групп геномов. Наибольшим разнообразием в типах распределений GC-состава фрагментов обладают геномы митохондрий.

Список литературы

1. Qian J. et al. The complete chloroplast genome sequence of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* //PloS One. – 2013. – Т. 8. – №. 2. – С. e57607.
2. Yang Y. et al. Comparative analysis of the complete chloroplast genomes of five *Quercus* species //Frontiers in plant science. – 2016. – Т. 7. – С. 959.
3. Johnston I. G., Williams B. P. Evolutionary inference across eukaryotes identifies species-specific pressures favoring mitochondrial gene retention // Cell systems. – 2016. – Т. 2. – №. 2. – С. 101-111.
4. Wei L. et al. Analysis of codon usage bias of mitochondrial genome in *Bombyx mori* and its relation to evolution //BMC evolutionary biology. – 2014. – Т. 14. – №. 1. – С. 262.
5. Peano C. et al. An efficient rRNA removal method for RNA sequencing in GC-rich bacteria //Microbial informatics and experimentation. – 2013. – Т. 3. – №. 1. – С. 1.
6. Zhou H. Q. et al. Analysis of the relationship between genomic GC content and patterns of base usage, codon usage and amino acid usage in prokaryotes: similar GC content adopts similar compositional frequencies regardless of the phylogenetic lineages //PloS one. – 2014. – Т. 9. – №. 9. – С. e107319.

Распределенная агентная модель фотосинтетического транспорта электронов

Хрущев С.С.^{1*}, Плюснина Т.Ю.¹, Ризниченко Г.Ю.¹, Рубин А.Б.¹

¹МГУ, биологический факультет;

styx@biophys.msu.ru

Рассматривается агентная математическая модель, позволяющая воспроизвести динамику редокс-превращений компонентов фотосинтетической электрон-транспортной цепи с явным учетом диффузии подвижных переносчиков электрона в сложном интерьере внутривнутрихлоропластного пространства. Геометрия гранальных и стромальных тилакоидов задается аналитически на основе современных представлений о пространственной организации тилакоидных мембран. В модели рассматривается грана, состоящая из нескольких (от 2 до нескольких десятков) цилиндрических тилакоидов, и соединяющиеся с ней стромальные ламеллы. Предполагается, что состоящая из сближенных цилиндрических тилакоидов грана «пронзает» стромальные ламеллы, при этом в области контакта формируются переходные спиральные структуры. Размеры и форма компартментов задаются в виде числовых параметров модели. Модель является дискретной по времени и пространству. Пространство внутри хлоропласта разбивается на ромбодекаэдрические ячейки объемом 2 куб. нм, используются тороидальные (периодические) граничные условия.

В модели рассматриваются окислительно-восстановительные реакции, происходящие с участием агентов – трансмембранных белковых комплексов (фотосистем 1 и 2 и цитохромного b6f комплекса) и мобильных переносчиков электрона – пластохинона, пластоцианина и ферредоксина. Для представления молекулы пластохинона используется одна ячейка модели; белковые молекулы занимают несколько соседних ячеек, их форма задается по данным рентгеноструктурного анализа или криоэлектронной микроскопии, а угол поворота определяется случайным образом при запуске модели. Все агенты в модели рассматриваются как подвижные, для трансмембранных белковых комплексов доступна латеральная диффузия в плоскости мембраны, для мобильных переносчиков – трехмерная диффузия в пределах соответствующего компартмента (липидного слоя мембраны для пластохинона, люмена тилакоида для пластоцианина и стромы для ферредоксина). За один шаг модели (2 мкс) агент может сместиться на одну ячейку в любом направлении, для каждого типа агентов задается вероятность смещения за один шаг модели. Для подвижных переносчиков вероятность смещения была подобрана таким образом, чтобы наблюдаемые в модели коэффициенты диффузии соответствовали экспериментально измеренным.

Каждый из агентов модели может находиться в одном из нескольких редокс-состояний. То, каким образом происходят переходы между состояниями агентов, определяется заданной для каждого типа агентов программой, таким образом, можно легко изменять степень детализации процессов, происходящих в каждом из агентов, независимо от других агентов. Одна или несколько ячеек вблизи поверхности трансмембранных комплексов задаются как активные сайты, попадание в которые подвижных переносчиков электрона приводит к запуску программы, анализирующей это взаимодействие. Рассмотрена максимально упрощенная система, в которой все процессы электронного транспорта между трансмембранными комплексами моделировались как необратимые диффузионно-контролируемые. Если на текущем шаге модели в сайте взаимодействия оказывается молекула агента – реакционного партнера, и редокс-состояния двух агентов допускают обмен электронами между ними, то происходит соответствующее изменение состояний этих агентов. Кроме того, в комплексах могут происходить спонтанные реакции, соответствующие светоиндуцированному разделению зарядов в фотосистемах и переносу электронов между входящими в состав комплекса переносчиками.

С помощью разработанной модели было исследовано влияние геометрических параметров грани на переходные окислительно-восстановительные процессы, происходящие при освещении адаптированных к темноте листьев. Несмотря на простоту, такая модель позволила воспроизвести основные особенности наблюдаемых в экспериментах кривых при использовании небольшого числа настраиваемых параметров.

Модель реализована в виде программы на языке программирования Python. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 20-04-00465 и РНФ 22-11-00009.

Реконструкция генных цепей, ассоциированных с сахарным диабетом второго типа с помощью онлайн инструментов биоинформатики

Захаров Д.В.^{1*}, Орлов Ю.Л.¹

¹Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);
exsterol@gmail.com

Эпидемия сахарного диабета (СД) представляет вызов системе здравоохранения в мире. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 1980 году на планете было около 150 миллионов человек, страдающих от СД, а в 2014 году — около 421 миллионов. К несчастью, положительная динамика заболеваемости за последние десятилетия не наблюдается, и уже сегодня можно сказать, что сахарный диабет является одним из самых распространённых и тяжёлых заболеваний. Сахарный диабет II типа (Type 2 diabetes) — хроническое неинфекционное, эндокринное заболевание, которое проявляется глубокими нарушениями липидного, белкового и углеводного обменов, связанного с абсолютным или же относительным дефицитом гормона, производимого поджелудочной железой. У пациентов с данным заболеванием поджелудочная железа продуцирует достаточное количество инсулина — гормона, регулирующего углеводный обмен в организме. Однако из-за нарушения метаболических реакций в ответ на действие инсулина возникает дефицит этого гормона. Поставлена задача сбора списка генов, ассоциированных с диабетом, реконструкции генной сети и разработки компьютерной модели заболевания.

Генетическая предрасположенность к развитию сахарного диабета II типа обеспечивается набором генов, контролирующих чувствительность периферических тканей к инсулину и отвечающих, таким образом, за состояние инсулиновой резистентности, которая является первичной, приводя к необходимости повышенной секреции инсулина β -клетками островка поджелудочной железы и способствуя истощению их функциональной активности.

В последние годы собрано немало молекулярных данных, раскрывающих патогенетические механизмы развития СД и его осложнений. Описано более 100 генов, ассоциированных с риском развития этого заболевания, и продуктов, которые влияют на секрецию инсулина, адипогенез, инсулинорезистентность, однако для большинства генов точечные молекулярные механизмы участия в патогенезе СД2, окончательно не установлены.

Анализ молекулярно-генетических сетей позволяет выявить молекулярные взаимодействия, важные для развития СД и его осложнений. С помощью онлайн инструментов биоинформатики собран список генов, ассоциированных с диабетом и реконструирована генная сеть взаимодействий макромолекул.

Для этого были использованы такие базы данных, как OMIM (<https://omim.org/>) и GeneCards (<https://www.genecards.org/>). При анализе взаимодействий продуктов этих генов использовались такие ресурсы по реконструкции генных сетей, как STRING-DB (<https://string-db.org/>), Metascape (<https://metascape.org/>), GeneMANIA (<https://genemania.org/>). Для анализа категорий генных онтологий использовались ресурсы DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>). Интеллектуальный анализ данных и текстов научных публикаций открывает новые возможности для обработки этой информации.

Решение задачи расчета показателей стрейна в эхокардиографии с использованием нейронных сетей глубокого обучения

Алехина А.Е.^{1,2}, Доррер М.Д.^{1*}, Садовский М.Г.^{3,4,5}, Сакович В.В.⁵, Демичев И.А.⁵

¹СибГУ им. М.Ф. Решетнева;

²Сибирский федеральный университет;

³Институт вычислительного моделирования СО РАН;

⁴Федеральный сибирский научно-клинический центр ФМБА РФ;

⁵КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого;

mdorrrer@mail.ru

В работе ставится задача расчета параметров деформации сердечной мышцы по данным эхокардиограммы в условиях помех, например, при исследовании детей.

Показатели деформации (величина стрейна) сердечной мышцы использовались нами для определения наличия и выраженности дисфункции камер сердца при дефекте межпредсердной перегородки — врожденного порока сердца, характеризующегося наличием сообщения между правым и левым предсердиями.

Задача решалась при помощи анализа видеопотока, полученного с установки ЭхоКГ при помощи набора архитектур нейронных сетей глубокого обучения, предназначенных для сегментации изображений. Исследование проводилось для архитектуры U-net. Исходные данные для обучения готовились на базе изображений реальных видеозаписей эхокардиограмм, прошедших предобработку медианными фильтрами, методом вычитания гауссовских фильтров, а также путем бинаризации изображения с помощью фильтра Оцу. В результате обработки видеопотока удалось решить задачу сегментации стенок сердечной мышцы и привязки ключевых точек в условии помех в снятии эхокардиограммы на пациентах-детях, не способных сохранять неподвижность в ходе исследования. Динамика расстояния между ключевыми точками на сердечной мышце в последовательности кадров ЭхоКГ позволяет выполнить расчет показателей стрейна.

Полученные показатели предоставляют кардиологу важную информацию для определения дисфункции камер сердца (особенно, правого предсердия- наиболее скомпрометированной в исследуемых случаях камеры сердца) при дефекте межпредсердной перегородки. Точная диагностика степени дисфункции миокарда при данной аномалии позволит более точно определить показания и сроки хирургической коррекции.

Роль глутаматного переносчика в формировании эксайтотоксичности при избыточном содержании медиатора в конвекционной реакции-диффузии глутамата

Загубная О.А.^{1,2*}, Нарциссов Я.Р.^{1,2}

¹*НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, Россия;*

²*Группа биомедицинских исследований, БиДиФарма ГмбХ, Зик, Германия;*
oz_brg@icmph.org

Математическое моделирование диффузии любой биологически значимой молекулы в нервной ткани является чрезвычайно сложной задачей. Многие факторы ограничивают диффузию глутаминовой кислоты в паренхиме мозга *in vivo*. Среди этих факторов – физико-химические свойства среды и самой молекулы нейромедиатора а также многочисленные вовлеченные в процесс глутаматэргической нейротрансмиссии белки (рецепторы и переносчики). Известно, что нарушение глутаматэргической нейротрансмиссии играет важную роль в процессе дегенерации нервной ткани. При этом отмечается нарушение способности астроцитов производить обратный захват нейромедиатора в ответ на повышение его количества в синаптической щели, что является ключевым моментом индуцированной глутаматом эксайтотоксичности. Такое нарушение считается общей чертой многих нейродегенеративных заболеваний, черепно-мозговых травм и апоптоза нейронов.

В общем случае симуляция такой диффузии производится внутри сферически ограниченного синаптического пространства. В данной работе был реконструирован фантом нервной ткани, содержащий домен с единичным синаптическим контактом. Данный домен состоит из пре- и постсинаптических нервных окончаний, области синаптической щели, окружающих синаптический контакт отростков астроцитов и ограниченного плазматическими мембранами нейронов и астроцитов пространства. Свободное пространство между областью синаптического контакта и мембранами нервных клеток позволяет производить количественную оценку как ламинарного течения межклеточной жидкости, так и конвекционную диффузию медиатора в межклеточном пространстве ткани. Симуляция конвекционной реакции-диффузии глутамата была проведена с использованием метода конечных элементов в COMSOL Multiphysics. Областью моделирования являлась внутренняя полость синаптической щели и смежное с ней межклеточное пространство. При моделировании учитывались различное количество и пространственное расположение глутаматных переносчиков (Excitatory amino acid transporters, EAATs), включенные в компьютерную реконструкцию фантома нервной ткани в явном виде. Достаточное количество переносчиков EAAT в общем случае позволяет избежать эксайтотоксичности и поддерживать межсинаптические взаимодействия. Результаты текущей работы позволяют утверждать, что плотность пространственного расположения глутаматных переносчиков по отношению к синаптической щели так же оказывает существенное влияние на формирование токсических последствий избыточного количества глутамата.

Сетевая динамическая модель таламо-кортикальной активности мозга во сне, при бодрствовании и абсансных разрядах

Сысоева М.В.^{1*}, Долинина А.Ю.^{1,2}, Сысоев И.В.²

¹СГТУ имени Гагарина Ю.А.;

²СГУ имени Н.Г. Чернышевского;

bobrichkek@mail.ru

В данной работе рассматривается проблема математического моделирования трех типов экспериментально наблюдаемой мозговой активности; в частности, эпилептиформной активности (спайк-волновые разряды), пассивного бодрствования (регулярный альфа-ритм), медленноволнового сна (хаотическая многочастотная активность). Изучена упрощенная математическая модель таламокортикальной сети мозга в виде ансамбля осцилляторов ФитцХью-Нагумо, способная демонстрировать все три желаемых поведения при неизменных параметрах отдельных элементов сети и неизменной архитектуре сети, но с минимальными изменениями в силе связи между этими элементами. Эти процессы анализируются, группируются и сравниваются с экспериментальными локальными потенциалами мозга.

Основной подход к моделированию, предлагаемый в данной работе, состоит в генерации по морфологически [1] и физиологически [2] обоснованным правилам матриц связей, с использованием которых строятся модели в виде ансамблей модельных нейронов. При генерации задаётся набор правил, по которым связи могут появляться (например, связи между таламокортикальными нейронами запрещены). Для разрешённых связей возможны два подхода. Один состоит в том, что задаются (эмпирически подбираются) вероятности связей и затем генерируются матрицы со случайными связями [3, 4]. Другой подход состоит в наложении дополнительных ограничений, например, на общее число связей или связей внутри отдельной структуры, запрет несвязанных или односторонне связанных нейронов, поскольку они не участвуют в динамике сети [5, 6]. Таким образом общее число возможных вариантов существенно сокращается и возможен становится более полный анализ: перебор большого, но обозримого числа матриц связи из некоторого класса вместо их случайной генерации. В данной работе будет использоваться первый подход.

Для моделирования всех трёх исследуемых состояний мозга генерировались матрицы с одинаковой архитектурой связей, отличалась только сила связи для некоторых пар структур. Генерировалось множество матриц связанности и отбирались только те, которые одновременно удовлетворяли следующим условиям. 1) Для моделирования эпилептического пик-волнового разряда разрешённые связи устанавливали $k_{SWD} = 0.18$, в том числе и с нейрона внешнего входа, далее подавали внешнее воздействие и отбирали те матрицы, которые до внешнего стимула находились в неколебательном режиме, а после окончания воздействия демонстрировали остаточные колебания. 2) Для моделирования пассивного бодрствования использовались уже только эти отобранные матрицы, но все связи увеличивали на 10% по сравнению с k_{SWD} , при этом никакого внешнего стимула не подавалось, сеть просто сама из-за большей силы связи начинала колебаться. 3) Для моделирования медленного сна опять брались те же матрицы, чтобы были отобраны для пик-волновых разрядов, но теперь сила связи с ретикулярных клеток на таламокортикальные была увеличена на 10%, а связи ретикулярных клеток друг на друга уменьшены на 10% по сравнению с аналогичными взаимодействиями для пик-волновых разрядов; сеть колебалась без внешнего стимула. Было найдено десять различных 28-элементных матриц и десять различных 280-элементной матриц. Они отличались архитектурой связи за счёт случайной генерации вероятности возникновения этих связей. Таким образом была проверена структурная устойчивость наблюдаемых режимов к малым вариациям матрицы связей, что важно, поскольку в мозге связи непрерывно перестраиваются в процессе жизни, причём небольшие перестроения не влияют качественно на поведение. От каждой матрицы было получено по одному набору состояний SWD, PW и SWS.

В данной работе показано, что в моделях с одной и той же матрицей связанности возможно реализовать различные типы вибрационной активности, наблюдаемые экспериментально и соответствующие эпилепсии, пассивному бодрствованию и сну. При этом один режим соответствует динамике на аттракторе, другой – длительным переходным процессам. Показано, что существует класс (множество) таких матриц связанности, в то время как временные ряды, полученные из моделей, использующих их, качественно схожи, но отличаются в деталях, как мозговая активность разных животных из одной и той же генетической линии.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 21-72-00015.

1. G. Paxinos, C. Watson, The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6th Edition, San Diego: Academic Press, 2006.

2. P. Suffczynski, S. Kalitzin, F. L. D. Silva, Dynamics of non-convulsive epileptic phenomena modeled by a bistable neuronal network, Neuroscience 126 (2) (2004) 467–484.

3. T.M. Medvedeva, M.V. Sysoeva, G. van Luijtelaa, I.V. Sysoev, Modeling spike-wave discharges by a complex network of neuronal oscillators, Neural Networks 98 (2018) 271–282.

4. T.M. Medvedeva, M.V. Sysoeva, A.Luttjohann, G. van Lijstelaar, I.V. Sysoev, Dynamical mesoscale model of absence seizures in genetic models, PLoS ONE 15 (9) (2020) e239125.

5. A.A. Kapustnikov, M.V. Sysoeva, I.V. Sysoev, Modeling spike-wave discharges in the brain with small neurooscillator networks, Mathematical Biology and Bioinformatics 16 (2020) 139–146.

6. A.A. Kapustnikov, M.V. Sysoeva, I.V. Sysoev, Transient dynamics in a class of mathematical models of epileptic seizures, Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation 109 (2022) 106284.

Скрытые симметрии белковых вирусных оболочек

Рошаль С.Б.^{1*}, Коневцова О.В.¹, Голушко И.Ю.¹, Подгорник Р.²

¹Южный Федеральный Университет;

²Университет Китайской академии наук;

rochal_s@yahoo.fr

Вирусы занимают пограничную область между живой и неживой материей, и на определенных этапах своего жизненного цикла им для размножения требуются материал и клеточные механизмы клетки-хозяина, используемой для репликации вирусного генома и производства белков вирусной оболочки (капсида). Самосборка новых вирусов – многостадийный, многочасовой процесс, некоторые этапы которого контролируются исключительно физическими и химическими законами. Для многих вирусов финальная стадия сборки включает структурные переходы и/или морфологические изменения. Только после завершения всех стадий этого процесса, называемого созреванием, образующийся вирион становится способным инфицировать клетки организма-хозяина. Поэтому понимание принципов самосборки и структурных превращений капсида во время созревания очень важно для разработки противовирусных стратегий.

Белки, кодируемые относительно простым вирусным геномом, не могут быть слишком сложными и характеризуются минимальным количеством конформационных состояний и типов связей со своими ближайшими соседями. Однако неограниченное количество кристаллографически эквивалентных позиций существует только в бесконечных периодических структурах. В любой конечной оболочке это число ограничено и для идентичных асимметричных белков в случае икосаэдрических капсидов равно 60, что является порядком группы симметрии капсида I. Поэтому даже окружения структурно эквивалентных белков, находящихся в разных кристаллографических позициях, не могут быть в точности одинаковыми. Такие белки, не имея геометрически возможности занимать эквивалентные кристаллографические позиции, стремятся располагаться в квазиэквивалентных позициях с примерно одинаковым локальным окружением. Этот принцип квазиэквивалентности был сформулирован Каспаром и Клугом (КК) [1] и позволил им в рамках широко известной геометрической модели описать структуру многих икосаэдрических капсидов, состоящих из пентамеров и гексамеров. Подчеркнем, что в силу принципа квазиэквивалентности большинство капсидов обладают специфической статической скрытой (приближенной) симметрией и характеризуются локальным периодическим порядком.

В модели КК этот локальный периодический порядок образуют центры пентамеров и гексамеров. Как мы показали в работах [2-5], в аномальных (не соответствующих модели КК) капсидах локально-периодический порядок могут образовывать центры масс отдельных белков или других симметричных структурных единиц, например тримеров. На основе теории икосаэдрических сферических решеток (геодезических полиэдров), которые представляют собой гладкие отображения периодического гексагонального порядка на сферу через развертку икосаэдра, мы рассматриваем особенности такого локально-периодического порядка в аномальных капсидах. Заметим, что после отображения гексагонального порядка на сферу, его позиции, не попавшие на оси симметрии икосаэдра, теряют локальную симметрию, что позволяет располагать в этих позициях асимметричные структурные единицы, или структурные единицы с ‘неподходящей’ локальной симметрией. В докладе рассматриваются примеры малых и гигантских вирусных оболочек, устроенных подобным образом.

Наряду со статической скрытой симметрией, вирусные оболочки могут также обладать динамической скрытой симметрией. У капсидов отсутствует точечная трансляционная симметрия классических кристаллов, поэтому анализ нормальных мод в капсидах оказывается значительно сложнее. В принципе, следуя стандартной процедуре определения нормальных мод, можно рассчитать и диагонализировать динамическую матрицу размерности $3N$, где N — общее количество жестких структурных единиц (СЕ) в капсиде. Однако выбор таких СЕ не вполне однозначен, поскольку белки капсида состоят из доменов, имеющих сложную внутреннюю структуру. Альтернативной методологией является применение континуального подхода. Как мы показываем, в структурах икосаэдрических вирусных оболочек можно заметить следы конденсации определенных фоновых мод, явный вид которых приблизительно соответствует фоновым модам тонкой упругой сферической оболочки. Тот факт, что рассматриваемые моды сохраняют икосаэдрическую симметрию капсида, накладывает

строгие симметричные ограничения на их явный вид. Данные моды, как и обычные сферические гармоники, можно классифицировать по волновым числам l . Интересно, что широко-распространенную икосаэдрическую и относительно редкую додекаэдрическую огранки капсидов можно связать с модами с $l=6$. Также в докладе обсуждаются коллективные сдвиговые смещения протеинов, которые возникают при созревании вирусных оболочек и подобны сдвиговым модам сферической оболочки.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-12-00105).

1. Caspar D. L. D., Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1962. Vol. 27. P. 1

2. Rochal S. B., Konevtsova O. V., Myasnikova A. E., Lorman V. L. Hidden symmetry of small spherical viruses and organization principles in “anomalous” and double-shelled capsid nanoassemblies // Nanoscale. 2016. Vol. 8. P. 16976.

3. Rochal S. B., Konevtsova O. V., Lorman V. L. Static and dynamic hidden symmetries of icosahedral viral capsids // Nanoscale. 2017. Vol. 9. P. 12449.

4. Rochal S. B., Konevtsova O. V., Roshal D. S., Božič A., Golushko I. Y., Podgornik R. Packing and trimer-to-dimer protein reconstruction in icosahedral viral shells with a single type of symmetrical structural unit// Nanoscale Adv. 2022. Vol. 4. P. 4677.

5. Konevtsova O. V., Golushko I. Y., Podgornik R., Rochal S. B., Hidden symmetry of the flavivirus protein shell and pH-controlled reconstruction of the viral surface// Biomater. Sci. 2023. Vol. 11. P. 225.

Сравнительное изучение структуры и таксономии на примере 5 S и 16 S РНК бактерий

Овчинникова Ю.И.^{1*}

¹*Сибирский федеральный университет;*
july.l4o6@mail.ru

Важнейшим предметом исследования молекулярных биологов и биоинформатиков является связь между структурой биологических макромолекул и таксономией носителя. Классическим предметом исследования являются последовательности 16 S РНК, однако не меньший интерес представляет и изучение других последовательностей. В рамках данного исследования мы изучали связь двух структур на примере последовательностей 5 S РНК и 16 S РНК бактерий.

Целью настоящей работы является выявление подобий и различий двух структур, определяемых последовательностями 16S РНК и 5S РНК. Ранее [1] было показано, что триплетный состав генетических систем очень хорошо коррелирует с таксономическим положением носителей соответствующих генов. Однако зачастую видовой состав баз генетических данных (в нашем случае — базы SILVA) весьма смещён. Поэтому проводилось индексирование баз данных: удаление части записей, находящихся в сверхпредставленных группах.

Перейдём к описанию самой работы и результатов. Сравнение структуры и таксономии индексированных баз генов 5 S и 16 S РНК бактерий проводилось с помощью метода упругих карт [3]. Кластеризация генов 5 S РНК бактерий по их частотным словарям триплетов проводилась с помощью свободно распространяемого ПО VidaExpert.

Результатом настоящей работы является установление связи кластеризации генов 5 S и 16 S РНК. Так, возможными исходами являются полностью различные паттерны кластеризации, наблюдаемые на этих двух множествах генов, напротив, заметное их подобие. Ещё одним важным является ответ на вопрос: верно ли, что триплетный состав этих двух групп генов позволяет отличить гены 16 S РНК и 5 S РНК бактерий.

1. Sadovsky M., Putintseva Yu., Chernyshova A., Fedotova V. Genome structure of organelles strongly relates to taxonomy of bearers //International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering.

2. Gorban A., Zinovyev A. Principal Manifolds for Data Visualisation and Dimension Reduction // Lecture Notes in Computational Science and Engineering

Сравнительный анализ действия тяжелых металлов на фотосинтетический аппарат клеток *Chlorella vulgaris*

Червицов Р.Н.^{1*}, Плюснина Т.Ю.¹, Хрущев С.С.¹, Тодоренко Д.А.¹

¹МГУ, биологический факультет;

roman123qwe123@gmail.com

В настоящее время актуален вопрос определения присутствия в водной среде различных токсикантов, таких как ионы тяжелых металлов, поскольку их присутствие вызывает нарушение процессов фотосинтеза и повреждение различных структур в клетках водорослей, что в конечном итоге может приводить к массовой гибели фитопланктона и нарушению баланса водных экосистем. Один из методов, позволяющих определить присутствие тяжелых металлов в среде, связан с измерением кривых индукции флуоресценции хлорофилла а, характеризующих состояние фотосинтетического аппарата клеток тестовых фотосинтетических организмов и изменяющих свою форму при воздействии различных факторов стресса. Из индукционных кривых могут быть рассчитаны параметры ЛПР-теста, характеризующие состояние отдельных элементов фотосинтетического аппарата. При обработке больших массивов таких данных целесообразно применять методы машинного обучения, в частности – алгоритм классификации «случайный лес».

В данной работе в качестве тестового организма использовалась зеленая водоросль *Chlorella vulgaris*. Клетки водорослей инкубировались в течение 60 часов, раз в час измерялась кривая индукции флуоресценции. Токсиканты (CdSO_4 или $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ в концентрации 20 или 50 мкМ) добавлялись на 17 часу инкубации. Из полученных индукционных кривых в программе PyPhotoSyn [1] были рассчитаны по 12 параметров ЛПР-теста, которые и составляли массив данных, анализируемый в данной работе.

На первом этапе была рассмотрена динамика изменения параметров ЛПР-теста с течением времени для проб с токсикантами и при их отсутствии. Выявлено, что действие кадмия в малой концентрации (20 мкМ) проявляется относительно слабо: динамика для большинства параметров близка к контрольной. Действие хрома проявляется при обеих концентрациях. Параметр F_v/F_m , характеризующий эффективность работы фотосистемы II, для контрольных данных приблизительно сохраняет свое значение, равное 0,7, на протяжении всего периода инкубации. Для PI, характеризующего общее состояние фотосинтетического аппарата, наблюдается сначала значительное возрастание, а затем убывание. При действии токсикантов наблюдается ингибирование реакционных центров, что выражается в снижении значений данных параметров, причем при воздействии кадмия оно быстро снижается первые часы после добавления токсиканта, а затем спад замедляется, а для образцов с хромом наблюдается более медленное снижение этих параметров, совпадение значений для кадмия и хрома наблюдается после 20 часов действия токсиканта, когда оно уже выражено достаточно сильно. Параметр ABS/RC характеризует площадь антенного комплекса на реакционный центр, его увеличение обычно связывают с ингибированием реакционных центров фотосистем II. Поскольку при действии кадмия и хрома вызывают ингибирование реакционных центров, значения данных параметров возрастают, причем динамика скорости изменения параметров, выявленная ранее, сохраняется и здесь. Изменения параметра S_m , характеризующего пул окисленных хинонов, обычно связывают с изменениями в фотосинтетическом аппарате за пределами фотосистемы II. При добавлении хрома S_m сначала снижается, а затем практически не изменяется, а при добавлении кадмия наблюдается снижение, после которого – значительный рост, что может быть связано с хлоропластным дыханием, обычно наблюдаемом при стрессе. Таким образом, ионы кадмия и хрома вызывают повреждения в фотосинтетическом аппарате, однако особенности действия ионов этих металлов различаются.

Далее, для данных, полученных в интервале от 17 до 60 часов культивирования, были построены классификаторы по алгоритму случайного леса, где в качестве признаков для классификации использовались параметры ЛПР-теста. Классификатор для определения наличия или отсутствия токсиканта имеет точность 95% (94% при определении контрольных данных и 95% при определении данных для проб с токсикантом). Классификатор для определения вида токсиканта (кадмий или хром) имеет точность 93%; наибольшая точность выявлена при определении контрольных данных (96%), и данных с хромом (95%), для кадмия точность ниже (87%). Наиболее значимым для классификации из параметров ЛПР-теста является параметр F_v/F_m – квантовый выход первичной фотохимии, характеризующий эффективность работы фотосистемы II.

Таким образом, при действии ионов кадмия и хрома наблюдается ингибирование реакционных центров фотосистем II, что выражается в снижении значений F_v/F_m и увеличении ABS/RC, причем токсическое действие для кадмия проявляется раньше, чем для хрома. Классификатор, построенный с использованием полученных данных, позволяет определять наличие и вид токсиканта с высокой точностью. Данные методы анализа данных имеют перспективы применения для оценки состояния естественных местообитаний.

Литература:

1. Antal T., Konyukhov I., Volgusheva A., Plyusnina T., Khrushev S., Kukarskikh G., Goryachev S., Rubin A. Chlorophyll fluorescence induction and relaxation system for the continuous monitoring of photosynthetic capacity in photobioreactors. *Physiologia Plantarum*. 2018. DOI: 10.1111/ppl.12693

Статистические оценки кластеризации сайтов связывания транскрипционных факторов в геномах растений

Дергилев А.И.^{1,2*}, Иванисенко В.А.², Орлов Ю.Л.^{2,3}, Чен М.⁴

¹Новосибирский государственный университет;

²Институт цитологии и генетики СО РАН;

³Аграрно-технологический институт, Российский Университет Дружбы Народов;

⁴Университет Чжэцзян;

arturd1993@yandex.ru

Развитие высокопроизводительного геномного секвенирования в сочетании с технологиями иммунопреципитации хроматина позволяет изучать сайты связывания белковых транскрипционных факторов (ССТФ) в масштабе генома. Увеличение объема данных по экспериментально определенным сайтам связывания ставит качественно новые задачи для анализа регуляции экспрессии генов, предсказания генов-мишеней для факторов транскрипции и реконструкции регуляторных генных сетей, в том числе в геномах растений.

Совместное расположение сайтов связывания двух или более различных факторов в промоторной области гена может определять элемент сети регуляторных генов: два белковых фактора транскрипции могут связываться с одной и той же промоторной областью гена, что соответствует взаимодействию. Белок ТФ может связываться с промотором собственного гена, образуя регуляторный контур.

Сеть регуляторных генов может быть реконструирована из набора местоположений сайтов связывания, образующих кластеры в геноме, с помощью нескольких различных ТФ. Такая регуляторная сеть может сохраняться между видами.

Распределение числа связей в сети белок-белковых взаимодействий подчиняется определенным статистическим закономерностям. Распределение числа узлов в такой сети для транскрипционных факторов также имеет экспоненциально убывающий характер. Новые технологии полногеномного определения сайтов связывания белковых транскрипционных факторов (ChIP-seq) позволяют исследовать распределение узлов более детально для различных модельных объектов (геном человека, геномы млекопитающих и растений). Высказывается гипотеза об общем характере распределения кластеров сайтов связывания в геноме по числу различных транскрипционных факторов, обусловленном структурой регуляторной генной сети. Предложен метод поиска регуляторных районов на основе статистики распределения сайтов связывания в геномах растений, представлены компьютерные инструменты такого анализа и визуализации (Dergilev et al., 2021).

Показано существование неслучайных кластеров сайтов связывания во всех исследованных геномах растений, детально рассмотрены кластеры в геноме *Arabidopsis thaliana*. Было показано, что фактор LFY, отвечающий за рост цветков у растений, как правило, встречается в геноме *Arabidopsis thaliana* наиболее часто среди всех остальных, тогда как факторы группы SRS наименее экспрессированы. В геноме *Physcomitrella patens* фактор LFY стоит на первом месте, а фактор G2, участвующий в процессе клеточного цикла и влияющий на дифференциацию клеток, встречается реже других. Интересно также отметить, что фактор LFY, как правило, встречается наиболее часто среди всех остальных, но слабо коррелирует с другими факторами. В целом можно отметить, что эволюционно более древние факторы GATA и MYB представлены в кластерах сайтов у всех исследованных видов растений.

Для рассматриваемых геномов растений анализ расширенного набора сайтов связывания факторов транскрипции подтвердил широкую совместную кластеризацию сайтов связывания факторов транскрипции семейства GATA, то есть факторов транскрипции, характеризующихся способностью связываться с последовательностью ДНК GATA.

Вопреки ожиданиям, фактор LFY слабо коррелирует с другими факторами из выбранного набора. Однако в процессе кластеризации LFY активно ассоциируется с другими факторами.

В целом предлагаемые статистические оценки позволяют выявлять неслучайные кластеры сайтов связывания ТФ в геномах растений. Распределение кластеров сайтов по размерам показывает общие закономерности формирования кластеров сайтов в эукариотических геномах. Такие участки генома растений необходимо дополнительно исследовать экспериментальными методами для выявления кооперативных взаимодействий, определения функциональной роли обнаруженных кластеров, в том числе в ответ на стресс (Doroshkov et al., 2019).

В общем случае задача совместной регуляции недостаточно изучена. Для геномов растений такие исследования представлены в отдельных базах данных. Для моделирования генных сетей – комплексов взаимодействующих макромолекул в клетке растения – будет использован сетевой подход, инструменты STRING-DB, KEGG Pathways (Orlov et al., 2021).

Разработанные компьютерные подходы могут быть применены к широкому кругу задач оценки кластеров функциональных элементов в геноме. К ним могут относиться области низкой сложности текста, tandemные повторы и островки CpG (Babenko et al., 2018). Анализ функциональных кластеров позволяет статистически

описывать энхансеры, аннотировать геномы. Интеграция экспериментальной геномной информации, больших данных в целом представляет собой важную проблему молекулярной биофизики, требующую интеграции существующих программных средств и решений.

Благодарности: Проект поддержан грантом РФФ 23-44-00030.

Литература

1. Dergilev A.I., Orlova N.G., Dobrovolskay O.B., Orlov Y.L. Statistical estimates of transcription factor binding site clusters in plant genomes based on genome-wide data. *Journal of Integrative Bioinformatics*. 2021; 18, 20200036 doi: 10.1515/jib-2020-0036

2. Орлов Ю.Л., Галиева А.Г., Орлова Н.Г. и др. Реконструкция генной сети болезни Паркинсона для поиска генов-мишеней. *Биомедицинская химия*. 2021; 67(3): 222-230 doi: 10.18097/PBMC20216703222

3. Doroshkov A.V., Konstantinov D.K., Afonnikov D.A., Gunbin K.V. The evolution of gene regulatory networks controlling *Arabidopsis thaliana* L. trichome development. *BMC Plant Biol*. 2019; 19(Suppl 1):53. doi: 10.1186/s12870-019-1640-2

4. Babenko V.N., Bogomolov A.G., Babenko R.O., Galieva E.R., Orlov Y.L. CpG islands' clustering uncovers early development genes in the human genome. *Computer Science and Information Systems*, 2018; 15(2): 473-485 (2018) doi: 10.2298/CSIS170523004B

Стохастическое моделирование белковых полей с немарковской динамикой

Бузмаков М.Д.^{1*}, Браун Д.А.¹

¹ПНИПУ;

maxim.buzmakov97@gmail.com

Живые системы функционируют благодаря белковым полям, которые синтезируются в результате экспрессии генов и участвуют в генной регуляции. Детерминистское описание таких полей с помощью дифференциальных уравнений является недостаточным для понимания протекающих процессов, так как типичное число белковых молекул, вовлекаемых в регуляцию сравнительно мало. Это приводит к сильным флуктуациям полей, которые вызываются шумом химических реакций, а также межклеточным различиям [2]. Стандартным инструментом численного анализа флуктуаций белковых концентраций является алгоритм Гиллеспи [5].

В данной работе мы рассматриваем особый вид белковых полей, динамическое поведение которых не сводится к Марковским процессам. В последние годы стало ясно, что экспрессия генов, вообще говоря, состоит из многоэтапных реакций, в ходе которых последовательно образуются ансамбли сложных органических соединений. Таким образом, эти процессы распределены по пространству, растянуты по времени и зависят от всей предыстории. Стоит отметить, что немарковское поведение может быть как естественным следствием указанных выше процессов, так и быть искусственно введенным в генную регуляцию посредством генной инженерии.

В частном случае, когда немарковский процесс представляет собой фиксированное запаздывание, этим эффектом нельзя пренебречь, если время запаздывания одного порядка величины или больше по сравнению с другими характерными временами динамических процессов. В качестве модельной системы мы рассматриваем репрессилатор [4], который является типичным конструктором синтетической биологии. Плазмида репрессилатора включает гены *lacI*, *λcI* и *tetR*, которые имеют естественное происхождение, но в такой комбинации в природе не встречаются. Промотор каждого гена контролирует следующий за ним цистрон через отрицательную обратную связь, подавляя экспрессию соседа, что приводит к возбуждению колебаний. В модели репрессилатора было сделано несколько допущений, из которых можно выделить ключевые [3]. Во-первых, генная регуляция осуществляется только посредством димерной формы белка. Во-вторых, процессы транскрипции и трансляции протекают с некоторым запаздыванием. Для проведения численного анализа мы использовали модифицированную версию алгоритма Гиллеспи на случай немарковских процессов [2]. Отличие от классического варианта кроется в создании стека для реакций, которые должны произойти спустя заранее определенное время запаздывания.

Для исследования были выбраны две основные конфигурации репрессилатора. В первой конфигурации скорости производства белка всех участвующих генов различаются (несимметричная генная цепь). Разница между временем перехода к новому режиму как в детерминистском, так и стохастическом описаниях здесь является небольшим. Во второй конфигурации симметричной генной цепи скорости реакций и времена запаздывания экспрессии считаются одинаковыми. В рамках детерминистского описания были изучены надкритические динамические режимы работы системы. Кроме предельного цикла, соответствующего поочередной экспрессии, в системе обнаружено медленное многообразие. Оно отражает процесс длительной синхронизации в работе отдельных генов. При этом, нелинейная динамика, демонстрируемая в рамках модели

запаздывающего репрессилатора, существенно отличается от варианта без запаздывания. При стохастическом описании флуктуации приводят к значительно более быстрому срыву с многообразия и переходу к поочередным циклам экспрессии генов. Переход к поочередным колебаниям концентраций белка в случае использования алгоритма Гиллеспи происходит примерно в одно время вне зависимости от симметричности конфигурации генов благодаря наличию шума в системе. Стохастическое описание даёт новую информацию о поведении системы, которая не сводится к детерминистской динамике даже при усреднении по большому числу реализаций. В подкритической области было обнаружено возбуждение квазирегулярных колебаний, вызываемых взаимодействием шума и запаздывания. Вблизи нейтральной кривой система демонстрирует процесс спонтанной деградации и возбуждения периодических колебаний. Но из-за того, что проявления деградации нерегулярны, каждый раз фаза восстановленных колебаний смещается случайным образом. В случае больших надкритичностей обнаружено, что шум способствует более эффективной самонастройке симметричного репрессилатора на совместную работу генов.

Пространственное моделирование белковых полей было произведено в рамках гибридной модели двумерной ткани эпителия, включающей детерминистское описание процесса диффузии и стохастику генной регуляции [1]. Обнаружено, что совместное действие запаздывания, шума и пространственного обмена сигналами между клетками может приводить к образованию паттернов даже в том случае, когда детерминистское описание предсказывает абсолютно устойчивое состояние.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (грант № FSNM-2020-0026).

Список литературы

1. Bratsun D. Protein pattern formation induced by the joint effect of noise and delay in a multicellular system // Math. Model. Nat. Phenom. 2022. Vol. 17. Art. 16.
2. Bratsun D., Volfson D., Hasty J., Tsimring L. Delay-induced stochastic oscillations in gene regulation // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2005. – Vol. 102, No. 41. – P. 14593-14598.
3. Bratsun D.A., Buzmakov M.D. Repressilator with time-delayed gene expression. Part II. Stochastic description // Computer Research and Modeling, 2021, vol. 13, no. 3, P. 587-609
4. Elowitz M.B., Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators // Nature Vol. 403, 2000. P. 335-338.
5. Gillespie D.T. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions // J. Phys. Chem. 1977. Vol. 81. P. 2340-2361.

Тканеинженерные конструкции в биофизике, неврологии и медицине

Реутов В.П.^{1,2*}, Давыдова Л.А.³, Сорокина Е.Г.⁴

¹ИВНД и НФ РАН;

²Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН;

³Беларусский государственный медицинский университет;

⁴Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России;
valentinreutov@mail.ru

Цель тканевой инженерии - конструирование и выращивание вне организма человека живых, функциональных тканей или органов для последующей трансплантации пациенту для замены или стимуляции регенерации поврежденных органа или ткани. В этом направлении с 60-х годов прошлого столетия проводили научные исследования в лаборатории морфологии Института физиологии НАН Беларуси под руководством выдающегося белорусского ученого - эмбриолога и нейроморфолога, академика, доктора медицинских наук, профессора, лауреата Государственной премии СССР Д.М. Голуба. Методы ганглиопексии - трансплантации вегетативных ганглиев на нервно-сосудистой ножке с целью создания новых центров местной нервно-гуморальной регуляции нейрогеннопораженных внутренних органов, органопексии с подшиванием тонкой кишки к стенке денервированного мочевого пузыря и трункопексии, когда в орган вживляют дистальный конец перерезанного нерва, стали революционными методами реабилитации пациентов разного возраста. Авторами и разработчиками этих методов были белорусские ученые. В литературе имеются материалы, указывающие на важную роль сосудистого фактора при трансплантации органов. Большинство исследователей рассматривают дегенерацию нейронов пересаженного ганглия, в первую очередь, нарушением его кровоснабжения и возникновением состояния гипоксии/ишемии. Авторы анализируют возможную роль активных форм азота (NO/NO₂) и кислорода (O₂) в механизмах повреждения нейронов пересаженного ганглия при нарушении циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала в условиях гипоксии/ишемии. Одними из способов уменьшения степени повреждения нейронов пересаженного ганглия могло быть улучшение степени доставки кислорода в проблемных зонах и снижение нитритредуктазной активности гемсодержащих белков, которые вносят свой

вклад в процесс восстановления ионов NO₂⁻ в NO. Свой вклад в снижение нитритредуктазной активности гемсодержащих белков могли внести продукты питания с низким содержанием нитратов/нитритов, а также сдвиги pH в сторону более щелочных значений pH, при которых идет стабилизация R-конформеров комплексов гемоглобина с кислородом. В связи с этим минеральные гидрокарбонатные воды (Боржоми, Нарзан, Эссентуки №4 и 17) можно рассматривать в качестве дополнительного благоприятного фактора при восстановлении пациентов после операций с использованием методов ганглиопексии.

Три типа моделей нейронов для моделирования эпилептиформной активности

Сысоев И.В.^{1,2*}, Капустников А.А.^{1,2}, Сысоева М.В.^{1,3}

¹Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН;

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского;

³Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А.;
dr.ilya.sysoev@yandex.ru

Эпилепсия — сетевое явление, вызванное в первую очередь патологическими изменениями в организации нейронных сетей мозга, часто в очень малых подсетях [1]. Абсансная эпилепсия — это мягкая форма, приступы которой сопровождаются кратковременной потерей сознания и на электроэнцефалограмме выражены как пик-волновые разряды. Поскольку для понимания её механизмов необходимо измерение активности глубоких структур мозга, основные результаты получены на крысах — генетических моделях [2]. Поскольку абсансы заканчиваются внезапно и обнаружить какой-либо специфический механизм окончания не удалось [3], одним из основных способов их моделирования является представление пик-волновых разрядов как длинных переходных процессов [4]. Так как эффекты генерации пик-волновых разрядов рассматриваются в первую очередь как сетевые, в качестве моделей для отдельных нейронов и их групп брались самые простые из известных — чаще всего модель ФитцХью-Нагумо. Однако если наблюдаемые в [4] эффекты действительно сетевые, они должны повторяться при использовании различных уравнений для отдельного элемента сети.

В данной работе мы рассматриваем небольшие сетевые модели эпилептического фокуса, состоящие из 14 нейронов. Для узлов используются три популярные модели: Ходжкина-Хаксли, Моррис-Лекара и ФитцХью-Нагумо [5]. Всего рассмотрено 88 моделей, отличающихся деталями архитектуры связей, построенных на базе исходной модели [6]. Рассматриваются как линейные связи, так и более физиологически обоснованные — через гиперболический тангенс. Для каждой модели для каждого типа узла проведён бифункциональный анализ по параметру связи. Для значительного числа моделей удалось обнаружить седлоузловую бифуркацию предельного цикла, при которой происходит рождение предельного цикла конечного размера, сосуществующего с состоянием равновесия. На пороге рождения такого цикла существуют длинные квазирегулярные переходные процессы. Они могут быть вызваны кратковременным внешним воздействием, как было показано в [4,6], например, из тройничного нерва. Такие переходные процессы и рассматриваются нами далее как модели пик-волновых разрядов.

Для каждой модели был произведён анализ зависимости длительности переходного процесса от фазы воздействия. Были отобраны матрицы связей, модели с использованием которых демонстрируют самые длинные переходные процессы. Оказалось, что существуют несколько матриц связей, при использовании которых генерация длинных переходных процессов происходит для всех трёх использованных моделей нейронов. При этом длительность разрядов составляет от нескольких десятков до нескольких сотен колебаний, что хорошо соответствует средним длительностям разрядов, описанным в литературе [2]. Это доказывает, что предложенный в [6] механизм генерации пик-волновых разрядов не только является общим для ряда моделей из одного и того же класса, но и относительно нечувствителен к тому, какие уравнения используются для описания отдельного узла сети.

[1] J. T. Paz, J. R. Huguenard. Microcircuits and their interactions in epilepsy: is the focus out of focus?. *Nature Neuroscience*. 2015; 18(3):351–359.

[2] A. M. L. Coenen, G. van Luijtelaar. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats, *Behav Genetics*. 2003; 33:635–655. doi:10.1023/A:1026179013847

[3] M. V. Sysoeva, A. Lüttjohann, G. van Luijtelaar, I. V. Sysoev. Dynamics of directional coupling underlying spike-wave discharges. *Neuroscience*. 2016; 314:75–89. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.11.044

[4] T. M. Medvedeva, M. V. Sysoeva, A. Lüttjohann, G. van Luijtelaar, I. V. Sysoev. Dynamical mesoscale model of absence seizures in genetic models. *PLoS ONE*. 2020; 15:e239125.

doi:10.1371/journal.pone.0239125

[5] А. С. Дмитричев, Д. В. Касаткин, В. В. Клиньшов, С. Ю. Кириллов, О. В. Масленников, Д. С. Шапин, В. И. Некоркин. Нелинейные динамические модели нейронов: обзор // Известия вузов. ПНД. 2018; 26(4):5–58. doi:10.18500/0869-6632-2018-26-4-5-58

[6] А. А. Капустников, М. В. Сысоева, И. В. Сысоев. Моделирование пик-волновых разрядов в мозге малыми сетями нейроосцилляторов // Математическая биология и биоинформатика, 2020; 15(2):138-147. doi:10.17537/2020.15.138

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант 19-72-10030-П.

Физическая модель механизма проницаемости ядерной мембраны

Минасбемян М.Л.^{1*}, Бадалян Г.Г.¹

¹Ереванский гос. университет;
minlia@ysu.am

Ядерно-цитоплазматический транспорт опосредуется большим количеством рецепторов, узнающих специфические сигналы на белках и РНК, и переносящих эти субстраты сквозь комплексы ядерных пор. Известно, что транспортные рецепторы проходят сквозь комплексы ядерных пор по механизму облегченной диффузии. Селективный фильтр для малых белков представляет собой сеть из несвернутых гидрофобных полипептидных цепей нуклеопоринов, выстилающих центральный канал NPC. Основным механизмом является Rap-зависимый транспорт. Посредством этого посредника осуществляется быстрый и направленный транспорт тысяч белков и РНК в ядро и из него.

В данной статье мы обсуждаем накопленный нами экспериментальный материал по изменению заряда на поверхности и внутри ядра, основной вклад в который привносят анионные фосфолипиды, и на его основании предлагаем новую физическую модель механизма транспорта РНК. Суммарный поверхностный заряд, создаваемый фосфолипидами в составе ядерной мембраны, может играть важную роль в стабильности и функционировании комплекса ядерных пор, в том числе, и взаимодействии с опосредующими белковый импорт положительно заряженными сигналами ядерной локализации. Эта модель учитывает вклад электростатических полей на скорость облегченного транспорта и изменение размера пор для облегченного ГТФ-зависимого выхода РНК из ядра.

Филогенетический анализ и классификация коротких H2A-гистонов

Сингх-Пальчевская Л.^{1*}, Шайтан А.К.¹

¹МГУ, биологический факультет;
l.singh@intbio.org

Ключевым фактором эпигенетических механизмов являются гистоновые белки. Они отвечают за компактизацию и функционирование хроматина посредством влияния на плотность его упаковки. Существует пять типов эукариотических гистонов: коровые H2A, H2B, H3, H4 и линкерный гистон H1 (H5 у птиц). Основную часть гистоновых белков в хроматине занимают канонические формы, которые экспрессируются в ходе репликации и отвечают за упаковку ДНК. Однако, в ходе жизнедеятельности эукариотической клетки встречаются варианты гистонов, которые встраиваются в нуклеосому и изменяют ее стабильность, чтобы регулировать работу определенных участков генома.

На протяжении длительного времени считалось, что белки гистонов медленно эволюционируют и практически не имеют различий, за исключением хвостов, которые имеют огромное количество модификаций. Однако, сегодня известно, что даже у эволюционно родственных организмов может быть широкий спектр вариантов гистонов, обладающих различными функциональными особенностями. Например, варианты масH2A и H2A.B отвечают за регуляцию экспрессии генов, в то время как H2A.X и H2A.Z реагируют на повреждения ДНК [1]. Стоит отметить, что некоторые варианты отделились от канонических гистоновых белков значительно раньше других. Так, филогенетический анализ [2] демонстрирует, что H2A.Z отделился от других H2A до диверсификации эукариот, тогда как масH2A появился значительно позже. Существуют варианты гистонов, которые обнаружены только в одной таксономической группе или в одном типе клеток. Например, гистоновый вариант H2A.W специфичен для растений [3], а ОО H1.8 характерен для ооцитов млекопитающих. Несмотря на существование множества факторов, демонстрирующих филогенетическое, функциональное и

видовое разнообразие гистоновых белков, до сих пор отсутствуют комплексное понимание и систематизированные знания о различных вариантах и их значимости.

Короткие (short) H2A представляют собой класс, состоящий из нескольких вариантов гистонов семейства H2A у плацентарных млекопитающих, экспрессирующихся в основном во время развития мужских половых клеток млекопитающих до почти полной замены гистонов протаминами в ядрах сперматозоидов [4]. Для того, чтобы провести филогенетический анализ и выявить их особенности, мы собрали их аминокислотные последовательности, в том числе для недавно открытого варианта H2A.Q [4], и некоторые последовательности других вариантов из семейства H2A. На основе множественных выравниваний, которые были получены с помощью MUSCLE, мы построили филогенетическое дерево с применением алгоритмов PhyML [5], которые базируются на методах максимального правдоподобия. Опираясь на него, мы смогли сделать вывод о том, что короткие H2A возникли самыми последними в эволюционной истории на сегодня. Самым близким ортологом является гистоновый вариант H2A.R. Важно отметить, что внутри каждого подсемейства (H2A.B, H2A.P, H2A.Q, H2A.L) выделяются отдельные клады. Причем у варианта H2A.Q они одни из наиболее выраженных: можно выделить как минимум 4 клады.

Также мы провели кластеризацию аминокислотных последовательностей коротких H2A с использованием алгоритма иерархической кластеризации UPGMA и проанализировали матрицу попарной идентичности. Результаты продемонстрировали, что медианное значение идентичности среди всех последовательностей short H2A составило менее 36%, при этом внутри каждого отдельного подсемейства - не менее 43%, но и не более 59%. Также, полученные кластеры хорошо вписываются в концепцию эволюционного анализа. Мы видим, что каждый кластер содержит в себе все последовательности одной или нескольких клад, наблюдаемых на филогенетическом дереве. Этот факт означает, что эволюционно образовавшиеся клады могут иметь важные функциональные отличия.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ МД-1131.2022.1.4.

Литература

[1] Shaytan, Alexey K., David Landsman, and Anna R. Panchenko. "Nucleosome Adaptability Conferred by Sequence and Structural Variations in Histone H2A-H2B Dimers." *Current Opinion in Structural Biology* 32 (June 2015): 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.02.004>.

[2] Talbert, Paul B., and Steven Henikoff. "Histone Variants--Ancient Wrap Artists of the Epigenome." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11, no. 4 (April 2010): 264–75. <https://doi.org/10.1038/nrm2861>.

[3] Yelagandula, R., Stroud, H., Holec, S., Zhou, K., Feng, S., Zhong, X., Muthurajan, U. M., Nie, X., Kawashima, T., Groth, M. et al. (2014). The histone variant H2A.W defines heterochromatin and promotes chromatin condensation in Arabidopsis. *Cell* 158, 98–109. doi:10.1016/j.cell.2014.06.006.

[4] Molaro, Antoine, Janet M. Young, and Harmit S. Malik. "Evolutionary Origins and Diversification of Testis-Specific Short Histone H2A Variants in Mammals." *Genome Research* 28, no. 4 (April 2018): 460–73. <https://doi.org/10.1101/gr.229799.117>.

[5] Guindon, Stéphane, Jean-François Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, and Olivier Gascuel. "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." *Systematic Biology* 59, no. 3 (March 29, 2010): 307–21. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.

Формирование системы статистически значимых предикторов для применения машинного обучения для предсказания вторичной структуры белка

Мильчевский Ю.В.^{1*}, Мильчевская В.Ю.¹, Тевонян Л.Л.¹, Арутюнян А.Ф.¹, Кравацкий Ю.В.^{1,2}

¹ИМБ РАН;

²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ИМБ РАН;
milch@eimb.ru

Повышение точности предсказания структуры белков в последнее время тесно связано с применением и совершенствованием методов машинного обучения. Кодирование последовательности аминокислот является начальным этапом предсказания структуры, и поэтому играет фундаментальную роль в успехе этих методов.

За последние годы наблюдался значительный прогресс в методах предсказания структуры и функций белка на основе последовательности. Существенные продвижения произошли в таких задачах, как предсказание вторичной и локальной структуры белка, белковых контактов, белок-связывающих участков и т.д. Существенный прогресс в этих задачах достигнут за счет использования методов машинного обучения, особенно с использованием методов глубокого обучения. Подготовка данных для обучения предсказательных моделей является одной из наиболее трудоёмких задач, как в методическом, так и в алгоритмическом смысле. Генерация

входных данных для машинного обучения для задач предсказания структур и функций белков не является стандартной процедурой, и обычно реализуется в контексте конкретной задачи.

Таким образом, выбор начального набора предикторов исключительно важен для построения модели, описывающей связь последовательности с локальной структурой белка. Необходимо создание и реализация алгоритма, позволяющего уменьшить количество признаков, упростить модель и исключить любую избыточную информацию, но с сохранением статистической значимости сформированной системы предикторов. Следует отметить, что при использовании методов машинного обучения оценить вклад и значимость отдельного предиктора не представляется возможным, поэтому в процессе отладки модели изменение входного набора предикторов обычно происходит волюнтаристски или перебором. Наш подход в формировании начального набора предикторов состоит в использовании набора статистически значимых признаков, предварительно полученных другими методами, которые позволяют эту статистическую значимость количественно оценить [1]. Мы использовали предикторы из нашей предыдущей работы по предсказанию локальной структуры [2]. В этой работе мы для каждого из 16 протеиновых блоков (protein blocks, PBs), представленных в [3], выявляли значимые предикторы, основанные как на физико-химических свойствах аминокислотных остатков, так и на статистических характеристиках структурных элементов [1]. Предсказание для каждого элемента последовательности представляет собой набор расстояний по метрике RMSD до каждого из 16 PB. Таким образом, составление предсказательной модели состояло из 16 отдельных задач, в каждой из которых выявлялся набор статистически значимых предикторов из большого исходного набора предикторов. Каждый из предикторов формализовал предположения о физических факторах, определяющих локальную структуру. Выбор наиболее значимых предикторов для каждого PB осуществлялся с помощью пошагового регрессионного анализа [1]. Все значимые предикторы были объединены в набор для последующего использования в методах глубокого обучения. Многие предикторы оказались значимыми для предсказания нескольких, и даже всех 16 PB. Итоговый набор состоит из 243 предикторов, отобранных из 852 входных предикторов. Среди отобранных присутствуют как предикторы, основанные на базе свойств аминокислот AAindex [4], так и предикторы, отражающие статистические характеристики встречаемости структурных элементов.

Полученная система предикторов позволяет расширять или редуцировать её предсказуемым образом (т.е. добавляя или исключая из предсказательной модели те или иные физико-химические и/или структурные параметры белковых цепей).

Формирование систем предикторов подробно описано в наших работах [1] и [2]. Программы, осуществляющие пошаговые регрессионный и дискриминантный анализы, свободно доступны на Github: <https://github.com/Milchevskiy/protein-encoding-projects>.

Работа поддержана грантом РФФИ 22-24-01088.

1. Мильчевский Ю.В., Мильчевская В.Ю., Кравацкий Ю.В. Метод комплексного формирования предикторов для применения алгоритмов машинного обучения в задаче предсказания структуры и функций белка. Молекулярная Биология, 2023, т.57, № 1.

2. Milchevskaya V., Nikitin A.M., Lukshin S.A., Filatov I.V., Kravatsky Y.V., Tumanyan V.G., Esipova N.G., Milchevskiy Y.V. Structural coordinates: A novel approach to predict protein backbone conformation. PLoS One. 2021. 16, e0239793.

3. de Brevern A.G., Etchebest C., Hazout S. Bayesian probabilistic approach for predicting backbone structures in terms of protein blocks. Proteins. 2000, 41, 271-287.

4. Kawashima S., Pokarowski P., Pokarowska M., Kolinski A., Katayama T., Kanehisa M. 2008. AAindex: amino acid index database, progress report. Nucleic Acids Res. 2008, 36, D202-205.

Численное исследование влияния деформаций на распространение волн возбуждения-сокращения в образце миокарда в полной электромеханической модели сердечной мышцы

Сёмин Ф.А.^{1*}, Галушка В.А.¹, Цатурян А.К.¹

¹Научно-исследовательский институт механики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;
f.syomin@imec.msu.ru

В настоящее время различными научными группами активно разрабатываются электромеханические модели ткани сердечной мышцы, миокарда, для дальнейшего приложения таких моделей в персонализированном численном моделировании сердца и отдельных его камер. В том числе, широко исследуются явления волн entry, выражающиеся, в частности, в образовании отрывающихся и закручивающихся волн возбуждения в миокарде сердечной стенки. Представленные в научной литературе модели редко подробно описывают механику сердечной мышцы, что представляется важным для описания наблюдаемой в эксперименте и клинике механо-

электрической обратной связи: снижения скорости проводимости при растяжении миокарда. Хотя существует ряд моделей, учитывающих влияние деформаций миокарда на динамику волн электрического возбуждения в его стенке, чаще всего такая обратная связь основана на зависимости от деформаций проводимости некоторых ионных каналов в клеточной мембране и/или прямого влияния геометрии ткани на её проводимость вследствие изменения длины и площади поперечного сечения проводника. В то же время, экспериментальные данные показывают, что вклад этих эффектов незначителен по сравнению с эффектами, вызванными изменением ёмкости клеточной мембраны при растяжении сердечной мышцы [1].

В докладе представлены результаты приложения электромеханической модели миокарда, разработанной нами ранее [2], к задаче электрического возбуждения и механического сокращения образца миокарда с невозбудимой и непроводящей областью. Модель объединяет в себе блок, описывающий электрофизиологию миокарда простой феноменологической моделью Алиева-Панфилова [3], с детальной моделью механики сокращения миокарда и его активации [4]. Уравнения, задающие электромеханическое сопряжение, включая процессы кальций-инициированного высвобождения кальция, были взяты из модели [5] с некоторыми модификациями и упрощениями, позволившими полной модели воспроизводить важные зависимости силы сокращения и скорости расслабления сердечной мышцы от частоты её стимуляции при сравнительно небольших вычислительных потребностях модели. Модель также описывает механо-электрическую обратную связь в виде зависимости ёмкости мембраны кардиомиоцита от деформаций. При этом было учтено, что изменение ёмкости мембраны и, соответственно, скорости проведения волн возбуждения отстаёт от деформаций. Также принимали во внимание существование двух различных компонент проводимости миокарда: проводимости цитоплазмы клетки, которая меняется при деформации миокарда, и проводимости клеточной мембраны, которая не зависит от деформации.

В рамках исследования рассматривали два типа задач сокращения образца миокардиальной ткани, предрастянутого вдоль направления мышечных волокон, выбранного постоянным во всём образце, и упруго закреплённого с двух сторон. Образцы в задачах первого типа содержали узкую невозбудимую и непроводящую области, а возбуждение инициировали на небольшом участке границы, примыкающем к данной области. В задачах второго типа рассматривали образцы с невозбудимой областью в центре, вызывая спиральные волны возбуждения-сокращения путём подачи двух последовательных электрических стимулов на границе. Задачи решали численно методом конечных элементов с одновременным решением в каждой точке интегрирования каждого элемента системы обыкновенных дифференциальных уравнений клеточной модели.

Результаты моделирования показали, что при некоторых условиях, таких как повышенная частота стимуляции образца (2 Гц) и повышенный порог возбуждения ткани, происходит отрыв волн возбуждения-сокращения от границ невозбудимых областей и их закручивание вблизи границ таких участков. В том случае, если при проведении этих численных экспериментов была отключена механо-электрическая обратная связь, отрыва волн не наблюдали. Эти результаты, на наш взгляд, демонстрируют значимость учёта влияния деформаций на электрофизиологию миокарда при моделировании его возбуждения и сокращения, что в свою очередь показывает необходимость корректного описания напряжённо-деформированного состояния миокарда электромеханическими моделями, даже если они используются только для изучения динамики волн возбуждения. Результаты также показывают возможное влияние механо-электрической обратной связи на возникновение аритмий.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-71-10007.

Список литературы.

1. Pfeiffer ER, Wright AT, Edwards AG, et al. Caveolae in ventricular myocytes are required for stretch-dependent conduction slowing. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;76:265-274. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.09.014.
2. Syomin F, Osepyan A, Tsaturyan A. Computationally efficient model of myocardial electromechanics for multiscale simulations. *PloS One.* 2021;16(7):e0255027. doi:10.1371/journal.pone.0255027.
3. Aliev RR, Panfilov AV. A simple two-variable model of cardiac excitation. *Chaos, Solitons Fractals.* 1996;7:293-301. doi:10.1016/0960-0779(95)00089-5.
4. Syomin FA, Tsaturyan AK. A simple model of cardiac muscle for multiscale simulation: passive mechanics, crossbridge kinetics and calcium regulation. *J Theor Biol.* 2017;420:105-116. doi:10.1016/j.jtbi.2017.02.021.
5. ten Tusscher KH, Panfilov AV. Alternans and spiral breakup in a human ventricular tissue model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291(3):H1088-H1100. doi:10.1152/ajpheart.00109.2006.

Численное моделирование сдвиговой активации тромбоцитов в катетерах для гемодиализа

Салихова Т.^{1,2*}, Пушин Д.М.¹, Гурия Г.Т.^{1,2}

¹"НМИЦ гематологии" Минздрава России, Москва, Россия;

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия;

salikhova.ty@gmail.com

Известно, что тромбоциты реагируют на гидродинамические условия течения крови вследствие их взаимодействия с молекулами фактора фон Виллебранда (VWF) [Löf et al., 2017]. В условиях низких напряжений сдвига молекулы VWF, ассоциированные с тромбоцитами, находятся в глобулярной форме, не активируя тромбоциты. Однако в условиях высоких напряжений сдвига молекулы VWF могут испытывать конформационные изменения, переходя в развернутую форму. При этом размотанные молекулы VWF, связываясь с большим числом тромбоцитарных рецепторов, запускают в тромбоцитах сигнальные каскады, ведущие к их активации. В результате может провоцироваться развитие серьезных осложнений, таких как инфаркты и инсульты. Учитывая распространенность указанных тромбоцитарных осложнений, представляет интерес разработка подхода для оценки риска гидродинамической активации тромбоцитов в интенсивных течениях крови.

В условия активации тромбоцитов в нестационарных течениях должны входить как величина, так и длительность сдвиговых напряжений. Одной из характеристик, учитывающей оба фактора, является кумулятивное напряжение сдвига [Bluestein et al., 1997]. Данная характеристика определяется как интеграл от напряжения сдвига вдоль участка траектории тромбоцита, проходящего через зону повышенных сдвиговых напряжений. Превышение кумулятивным напряжением сдвига определенного критического значения инициирует сдвиговую активацию тромбоцитов.

Целью данной работы является моделирование гидродинамической активации тромбоцитов при постановке катетеров, используемых при проведении процедур гемодиализа. Для данного типа катетеров характерны интенсивные потоки крови. Развиваемые в катетерах повышенные сдвиговые напряжения могут провоцировать запуск гидродинамической активации тромбоцитов с последующим тромбообразованием ниже по течению.

В рамках работы исследовались процессы активации тромбоцитов в венах, используемых для гемодиализа. Такого рода процедуры подразумевают использование двух катетеров. Через первый кровь забирается из вены в диализный аппарат, осуществляющий очищение крови, через второй она возвращается обратно. В ходе проведенных расчетов принималось во внимание, что критическая величина кумулятивного напряжения сдвига зависит от размера VWF [Pushin et al., 2020]. В качестве меры, характеризующей риск гидродинамической активации, выступала усредненная за сердечный цикл степень активированных тромбоцитов на выходе из рассматриваемого сосуда [Pushin et al., 2021]. В работе исследовалось влияние интенсивности течения крови, длины макромолекул VWF на запуск гидродинамической активации тромбоцитов для ряда представляющих интерес постановок катетеров.

Проведенный анализ позволил ранжировать влияние исследованных факторов по степени риска активации тромбоцитов. Сформулированы рекомендации по постановке гемодиализных катетеров для снижения риска тромбоцитарных осложнений.

Литература

Löf, A., Müller, J. P., & Brehm, M. A. (2018). A biophysical view on von Willebrand factor activation. *Journal of cellular physiology*, 233(2), 799-810.

Bluestein, D., Niu, L., Schoepfoerster, R. T., & Dewanjee, M. K. (1997). Fluid mechanics of arterial stenosis: relationship to the development of mural thrombus. *Annals of biomedical engineering*, 25(2), 344-356.

Pushin, D. M., Salikhova, T. Y., Zlobina, K. E., & Guria, G. T. (2020). Platelet activation via dynamic conformational changes of von Willebrand factor under shear. *PLoS ONE*, 15(6), e0234501.

Pushin, D. M., Salikhova, T. Y., Biryukova, L. S., & Guria, G. T. (2021). Loss of Stability of the Blood Liquid State and Assessment of Shear-Induced Thrombosis Risk. *Radiophysics and Quantum Electronics*, 63(9), 804-825.

Экспериментально-теоретическое исследование кворум-эффекта в накопительной культуре *Photobacterium phosphoreum* 1889

Сарангова А.Б.^{1*}, Барцев С.И.²

¹СФУ, ИФБиТ;

²ИБФ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН;

sarangova.antonina@yandex.ru

Одна из задач современной микробиологии состоит в изучении механизмов запуска кворум-эффекта, который был обнаружен при изучении биолюминесценции [1] в бактериальных популяциях, но большее развитие его изучение получило в области медицинской микробиологии. Внимание к данному эффекту объясняется тем, что обнаруженный кворум-эффект регулирует физиологическую активность микробов, а именно влияет на симбиоз, вирулентность, конъюгацию, синтез антибиотиков, подвижность, образование спор, формирование биопленки и биолюминесценцию. Цель настоящей работы заключалась в теоретическом описании запуска люциферазного оперона в накопительной культуре *Ph.phosphoreum* 1889 и оценке роли метаболитного влияния на его запуск.

Полученные экспериментальные закономерности согласуются с известными закономерностями [1, 2].

Динамика роста биомассы культуры хорошо описывается моделью, учитывающей субстратное ингибирование. Для описания динамики количества люциферазы использованы два уравнения, описывающие собственно среднее количество люциферазы в клетке культуры и концентрацию аутоиндуктора в среде. Показано, что для приемлемого описания динамики свечения необходимо принять, что включение люциферазного оперона в бактериях происходит на определенном этапе развития клетки и чувствительность рецепторов клеток к концентрации аутоиндуктора существенно варьирует.

Список литературы

1. Kempner, E. S. Aspects of Light Production by *Photobacterium fischeri* / E. S. Kempner, F. E. Hanson // *Journal of Bacteriology* – 1968. – Vol. 95 – №3 – P. 975–979
2. Чумакова Р.И., Гительзон И.И. Светящиеся бактерии [Текст] / Р. И. Чумакова, И. И. Гительзон. – М.: Наука. 1975. – 107 с.

Биофотоника. Фотобиология. Фотосинтез. Биолюминесценция. Фоторецепция. Оптогенетика

LED-светильник для лабораторного культивирования микроводоросли хлореллы (chlorella)

Бурдышева О.В.^{1*}, Шолгин Е.С.¹
¹Пермский НИИСХ филиал ПФИЦ УрО РАН;
burdyshevaolga@gmail.com

Несмотря на то что микроводоросль хлорелла (Chlorella) нашла широкое применение во многих областях деятельности человека [1-3], научные работы, направленные на улучшение методов ее культивирования, продолжают. Важным условием роста водоросли является освещение. В качестве осветительных установок в основном используются фотобиореакторы [4-6], ориентированные на получение больших объемов биомассы. Такие установки имеют большие габариты и непригодны для проведения лабораторных исследований, в которых используется несколько малообъемных емкостей с образцами, отличающимися создаваемыми в них условиями развития культуры (например, составом питательной среды), так как не обеспечивают равномерность облучения. Этот фактор снижает достоверность результатов опытов, затрудняет их интерпретацию и воспроизводимость.

Целью представляемой работы являлось конструирование LED-светильника для культивирования микроводоросли хлореллы в лабораторных условиях, обеспечивающего однородность освещенности экспериментальных образцов.

В ходе работы рассмотрены основные требования, предъявляемые к источнику излучения для культивирования микроводорослей в лабораторных условиях. В работе проведен расчет методом последовательных приближений с суммированием вклада в освещенность всех диодов установки для оценки степени однородности освещенности экспериментальных образцов. Выделено три типа расположенных на стекле точек, характерных по своему пространственному положению относительно диодов. Относительное расхождение между точками трех рассмотренных типов составляет на третьей итерации (то есть при учете соседних диодов 3-го порядка) не более 6%, в связи, с чем можно говорить о достаточной однородности освещенности рабочей области. Расчет показал, что в центральной части рабочей области относительное расхождение $\delta = (E_{\max} - E_{\min}) / \langle E \rangle$ суммарной освещенности для точек трех типов не превышало 0,3%. Освещенность точек на периферии рабочей зоны, естественно, ниже, чем в ее центре.

Для апробации сконструирован специализированный светильник для микроводоросли хлореллы с учетом специфики лабораторного культивирования на базе лаборатории экологии и иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН. Оптимальным представляется располагать экспериментальные образцы на самом светильнике. Специализированный светильник в данной реализации обеспечивает равномерную освещенность рабочего стола с установленными на нем образцами, что позволяет провести достоверный сравнительный анализ результатов культивирования хлореллы.

Специализированный светильник содержит блок питания, регулятор мощности и каскад диодов, габариты осветительной установки 340x220x50 мм. За счет регулятора мощности возможно управление напряжением на диодах, что позволяет изменять уровень потока фотосинтетически активной радиации (ФАР) в диапазоне 150 - 350 мкмоль/(с·м²).

Заключение

Разработанный специализированный светильник обеспечивает высокую степень однородности освещения на своей рабочей поверхности, а также соответствует специфике лабораторного культивирования хлореллы и может быть рекомендован к использованию при проведении биологических экспериментов.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации НИОКТР 122031100058-3. Сконструированный светильник используется в экспериментах лаборатории экологии и иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.

Список литературы

1. Туми А., Смятская Ю. А., Политаева Н. А. Использование биомассы микроводорослей CHLORELLA SOROKINIANA в качестве энтеросорбента // Бутлеровские сообщения. 2020. Т. 61. № 1. С. 126–132.
2. Заболотских В. В., Васильев А. В., Смахтина Л. А., Семихвостова О. В. Разработка технологических подходов к получению альтернативного биотоплива из водорослей // Академический вестник ELPIT. 2019. Т. 4. № 1 (7). С. 12–38.
3. Политаева Н. А., Смятская Ю. А., Кузнецова Т. А. Культивирование и использование микроводорослей Chlorella и высших водных растений ряска Lemna // Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская издательско-книготорговая фирма "Наука", 2017. 87 с.

4. Яговкин А. Ю., Трофимчук О. А., Туранов С. Б., Петикарь П. В., Романенко С. А. Фотобиореактор для культивирования микроводорослей // Патент РФ № 2759450 С1. Патентообладатель ФГАОУ ВО Исследовательский Томский Политехнический Университет. 2021. Бюл. № 32.

5. Комиссарова А. В., Пантвич В. Ж., Ермакова Л. С., Кудрявцева Ю. С. Фотобиореакторы для культивирования микроводорослей с целью получения из них биотоплива // Актуальные исследования. 2020. № 22 (25). С. 9–11.

6. Романенко С. А., Геворгиз Р. Г. Конструктивные особенности портативных фотобиореакторов для микроводорослей // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2019. Т. 4. № 2. С. 289–294.

Активность фотосинтетического аппарата *Solanum tuberosum* в зависимости от структурного состояния тубулинового цитоскелета

Пузина Т.И.^{1*}, Макеева И.Ю.¹

¹*Орловский государственный университет имени И.С.Тургенева;*
tipuzina@gmail.com

В настоящее время об активности фотосинтетического аппарата всё чаще судят по биофизическим параметрам, прежде всего, по флуоресценции хлорофилла. Метод флуоресценции широко используется в эколого-физиологических исследованиях фотосинтеза. Элементы цитоскелета через ассоциированные белки взаимодействуют с мембранами, образуя континуум, нарушение которого может сказаться на мембранных процессах. Изучали влияние деструктурирующего агента микротрубочек оризалина (15мкМ) на скорость нециклического потока электронов, коэффициенты фотохимического и нефотохимического тушения, а также соотношение их скоростей в растениях картофеля, выращенных в почвенной культуре в вегетационном домике. Регистрацию параметров флуоресценции хлорофилла листьев седьмого яруса срединной формации у интактных растений, предварительно адаптированных к темноте, проводили с использованием портативного флуориметра MIN RAM. Выявлено снижение на 21% скорости нециклического потока электронов (ETR) в варианте с деструктурированными микротрубочками, по-видимому, это связано с фармакологическим стрессом, вызванным действием оризалина. Одновременно показано снижение в 1,8 раза коэффициента фотохимического тушения (qP) – доли световой энергии, потребляемой открытыми реакционными центрами ФС II. Напротив, в условиях действия оризалина увеличивался коэффициент нефотохимического тушения (qN), связанный с процессами, ответственными за преобразование в тепло части энергии, поглощенной в световой фазе фотосинтеза. Повышение составило 26 %. Расчёт соотношения скоростей реакций фотосинтетического и нефотосинтетического использования энергии возбуждения реакционного центра ФС II (Fv/F0) показал её значительное уменьшение (в 2,7 раза). Выявленные изменения в показателях флуоресценции хлорофилла в условиях деструкции микротрубочек происходили на фоне снижения содержания фитогормонов ауксинов. Имеются сведения, что экзогенная индолилуксусная кислота участвует в регуляции флуоресценции хлорофилла. Ранее нами показано снижение скорости реакции Хилла и процесса фотофосфорилирования при деструкции тубулинового цитоскелета у *Solanum tuberosum*. Возможно одной из причин являются нарушения в работе фотосинтетического аппарата, о чём свидетельствуют изменения в показателях флуоресценции хлорофилла.

Анализ спектров отражения здоровых и инфицированных листьев *Nicotiana Benthamiana*

Жаворонкова А.С.^{1*}, Гришина А.И.¹, Гринберг М.А.¹, Агеева М.Н.¹, Брилкина А.А.¹, Воденеев В.А.¹
¹*ННГУ;*

ann.zhavoronkova38.95@gmail.com

Болезни растений, вызываемые патогенами, такими как вирусы, бактерии и грибы приводят к значительным потерям урожая. Например, для мирового производства пшеницы и риса они, соответственно, составляют 21% и 30%. Глобализация, расширение мировой торговли, мобильность населения разрушают географические барьеры, благодаря которым сообщества растений и их патогенов оставались изолированными, что приводит к увеличению числа чужеродных вредителей и их быстрому распространению. Анализ спектров необходим для наиболее эффективной досимптомной детекции патогенов в растениях, что, в свою очередь,

имеет важное значение для уменьшения распространения болезней и облегчения защиты растений, а также для обеспечения продовольственной безопасности в связи с ростом населения мира. Идея состоит не в том, чтобы лечить болезни после появления симптомов, а в постоянном наблюдении за здоровьем растения, а также в уничтожении патогена прямо в месте начала заражения.

Целью данной работы является анализ спектров отражения здоровых и инфицированных вирусом листьев.

Исследования проводились на четырёхнедельных растениях *Nicotiana benthamiana*, в которых наблюдали распространение вируса PVX, имеющего сшитый с белком оболочки флуоресцентный белок GFP. Инфицирование растений проводили с помощью агробактериальной инфильтрации четвёртого настоящего листа. В качестве методов обнаружения инфекции применяли гиперспектральный имиджинг и RGB-фотографии. Замеры производили каждый день в одно и то же время в течение 10 дней с помощью гиперспектрального датчика Specim IQ.

Производилась съёмка всего растения на гиперспектральную камеру при постоянном искусственном свете, далее получали спектры отражения десятых неинкубированных листьев табака в здоровых и инфицированных частях, а также десятых листьев незараженных растений. Зарегистрированы отличия в спектрах между здоровыми и инфицированными областями в различных участках спектра, а именно на 530-550 нм и 700-750 нм. Отличия усиливаются с каждым днем.

Полученные результаты позволяют выбрать оптимальные и эффективные отражательные индексы для обнаружения вирусной инфекции, что, в свою очередь, делает возможным подбор светофильтров для гораздо более выгодных, с финансовой точки зрения, мультиспектральных датчиков.

Возможные причины изменения спектра отражения тканей листа при инфицировании обсуждаются.

Работа выполнена в ходе выполнения проекта НЦМУ «Центр фотоники» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, договор № 075-15-2020-927.

Аналитическая система на основе канала mKate2-Kv1.3 и Atto488-хонготоксина для изучения пептидных блокаторов

Орлов Н.А.^{1,2*}, Игнатова А.А.², Крюкова Е.В.², Якимов С.А.², Кирпичников М.П.^{1,2}, Некрасова О.В.²,
Феофанов А.В.^{1,2}

¹МГУ им. М. В. Ломоносова;

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук;

n.orlov858@yandex.ru

Потенциал-зависимый калиевый канал Kv1.3 играет ключевую роль в жизненно важных клеточных процессах: обеспечивает проводимость ионов калия через мембрану, участвует в распространении потенциала действия в мышечных клетках и нейронах, связан с пролиферацией и миграцией клеток. Kv1.3 вовлечён в патогенез некоторых онкологических [1] и аутоиммунных [2] заболеваний, а также болезней нервной системы [3].

Блокаторы поры этого канала, органические соединения и пептидные токсины, рассматриваются как перспективные лекарственные средства для лечения патологий, связанных с гиперэкспрессией или повышенной активностью канала [4, 5], а также служат инструментами для изучения его структуры и функционирования [6]. Поиск и изучение новых блокаторов требуют эффективной системы оценки их способности связываться с каналами.

Расширяя разнообразие методов изучения аффинности поровых блокаторов, мы докладываем о разработке аналитической системы для измерения сродства блокаторов к Kv1.3, экспрессированному на мембране клеток млекопитающих [7]. Компонентами системы являются пептид хонготоксин 1, конъюгированный с флуорофором Atto488 (A-HgTx), и канал Kv1.3 человека, слитый с красным флуоресцентным белком mKate2. Для измерений используется конфокальная микроскопия, а для оценки результатов разработан специальный протокол обработки изображений.

С использованием флуоресцентных маркеров клеточных органелл исследовано клеточное распределение каналов Kv1.3, слитых с mKate2 на N- или C-конце (K-Kv1.3 и Kv1.3-K, соответственно), при их транзientной экспрессии в клетках HEK293. Установлено, что положение mKate2 в конструкции слитого белка влияет на локализацию канала в клетках. Представленность канала на мембране гораздо выше в случае K-Kv1.3, в то время как для Kv1.3-K наблюдалось преобладающее накопление канала в цитоплазме. Чтобы проверить возможность предсказанного ранее дополнительного усиления мембранной локализации Kv1.3 путем удаления его N-концевого фрагмента (которое не приводит к изменению свойств проводимости канала и аффинности поровых

блокаторов [8, 9]), мы создали плазмиду, кодирующую усеченный Kv1.3, слитый по N-концу с mKate2 (K-ΔKv1.3). Показано, что для K-ΔKv1.3 характерна повышенная экспрессия в мембране, а общее распределение в клетке схоже с распределением K-Kv1.3.

Данные электрофизиологии показали, что K-ΔKv1.3, экспрессируемый в клетках, является функционально активным потенциал-зависимым каналом, который блокируется специфическими блокаторами Kv1.3-канала.

Все три исследованных варианта канала Kv1.3 связывают A-HgTx на мембране живых клеток. Это связывание наблюдается при наномолярных концентрациях A-HgTx и не приводит к заметным изменениям в мембранном распределении каналов Kv1.3. Промывка клеток свежей средой приводит к быстрой диссоциации A-HgTx с клеточной мембраны. Избыток немеченного HgTx1 вытесняет связанный A-HgTx с мембраны клеток. Не наблюдалось связывания A-HgTx с мембраной интактных клеток НЕК293. Таким образом, связывание A-HgTx является специфическим и обратимым. Установлено, что связывание A-HgTx с Kv1.3 является концентрационно-зависимым и насыщаемым, а константа диссоциации комплексов составляет $0,48 \pm 0,08$ нМ.

Эксперименты по конкурентному связыванию показали, что A-HgTx вытесняется из комплексов с K-ΔKv1.3 на мембране живых клеток различными известными пептидными поровыми блокаторами канала Kv1.3, включая рекомбинантные HgTx1, харибдотоксин (ChTx), агитоксин 2 (AgTx2) и калиотоксин 1 (KTx1), которые первоначально были обнаружены в ядах различных скорпионов. A-HgTx также вытесняется неспецифическим блокатором пор тетраэтиламмонием (TEA), который связывается как с внутренней стороной поры, так и с внешним вестибулом Kv-каналов. Данные экспериментов по конкурентному связыванию были использованы для расчета кажущихся констант диссоциаций комплексов, которые составили $0,2 \pm 0,1$; 4 ± 2 ; 7 ± 4 $1,1 \pm 0,3$; $(2 \pm 1) \times 10^6$ нМ для пептидов HgTx1, ChTx, AgTx2 и KTx1, а также неспецифического блокатора TEA, соответственно.

Результаты наших экспериментов демонстрируют, что при должном внимании к факторам, влияющим на взаимодействие блокаторов с каналом, разработанный аналитический подход, основанный на конфокальной флуоресцентной микроскопии комплексов A-HgTx с K-ΔKv1.3 каналами на мембране живых клеток, позволяет проводить скрининг блокаторов Kv1.3, которые связываются с внеклеточным вестибулом K⁺-проводящей поры, и анализировать их аффинность.

Представленный подход дополняет арсенал методик в области исследований ионных каналов и потенциально может помочь в расширении библиотеки пептидных блокаторов канала Kv1.3, которые являются перспективными кандидатами для разработки на их основе лекарственных средств. Мы полагаем, что, варьируя флуоресцентный лиганд и тип экспрессируемого канала, разработанный подход может быть использован для изучения взаимодействий между различными группами пептидных блокаторов и ионных каналов на клеточном уровне.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект N 22-14-00406).

Литература

- 1) Teisseyre, A.; Palko-Labuz, A.; Sroda-Pomianek, K.; Michalak, K. Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3 as a Target in Therapy of Cancer. *Front. Oncol.* 2019, 9, 933.
- 2) Wulff, H.; Beeton, C.; Chandy, K.G. Potassium Channels as Therapeutic Targets for Autoimmune Disorders. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 2003, 6, 640–647.
- 3) Wang, X.; Li, G.; Guo, J.; Zhang, Z.; Zhang, S.; Zhu, Y.; Cheng, J.; Yu, L.; Ji, Y.; Tao, J. Kv1.3 Channel as a Key Therapeutic Target for Neuroinflammatory Diseases: State of the Art and Beyond. *Front. Neurosci.* 2020, 13, 1393.
- 4) Cañas, C.A.; Castaño-Valencia, S.; Castro-Herrera, F. Pharmacological Blockade of KV1.3 Channel as a Promising Treatment in Autoimmune Diseases. *J. Transl. Autoimmun.* 2022, 5, 100146.
- 5) Mathie, A.; Veale, E.L.; Golluscio, A.; Holden, R.G.; Walsh, Y. Pharmacological Approaches to Studying Potassium Channels. *Handb. Exp. Pharm.* 2021, 267, 83–111.
- 6) Kuzmenkov, A.I.; Grishin, E.V.; Vassilevski, A.A. Diversity of Potassium Channel Ligands: Focus on Scorpion Toxins. *Biochemistry* 2015, 80, 1764–1799.
- 7) Orlov, N.A.; Ignatova, A.A.; Kryukova, E.V.; Yakimov, S.A.; Kirpichnikov, M.P.; Nekrasova, O.V.; Feofanov, A.V. Combining mKate2-Kv1.3 Channel and Atto488-Hongotoxin for the Studies of Peptide Pore Blockers on Living Eukaryotic Cells. *Toxins* 2022, 14, 858.
- 8) Attali, B.; Romey, G.; Honore, E.; Schmid-Alliana, A.; Mattei, M.G.; Lesage, F.; Ricard, P.; Barhanin, J.; Lazdunski, M. Cloning, Functional Expression, and Regulation of Two K⁺ Channels in Human T Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 8650–8657.
- 9) Voros, O.; Szilagyi, O.; Balajthy, A.; Somodi, S.; Panyi, G.; Hajdu, P. The C-Terminal HRET Sequence of Kv1.3 Regulates Gating Rather than Targeting of Kv1.3 to the Plasma Membrane. *Sci. Rep.* 2018, 8, 5937.

Биоаналитические системы на основе люциферазы светляков *Luciola mingrelica*Ломакина Г.Ю.^{1*}, Угарова Н.Н.¹¹МГУ имени М.В.Ломоносова, химический факультет;
lomakinagalina@yahoo.com

Люцифераза светляков катализирует окисление D-люциферина кислородом воздуха в присутствии АТФ и ионов магния, которое сопровождается биоллюминесценцией в области 450 - 600 нм. В нашей лаборатории получены различные мутантные формы термостабильной люциферазы светляков *Luciola mingrelica*, отличающиеся по спектрам биоллюминесценции, которые успешно применены в качестве высокочувствительных белковых маркеров для изучения специфических межмолекулярных взаимодействий в методах молекулярной диагностики. Достоинством биоллюминесцентных систем является отсутствие фонового сигнала и простота детекции - они не требуют источника возбуждающего излучения. Использование термостабильной люциферазы дает возможность проводить исследования при 37°C и выше без изменения активности фермента внутри и вне клеток в течение длительного времени, что открывает большие возможности для работы с живыми клетками.

Люцифераза как маркер внутриклеточных процессов. Тест-системы на основе живых прокариотических и эукариотических клеток, продуцирующих термостабильную люциферазу светляков, могут быть использованы для изучения любых внешних факторов физической и химической природы, влияющих на их функционирование. Биоллюминесцентные клетки позволяют регистрировать начальные стадии изменения проницаемости клеточной мембраны и оценивать степень повреждения клеток в присутствии мембрано-активных соединений, что является одним из критериев их жизнеспособности. Рекомбинантные клетки *Escherichia coli*, экспрессирующие люциферазу, использованы нами для изучения влияния колистина - полипептидного поликатионного антибиотика полимиксинового ряда. Повреждение клеточной мембраны приводит к пропорциональному увеличению активности внеклеточной люциферазы (A_{ex}). Остаточная концентрация живых клеток пропорциональна активности фермента внутри клетки (A_{in}). Для изучения эффективности действия мембрано-активных сапонинов (дигитонина и его аналогов диосцина и протодиосцина) мы разработали тест-систему для непрерывной регистрации процесса пермеабилзации клеточной мембраны в режиме реального времени на основе клеток НЕК293, экспрессирующих люциферазу, по накоплению люциферазной активности (A_{ex}). Показали, что литическая активность сапонинов зависит не только от концентрации агента и длительности инкубации, но и от его структуры - дигитонин, проявляет высокую литическую активность за счет образования комплексов с холестерином, что приводит к образованию пор. Однако, незначительные изменения структуры у его аналогов - уменьшение числа углеводных циклов в молекуле диосцина или наличие объемного заместителя в агликоновой части молекулы протодиосцина приводит к резкому снижению их литической активности. Таким образом, разработанные тест-системы на основе живых клеток могут быть использованы для скрининга лекарственных средств и изучения механизма их действия.

Люцифераза светляков как маркер в биоллюминесцентном иммуноанализе. Мы разработали универсальный метод получения высокоактивных, стабильных и функционально активных конъюгатов термостабильной люциферазы с биоспецифичными белками (альбумином, авидином из куриных яиц и антителами) и продемонстрировали возможности их использования в различных схемах иммуноферментного анализа. Для этого к поверхностным SH-группам остатков цистеина люциферазы присоединяли целевые белки с использованием гетеробифункционального сшивающего агента - N-сукцинимидил -3-(2-пиридилдитио)-пропионата (SPDP), специфичного к SH-группам люциферазы и NH₂-группам белка. Наличие спейсера между конъюгированными белками и удаленность точек пришивки от активного центра позволило сохранить подвижность молекул, ферментативную активность и способность к аффинному связыванию. Полученные конъюгаты успешно апробированы в биоллюминесцентном иммуноанализе. Так, конъюгат Luc-Alb использовали в конкурентном ИФА для детекции микроальбуминурии, что позволило регистрировать свободный альбумин в анализируемом образце в диапазоне концентраций от 5 до 300 мкг/мл. Конъюгат Luc-Avi является универсальной аффинной меткой, позволяющий выявлять любые биотинилированные макромолекулы, такие как биотинилированные вторичные антитела. Конъюгаты люциферазы с авидином и антителами использовали для иммуноферментного определения клеток *Salmonella* с пределом обнаружения клеток 5·10⁴ КОЕ/мл. Для снижения предела обнаружения клеток *Salmonella paratyphi* А мы получили конъюгаты Luc-AntiSal и разработали псевдо-гомогенный биоллюминесцентный иммуноферментный анализ бактериальных клеток с использованием новой матрицы для захвата аналита - микрочастиц полистирола, покрытых Pluronic F108-PDS, ковалентно меченных антителами Sal. Использование этой матрицы позволило эффективно улавливать анализируемые клетки сальмонеллы в растворе и их детектировать с пределом обнаружения 2,7 x 10³ КОЕ/мл без предварительного концентрирования образца. Этот подход может быть использован для анализа бактериальных клеток в биологических образцах, продуктах питания и других анализируемых объектах.

Биологическая активность наночастиц: сравнение токсических, антиоксидантных и радиопротекторных с помощью биоллюминесцентных биотестов

Кудряшева Н.С.^{1*}

¹Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия;
n_qdr@yahoo.com

В настоящее время биологические эффекты наноструктур представляют значительный интерес для биомедицины и экологических технологий. Модифицируемость поверхностей наночастиц разнообразит их взаимодействие с окружающей средой и организмами. Эта сложность не позволяет прогнозировать биоэффекты наночастиц исключительно на основе физико-химических характеристик, поэтому должны быть задействованы интегральные и неспецифические методы биологической оценки. Биоллюминесцентные биотесты являются перспективными кандидатами для сравнения биологической активности различных наночастиц (НЧ) из-за простоты и высокой скорости анализа. В данном исследовании биоллюминесцентные биотесты были адаптированы для мониторинга и сравнения биоэффектов различных НЧ. Для мониторинга токсичности, антиоксидантной активности и радиопротекторных свойств наносоединений разработаны и применены клеточный и ферментативный биотесты (светящиеся морские бактерии *Photobacterium phosphoreum* и их ферментативные реакции соответственно). В качестве сигнального физиологического параметра использовали интенсивность биоллюминесценции. Исследованы НЧ, различающиеся структурой ядра и модификацией поверхности: (1) фуллеренолы с разным размером каркаса, количеством кислородных заместителей, участием эндодерального и экзодерального металла, (2) НЧ оксида железа с разными модификаторами поверхности, (3) НЧ золота, а также (4) гуминовые вещества - наноструктуры природного происхождения. Были использованы два дополнительных метода: содержание активных форм кислорода (АФК) оценивали с помощью хемилюминесцентного люминольного метода, а бактериальную инфраструктуру отслеживали с помощью электронной микроскопии. Специфические эффекты НЧ объясняли гидрофобными взаимодействиями с участием клеточных мембран, сродством к электрону и нарушением баланса АФК в биоллюминесцентных системах. Таким образом, биоллюминесцентные биотесты, клеточные и ферментативные, являются подходящими экспресс-инструментами для изучения и сравнения биоэффектов НЧ и нанообъектов.

Биоллюминесцентный анализ слюны для мониторинга утомления организма

Степанова Л.В.^{1*}, Коленчукова О.А.^{1,2}, Жукова Г.В.¹

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия;

²Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия;
slyudmila@mail.ru

Проблема профилактики утомления обучающихся актуальна для любого возраста и разного учебного заведения. Предложена экспрессная оценка состояния здоровья - ферментативное биоллюминесцентное тестирование слюнной жидкости. Фиксируется изменение интенсивности свечения в сине-зеленой области спектра, обусловленное угнетением ферментативной реакции при воздействии биохимического состава слюны на субстраты биоллюминесцентных реакций и активность ферментов светящихся бактерий: NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза. Важной характеристикой биотеста является неинвазивность и экспрессность, позволяющие безболезненно и быстро контролировать состояние организма по изменению уровня свечения при появлении нагрузок на организм. Выявление реакции организма при помощи интегрального биоллюминесцентного показателя слюны может быть представлено как надежный инструмент для определения утомления организма.

Цель работы – оценка степени утомления организма обучающихся и выявление причины ее возникновения после учебной нагрузки.

В исследовании участвовали три группы обследуемых из г. Красноярск: 1 группа – учащиеся 8 класса МАОУ Гимназия № 13 "Академ" (n=15), 2 группа - учащиеся 10 класса МАОУ Лицей № 1 (n=22), 3 группа – студенты 1 курса ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого (n=30). Среди обследуемых было девушки и юноши, которые имели разную академическую успеваемость.

Функциональное состояние организма участников обследовали при помощи биоимпедансного анализа состава тела (Tanita BC-587, Япония), обследование физического развития организма проводили сотрудники лаборатории спорта и туризма СФУ, остроту зрения - сотрудники Глазного центра г. Красноярск.

Всех участников тестировали до и после учебной нагрузки, т.е. для школьников – в один из учебных дней, для студентов – в один семестровый экзамен. Материалом исследования служила слюнная жидкость, которую собирали путем самостоятельного сплевывания.

Биоллюминесцентное тестирование проводили с использованием авторской платформенной технологии биоллюминесцентного ферментативного биотестирования (патент РФ № 2017106705). Тестирование проводили на планшетном люминометре (TriStar LB 941, Германия) с использованием комплекса реагентов «КРАБ» (ИБФ СО РАН, Красноярск).

Реакцию биотеста определяли по уровню тушения биоллюминесцентного свечения по сравнению с контролем - интегрального биоллюминесцентного показателя. Показатель до учебной нагрузки считали как норма, после учебной нагрузки – показатель с нагрузкой. Биоллюминесцентные показатели слюны до и после учебной нагрузки сравнивали и определяли разницу биоллюминесцентного показателя слюны (вычитали показатели после и до учебной нагрузки). Величина разницы биоллюминесцентного показателя слюны показывала степень перегрузки (устомление) организма. Малая величина разницы биоллюминесцентного показателя указывала на меньшее утомление организм обучающихся.

Статистическая обработка данных произведена в программе Statistica. Достоверность различий рассчитывали по критерию Вилкоксона, корреляцию – по критерию Спирмена.

Результаты биоллюминесцентного тестирования показали, что биоллюминесцентный показатель слюны всех обучающихся после учебной нагрузки достоверно ниже, чем в начале ($p > 0,05$), т.е. общее состояние обучающихся изменилось. Чем выше академический статус учреждения, тем ниже биоллюминесцентный показатель слюны обучающихся.

Обучающиеся (независимо от пола) с низкой академической успеваемостью имели пониженный биоллюминесцентный показатель после учебной нагрузки и повышенный – для обучающихся с высокой успеваемостью.

Анализируя величины разницы биоллюминесцентного показателя слюны после и до учебной нагрузки, выявлены две группы обучающихся с разной степенью утомления.

В первую группу вошли обучающиеся с положительной разницей (когда биоллюминесцентный показатель после учебной нагрузки выше до нагрузки) или отрицательной разницей (когда биоллюминесцентный показатель после учебной нагрузки ниже до нагрузки), где величина разницы показывала перегрузку организма. Вторую группу составили обучающиеся с нулевой разницей биоллюминесцентного показателя, которая указывала об отсутствии утомления организма.

Выявлено, что величина разницы биоллюминесцентного показателя слюны взаимосвязана с физиологическими данными организма. Разница биоллюминесцентного показателя слюны отсутствует для обучающихся с физиологическими и функциональными показателями в пределах нормы. Положительная разница свойственна для обучающихся, которые имели низкое содержание жировой массы ($r = -0,5$; $p < 0,05$), нормальный показатель динамической силы ($r = 0,5$; $p < 0,05$) и низкую остроту зрения ($r = 0,5$; $p < 0,05$). Отрицательная разница свойственна обучающимся с дефицитом мышечной массы ($r = 0,4$; $p < 0,05$), повышенным артериальным давлением ($r = -0,5$; $p < 0,05$) и низкой остротой зрения ($r = 0,5$; $p < 0,05$).

Таким образом, показано, что положительная или отрицательная разница биоллюминесцентного показателя слюны обучающихся, определяемая сравнением после и до учебной нагрузки, позволила выявить наличие перегрузки в организме, а величина разницы биоллюминесцентного показателя слюны указывала о степени утомления организма. Степень утомления организма обучающихся зависела от состояния функционирования организма. Учебная нагрузка в школе или в вузе не утомляла вовсе или утомляла меньше всего обучающихся, которые имели нормальное функциональное и физическое развитие.

1. Патент РФ № 2017106705. Способ определения уровня стрессоустойчивости человека. Кратасюк В.А., Жукова Г.В., Коленчукова О.А., Сутормин О.С., Есимбекова Е.Н., Гульнов Д.В., Степанова Л.В. Оpubл. 28.08 2018.

Биоллюминесценция гребневика *Pleurobrachia pileus* (O. F. Müller, 1776) в летний сезон

Темных А.В.¹, Силаков М.И.¹, Машукова О.В.^{1*}

¹ФИЦ ИнБЮМ, ИМБИ РАН;

olgamashukova@yandex.ru

Способность испускать свет в результате биохимической реакции называется биоллюминесценцией и, в отличие от других видов люминесценции, присуща только живым организмам, имеющим специализированный ферментативный аппарат или биосубстрат. Биоллюминесценция является важным элементом функционирования пелагических сообществ. Это связано с экологической ролью света в жизни гидробионтов. Биоллюминесценция

используется для внутривидовой и межвидовой коммуникации, для привлечения жертвы и отпугивания хищников.

Способность к биолюминесценции, обнаруженная у многих морских гидробионтов, выявлена и у представителей желтелого макропланктона – гребневиков (*Stenophora*). Три вида гребневиков, играющих важную роль в экосистеме Черного моря, являются и доминирующими по биомассе планктонными видами. Наиболее полно изучена биолюминесценция двух видов-вселенцев – *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 (*Lobata*) и *Beroe ovata* Bruguière, 1789 (*Beroidea*). Светимость третьего – *Pleurobrachia pileus* (O. F. Müller, 1776) (*Cidippida*) является спорным моментом. На данный момент многие аспекты биолюминесценции *P. pileus* не известны.

Биологический материал для исследования собран на 26 станциях в научном рейсе №102 НИС «Профессор Водяницкий» в период с 10.06 по 01.07.2018. Для сбора проб использовали макропланктонную сеть Богорова-Раса (ячей 400 мкм, входное отверстие 0.5 м²). Всего исследовано 498 объектов размером 0.4-2.0 см (орально-аборальная длина).

Исследование параметров свечения проводилось на лабораторном биофизическом комплексе «Свет» методом механической и химической стимуляции отдельного объекта. В качестве механического стимулятора использовалась морская вода объемом 2 мл, вводимая с помощью поршневого устройства с созданием турбулентного течения жидкости в кювете. Химическая стимуляция проводилась добавлением 2 мл 96% этанола ламинарным течением.

Основными энергетическими параметрами биолюминесцентного сигнала являются амплитуда (A), общая энергия сигнала (E), временным параметром выбрана общая длительность сигнала (L).

Было выявлено, что биолюминесцентную реакцию *P. pileus* в летнее время на механическую и химическую стимуляцию проявляют все размерные группы данного вида.

Биолюминесцентный сигнал этого вида мог состоять как из отдельных острых импульсов, неравномерно отстоящих друг от друга, так и представлять собой единый импульс большой длительности со множественными пиками-вершинами. Четкой связи между формой импульса, размерами вида и сезоном не обнаружилось. Кроме того, при химической стимуляции, после которой особь погибала, последний импульс часто имел пологие и длительные фронты нарастания и спада.

Величины амплитуды биолюминесцентного сигнала различаются при механическом и химическом типах стимуляции. Средняя по всем размерным группам амплитуда при механической стимуляции колебалась от 0.02 до $0.14 \cdot 10^{-3}$ мкВт·л·см⁻². При химической стимуляции минимальная по группам средняя амплитуда A_{cp} составляла $0.12 \cdot 10^{-3}$ мкВт·л·см⁻², максимальная – $0.23 \cdot 10^{-3}$ мкВт·л·см⁻². Амплитуда биолюминесцентного сигнала у всех групп при механической стимуляции и в утреннее, и в ночное время была ниже, чем при химической. Наибольшие величины амплитуды отмечены у групп с размерами 12 мм (утром) и 18 мм (ночью) при химической стимуляции.

В светлое время суток при механической стимуляции средняя по всем группам амплитуда составляла $0.08 \cdot 10^{-3}$ мкВт·л·см⁻². В темное время суток она была незначительно выше утренней величины и составила $0.09 \cdot 10^{-3}$ мкВт·л·см⁻². При химическом типе стимуляции утром и ночью средняя по группам амплитуда составляла $0.15 \cdot 10^{-3}$ мкВт·л·см⁻², максимальные величины при этом наблюдались в размерной группе 12 мм. Почти для всех групп утром длительность сигнала значительно (в 2-4 раза) превышала таковую в ночное время, как при механической стимуляции, так и при химической.

Длительность и энергия сигнала ночью в большинстве размерных групп были ниже утренних величин, эта закономерность нарушалась иногда лишь для групп с размерами 14 и 16 мм. Средняя для всех размерных групп длительность сигнала L_{cp} варьировала от 1.25 до 2.82 с при механической стимуляции и от 0.97 до 2.39 с при химической. При химическом типе стимуляции максимальные длительности сигнала в разных группах достигали $L_{max}=5-6$ с.

Сравнивая значения основных параметров биолюминесцентного сигнала *P. pileus* с *B. ovata* и *M. leidyi*, можно заметить сходство в суточном ритме амплитуды биолюминесцентного сигнала. Так, у *B. ovata* минимум приходится на 10 часов утра, а максимум на 01 час ночи, у *M. leidyi* минимум выпадает на 7-10 часов, а максимум на 13 и 01 час ночи, что соответствует и максимуму, и минимуму в значениях амплитуд у *P. pileus*. Однако, у *P. pileus* в летний сезон не выявлено такой явной зависимости амплитуды сигнала от размера особи, как у *B. ovata* и *M. leidyi*.

В летний сезон при химическом типе стимуляции в среднем у всех размерных групп амплитуда была выше примерно в два раза, чем при механическом. Для длительности сигнала не отмечено какой-либо общей закономерности.

Работа выполнена в рамках темы госзадания № 121041400077-1 «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом».

Биосенсоры и ферментативные биотесты на основе ферментов светящихся организмов

Кратасюк В.А.^{1,2*}

¹*Сибирский федеральный университет;*

²*Институт биофизики СО РАН;*

VKratasyuk@yandex.ru

Исторически применение биоллюминесценции в токсикологии началось с использования светящихся бактерий, и они до сих пор широко используются. В отличие от классических тестируемых объектов, таких как парameции, водоросли, дафнии и т.п., анализ в биотестах на светящихся бактериях происходит быстрее (<30 мин). Однако, как и в случае других организмов, светящиеся бактерии имеют много недостатков, связанных с использованием живых объектов. Так, трудности поддерживать стабильное состояние бактериальной культуры во время измерений и при хранении приводят к низкой точности измерения. При этом реакция бактерий на токсичные вещества неоднозначна и выражается как в уменьшении, так и в увеличении интенсивности светоизлучения, что часто приводит к неоднозначной интерпретации результатов. Из-за этих недостатков биотест на светящихся бактериях также не дает надежных результатов. Для решения проблем ферментативного анализа и биотестирования предлагается новый подход к разработке ферментативных биосенсоров, а также биотестов на токсичность. В противовес методам химического анализа, которые занимаются поиском в окружающей среде известных загрязнителей и токсичных веществ и сравнивают их концентрацию с ПДК, предлагаются методы ферментативного биотестирования, позволяющие решить проблему обнаружения неизвестных многочисленных химических соединений в окружающей среде, пищевых продуктах и др. объектах. Ферментативные биотесты дают интегральную оценку качества или загрязнения анализируемой среды и, также как классические биотесты, показывают влияние вредных веществ на функции живых организмов (рыбы, водоросли, растения, дафнии, бактерии и т.д.), но в качестве тест объекта используют ферментативные реакции, отвечающие за биологические функции, например, дыхание, подвижность и т.д. Предложена новая методология комплексного ферментативного биотеста, предусматривающая замену живых организмов, используемых в качестве тест-систем в биотестах, на набор репрезентативных ферментативных систем, составляющих комплексных ферментативный биотест. Каждая из ферментативных систем моделирует, как правило, одну ключевую функцию организма. Выявлены принципы выбора ферментных систем исходя из задач исследования. Определены составы такого теста для исследования загрязнения городских и сельскохозяйственных почв, на основе специфического действия токсикантов на ферменты. Была разработана методология получения иммобилизованных реагентов «Энзимолжум», содержащих в своем составе ферменты и их субстраты для проведения одного измерения, по сути являющихся биологическим модулем биосенсора. Предлагаемые подходы обеспечивают ферментативным биотестам ценовые преимущества, универсальность, высокую чувствительность и точность, быстрый отклик, а реагенты обладают стабильностью и увеличенным сроком хранения. Была разработана экспериментальная ферментативная модель организма (ФМО) как новый комплексный биотест для оценки качества почвы. ФМО используется также для мониторинга природных и промышленных водных экосистем, загрязнения воздуха, а также для анализа качества пищевых продуктов, разнообразных материалов, включая наноматериалы.

Влияние брожения на длительное фотообразование водорода клетками *Chlamydomonas reinhardtii* при минеральном голодании

Петрова Е.В.^{1*}, Волгушева А.А.¹, Кукарских Г.П.¹, Антал Т.К.²

¹*МГУ;*

²*Псковский государственный университет;*

eslepova@list.ru

Недостаток макроэлементов, таких как азот, фосфор, сера, железо и магний – один из ключевых факторов, играющих существенную роль в процессах жизнедеятельности фитопланктона. Особое воздействие нехватка этих минеральных веществ оказывает на процесс длительного фотообразования водорода у некоторых зеленых микроводорослей, входящих в состав фитопланктонных сообществ, что является их специфической ответной реакцией на условия стресса. Основой такого ответа водорослей является взаимодействие между аэробными и анаэробными процессами внутри клетки, обеспечивающих микроорганизмы энергией в условиях минерального голодания. При этом на сегодняшний день достаточно подробно изучены участие и роль первичных процессов фотосинтеза, а также запасаания (и расходования) крахмала при продукции водорода на свету клетками зеленых

микроводорослей. В то же время влияние реакций брожения на фотообразование водорода у голодающих культур эукариотических микроорганизмов изучено в меньшей степени.

Целью работы являлось исследование влияния процессов брожения в клетках зеленых микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii* дикого типа и штамма-мутанта на продолжительное фотообразование молекулярного водорода в условиях дефицита серы. Для этого в фотореакторах при постоянном свете и отсутствии серы в среде проводили следующие измерения и сравнительный анализ: содержание водорода в газовой фазе реактора, содержание крахмала в клетках, измерение фотосинтетической активности и скорости дыхания в культурах мутанта *Ch.reinhardtii* pfl 1-1 без пируватформатлиазной активности и у соответствующего контроля *Ch.reinhardtii* CC-125.

Показано, что, в отличие от дикого типа, клетки мутантного штамма *Ch.reinhardtii* pfl 1-1 характеризуются гораздо более выраженной способностью к образованию водорода при длительном минеральном дефиците, хотя и более поздним его выходом относительно контрольного организма. Тем не менее, pfl 1-1 показал гораздо большую устойчивость по фотообразованию водорода в условиях минерального стресса. Динамика содержания и потребления крахмала внутри клеток контроля (дикого типа) и мутанта вследствие эксперимента показали свою относительную схожесть. Однако, количество запасаемого крахмала *Ch.reinhardtii* pfl 1-1 за первые 48 часов оказалось практически в 2 раза выше относительно *Ch.reinhardtii* CC-125. Такой результат указывает на значительно более выраженную способность штамма-мутанта накапливать и расходовать крахмал. Известно, что метаболизм крахмала – один из основных факторов, влияющих на способность микроводорослей выделять водород. Другим таким фактором является активность первичных реакций фотосинтеза. Проведенные эксперименты по оцениванию фотосинтетической активности, а также дыханию клеток культур, показали сохранение гораздо более высокой ФС активности на поздних стадиях голодания культуры *Ch.reinhardtii* pfl 1-1 относительно дикого типа. Дыхание в клетках изменялось сходным образом, но количественно скорость была на 20% выше у мутанта. Таким образом, мутант характеризуется более интенсивным накоплением и расходом запасенного крахмала, более высокой фотосинтетической активностью на поздних стадиях серного голодания, что оказывает стимулирующее действие на длительное фотообразование водорода, и отражает, в целом, большую устойчивость к стрессу генетически модифицированного штамма.

Полученные в результате исследований данные позволяют сделать вывод о том, что процесс брожения оказывает существенный эффект на длительность образования на свету молекулярного водорода культурой *Ch. reinhardtii*, находящейся в условиях нехватки серы, особенно на поздних стадиях. Мутантный штамм *Ch.reinhardtii* pfl 1-1 может быть перспективным объектом для биотехнологии, как продуцент водорода – альтернативного, экологически чистого источника энергии.

Ключевые слова: Фотообразование водорода, Брожение, Фотосинтез, Зеленые микроводоросли, Адаптация к стрессу

Влияние динамики микроокружения триптофана на параметры его флуоресценции в зависимости от температуры

Горохов В.В.¹, Нокс П.П.¹, Корватовский Б.Н.¹, Горячев С.Н.¹, Пашенко В.З.^{1*}, Рубин А.Б.¹

¹МГУ, биологический факультет;

vz.paschenko@gmail.com

Флуоресценция триптофанилов в составе белков широко используется в качестве природного индикатора их внутримолекулярной конформационной динамики, тесно связанной с функциональной активностью, в частности, при изменении температуры. Источником информации о характере внутримолекулярной динамики ближайшего окружения возбужденной молекулы триптофана (Trp) являются температурные зависимости положения спектров и длительности флуоресценции Trp. Кинетика затухания флуоресценции Trp и в растворе, и в составе полипептидов многокомпонентна. В зависимости от типа растворителя, pH, регистрируют 2-3 компоненты флуоресценции с временами от сотен пикосекунд до ~ 10 нс. Характер внутримолекулярной микроконформационной динамики водно-белковой среды, влияющей на функциональную активность, во многом определяется состоянием системы водородных связей макромолекулы. Определенная информация для понимания механизмов происходящих при этом процессов может быть получена, в том числе, путем сравнительного анализа температурных зависимостей параметров флуоресценции триптофана в растворе и в составе белка.

Известно, что в окружении молекулы триптофана в водной среде образуется упорядоченная система водородных связей, имеющая вид цвиттерионного комплекса, которая оказывает существенное влияние на динамику возбуждений молекулы Trp. В работе было детально исследовано изменение спектральных и кинетических параметров, описывающих процессы затухания флуоресценции триптофана в водной среде при импульсном фотовозбуждении в зависимости от температуры в диапазоне -170°C ÷ +20°C. Предложена модель и

проведен количественный анализ скоростей прямых и обратных электронных переходов в молекуле триптофана из возбужденного состояния в основное состояние и в состояние с переносом заряда (CTS). Исходя из полученных в работе экспериментальных и теоретических данных были выделены три области в спектре флуоресценции Trp: коротковолновая область (300 нм < λ < 386 нм), промежуточная область (386 нм < λ < 400 нм) и длинноволновая область (400 нм < λ < 470 нм), для которых температурная зависимость скорости образования CTS имеет различный характер. Показана ключевая роль структурных перестроек в системе водородных связей, определяющих нелинейный характер изменения параметров флуоресценции триптофана в выделенных спектральных областях

Выявленный нелинейный характер зависимости времени затухания быстрых (t_1 , единицы нс) и медленных (t_2 , около 10 нс) компонент флуоресценции водного раствора молекул триптофана от температуры объяснен возникновением дополнительного канала дезактивации Trp* - переносом электрона от индольной части молекулы триптофана на водородные связи водного окружения и затем на ее амидные группы. В результате образуется состояние с переносом заряда Trp+R⁻. Дезактивация этого CTS происходит как в результате обратного перехода из данного состояния в возбужденное состояние Trp, так и за счет либо флуоресценции, либо в процессе тепловой релаксации в основное состояние.

Использованный в работе спектрально-динамический подход при исследовании температурных зависимостей скоростей дезактивации возбужденных состояний Trp позволил также обнаружить возникновение конформационных (фазовых) переходов в системе водородных связей в окружении Trp* и CTS в температурном диапазоне от -80°C до 20°C. В этом температурном диапазоне наблюдается нелинейное поведение таких параметров, как t_1 , t_2 , энергии активации E_a , а также скорости сольватационного сдвига спектров флуоресценции. Важно отметить, что в диапазоне температур -110°C - -80°C молекула Trp* сольватируется быстрее, чем CTS, тогда как при более высоких температурах ($T > -80^\circ\text{C}$) скорость сольватации состояния Trp⁺+R⁻ становится больше, чем скорость сольватации Trp*. Этот факт объяснен нами тем, что в температурном диапазоне -80°C - 20°C в окружении CTS структурный (фазовый) переход захватывает большее число Н-связей, чем в окружении Trp*. Именно в температурном диапазоне -80°C - 20°C происходит отступление температурной динамики переходов возбужденной молекулы триптофана от стандартного Аррениусовского поведения с постоянным значением E_a . Таким образом, динамика системы водородных связей играет определяющую роль в возникновении нелинейного характера изменения параметров, описывающих дезактивацию Trp* и CTS. Очевидно, что дальнейшее сопоставление данных результатов с аналогичными исследованиями для триптофанилов в составе белков позволит получать новую информацию о том, в какой степени различия в параметрах флуоресценции триптофана в составе функционального белка, выявляемые при размораживании охлажденных в различных условиях образцов, могут быть обусловлены непосредственными изменениями в характере его взаимодействия с белковыми молекулами и с окружающим растворителем.

Влияние длины волны, мощности и экспозиции лазерного излучения на генерацию синглетного кислорода

Маковик И.Н.^{1*}, Винокуров А.Ю.¹, Ератова Л.В.¹, Дрёмин В.В.¹
¹Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева;
irina.makovik@gmail.com

Синглетный кислород (СК) является высокореакционной формой молекулярного кислорода и играет важную роль во многих физических, химических и биологических процессах, а также в терапии различных патологий. Повышение интереса к СК вследствие его высокой химической активности способствовало разработке различных подходов к его генерации в биологических средах. Так, в последнее время активно изучается механизм прямой оптической генерации СК светом определённых длин волн без использования фотосенсибилизаторов. Наравне с исследованием влияния лазерно-индуцированного СК на протекание физиологических процессов на клеточном и тканевом уровнях активно разрабатываются и изучаются подходы к его обнаружению и количественному определению. Это является важной задачей для оценки эффективных доз и поиска оптимальных параметров возбуждения триплетного кислорода. В этой работе изучена влияние ряда длин волн, мощностей и экспозиций лазерного излучения на генерацию СК, а также проанализированы преимущества и недостатки существующих подходов к количественному измерению образования СК.

На сегодняшний день из-за высокой реакционной способности СК существует ограниченное количество возможных подходов к его детектированию. В работе рассмотрены полярографический метод с использованием респирометра Oxytherm+R (Hansatech Instruments, Великобритания) и метод с применением флуоресцентного зонда Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG, Invitrogen, США). Поскольку основное триплетное состояние кислорода имеет несколько полос поглощения в спектральном диапазоне от 390 нм до 1300 нм, при которых

возможно образование СК, рассмотрены длины волн лазерного излучения 1267 нм и 1064 нм. Данные длины волн обладают наибольшим поглощением триплетной формой кислорода. В работе источники лазерного излучения 1244 нм и 1122 нм использованы в качестве контрольных, которые, по литературным данным, не активируют переход триплетного кислорода в синглетное состояние.

Исследование полярографическим методом включало измерение уровня растворённого кислорода в ddH₂O и 5 мМ растворе L-гистидина в ddH₂O. L-гистидин использован в качестве «химической ловушки» благодаря его способности к взаимодействию с СК, что делало возможным полярографическое измерение снижения концентрации растворённого кислорода. Лазерно-индуцированная генерация СК осуществлялась через стеклянную стенку измерительной камеры, в которой поддерживалась температура 26 °С. Измерение с применением селективного флуоресцентного зонда SOSG осуществлялось с использованием микроскопа Zeiss LSM 900 (Carl Zeiss AG, Германия) с объективом 10×. Для возбуждения флуоресценции зонда использовался лазер с длиной волны 488 нм и мощностью 0,1 % от максимальной. Подача лазерного излучения в ходе экспериментов осуществлялась с противоположной стороны от объектива микроскопа. Протокол включал этапы регистрации базового уровня сигнала (3 мин), уровня сигнала в процессе генерации СК лазерным излучением (длительность зависела от выбранной дозы), а также регистрацию сигнала после воздействия (6 мин). Анализ влияния факторов времени (экспозиции лазерного излучения) и мощности на образование СК осуществлялся при воздействии различных доз (50, 100, 150, 200 и 250 Дж/см²) лазерного излучения при фиксированном значении мощности 50 мВт, а также для дозы 200 Дж/см² при различных мощностях равных 50, 100 и 150 мВт.

Анализ результатов измерений полярографическим методом показал, что содержание растворённого кислорода в растворе L-гистидина в измерительной камере после воздействия излучением на длинах волн 1267 нм и 1064 нм оказалось ниже по сравнению с контрольными лазерами. Однако, несмотря на показанные различия между исследуемыми лазерами, данный подход характеризуется недостаточной чувствительностью к детектированию различных доз генерируемого СК. Кроме того, чувствительность полярографического метода к изменению температуры даже при её стабилизации, предусмотренной конструкцией респирометра, делает невозможным анализ изменения сигнала в момент лазерного воздействия. Поэтому можно сделать лишь косвенную оценку после расчёта конечного снижения концентрации кислорода по сравнению с исходным её уровнем до воздействия.

Измерения с применением SOSG показали, что воздействие излучением 1267 и 1064 нм приводит к усилению интенсивности зелёной флуоресценции окисленной формы данного зонда. Прирост сигнала свидетельствует о продукции СК и его селективном взаимодействии с SOSG. При этом длина волны 1267 нм оказывает более значительное влияние. Увеличение интенсивности флуоресценции зарегистрировано и при воздействии излучением с длиной волны 1244 нм, что может указывать на образование СК и некорректное его использование в качестве контрольного лазера. Анализ результатов при воздействии различных доз излучения показал чувствительность подхода к различиям в количестве генерируемого СК. Воздействие мощностями 50, 100 и 150 мВт дозой 200 Дж/см² выявило большее влияние на количество выработанного СК фактора времени воздействия, чем мощности, что вероятнее всего связано с малым временем жизни СК.

Рассмотренные подходы к обнаружению лазерно-индуцированного СК характеризуются разной чувствительностью к его обнаружению. Данные методы позволяют осуществить лишь косвенную оценку и не могут обеспечить контроль и управление генерацией СК в процессе лазерного воздействия. В случае полярографического метода можно измерить только образующийся в растворе или диффундирующий из ткани СК. Но последнее представляется невозможным из-за малого времени жизни СК. Применение SOSG существенно ограничено его низкой проникающей способностью через клеточную мембрану. Всё это указывает на необходимость разработки новых высокочувствительных методов детекции СК.

Работа выполнена при поддержке РФФИ в рамках проектов №22-75-10088 (дизайн эксперимента, разработка лазерных источников, определение чувствительности методов обнаружения СК) и №21-75-00086 (анализ дозозависимого эффекта при воздействии лазером с длиной волны 1267 нм).

Влияние отсутствия α -карбоангидразы 2 на state transitions в растениях *Arabidopsis thaliana*

Надеева Е.М.^{1*}, Игнатова Л.К.¹, Руденко Н.Н.¹, Иванов Б.Н.¹, Ветошкина Д.В.¹

¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН - обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН;

zhurikova-alena@yandex.ru

«State transitions» (ST) представляет собой механизм акклимации, при котором происходит перераспределение поглощенной энергии возбуждения между двумя фотосистемами (ФС) за счет обратимой

миграции части светособирающего комплекса ФС2 (ССК2) между ФС2 и ФС1. При освещении связывание восстановленного пластохинона в цитохромном комплексе активирует STN7 киназу, которая фосфорилирует белки Lhcb1 и Lhcb2, что приводит к диссоциации этих белков от ФС2 и миграции к ФС1 (состояние 2). В темноте происходит дефосфорилирование Lhcb1 и Lhcb2 TAP38/PPH1 фосфатазой, что приводит к диссоциации этих белков от ФС1 и возвращению к ФС2 (состояние 1). Ранее нами показано, что отсутствие в мутантных растениях *Arabidopsis thaliana* α -карбоангидразы 2 (α -KA2), катализирующей реакцию $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$, приводит к меньшему восстановлению пула пластохинона и большей скорости электронного транспорта через ФС2 по сравнению с растениями дикого типа (ДТ). Исходя из этого интересным кажется оценка переходов ССК2 из состояния 1 в состояние 2 и обратно в данных мутантных растениях.

Переход из состояния 1 в состояние 2 оценивали классическим подходом – измерением низкотемпературной флуоресценции хлорофилла а. При освещении светом возбуждающим предпочтительно ФС2 в растениях ДТ, происходило изменение отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 на 22%, а в мутанте по α -KA2 только на 8-13% по сравнению с значениями, полученными после адаптации к темноте. Что говорит о менее выраженном переходе ССК2 от ФС2 к ФС1. Обратный переход части ССК2 от ФС1 к ФС2 оценивали при комнатной температуре с помощью измерения нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла а (НФТ), выраженного параметром NPQ. Между 15-ой и 24-ой минутами (ST-зависимая релаксация) после выключения действующего красного света в мутанте по α -KA2 величина NPQ была в 2 раза ниже, чем в растениях ДТ. Таким образом, обнаружена более низкая способность мутантных растений с заблокированным синтезом α -KA2 осуществлять и обратный переход из состояния 2 в состояние 1 по сравнению с растениями ДТ. Возможной причиной наблюдаемых отличий в протекании state transitions может быть изменение активности STN7 киназы и накопления фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2 в мутантных растениях. С помощью Вестерн-блот анализа показано, что содержание фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2 в мутанте по α -KA2 было меньше, чем в ДТ. Интересно, что общий размер ССК2 в мутанте больше, чем в ДТ за счет большего содержания белков Lhcb1 и Lhcb2.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-74-10088

Влияние пероксида водорода на структурно-функциональную реорганизацию светособирающего комплекса антенны фотосистемы 2

Балашов Н.В.^{1*}, Ветошкина Д.В.¹, Борисова М.М.¹

¹ИФПБ РАН;

kbalashov@mail.ru

Важнейший фактор устойчивости фотосинтезирующих организмов их способность адаптироваться к быстроменяющимся условиям среды, в частности, к флуктуации освещенности. Одним из адаптационных механизмов при изменении спектрального состава света является процесс state transitions, т.е. переходы состояний. State transitions это обратимая миграция части светособирающих комплексов фотосистемы 2 между фотосистемами. Первым этапом state transitions является фосфорилирование белков Lhcb1 и Lhcb2 светособирающей антенны фотосистемы 2 с помощью STN7 киназы. Известно, что увеличение освещенности приводит к ингибированию STN7 киназы и накопления фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2. Однако до сих пор остается не выясненным механизм ингибирования киназной активности на высоком свете.

Ранее показано, что повышение освещенности приводит к увеличению продукции активных форм кислорода в хлоропластах, при чем за счет увеличения продукции пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны. Образование пероксида водорода в непосредственной близости от местоположения STN7 киназы при повышении освещенности позволяет предположить участие пероксида водорода в ингибировании киназной активности.

В данной работе проведено исследование влияние пероксида водорода на светозависимое накопление фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2. Объектом исследования были тилакоидные мембраны, изолированные из растений *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0. Первым этапом работы стал подбор концентрации пероксида водорода, не оказывающих влияния на скорость транспорта электронов по электрон-транспортной цепи. В качестве рабочих концентраций были выбраны 250 и 500 μM H_2O_2 .

Было показано, что добавка пероксида водорода в выбранных концентрациях приводит к снижению светозависимого накопления фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2. В качестве дополнительного контроля проводили оценку содержания фосфорилированного белка D1 – продукта другой киназы STN8, количество данного белка не изменялось в присутствии и отсутствие пероксида водорода. Полученные результаты демонстрируют ингибирующее влияние пероксида водорода специфично на протекание процесса state transitions.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №22-74-10088.

Влияние структуры фотосенсибилизатора на его адсорбцию и фотодинамическую активность на бислойной липидной мембране

Константинова А.Н.^{1*}, Зыкова Д.Д.¹, Макринский К.И.¹, Уродкова Е.К.¹, Соколов В.С.¹

¹ИФХЭ РАН;

anna.n.gavrilchik@gmail.com

Направленный синтез новых перспективных для фотодинамической терапии фотосенсибилизаторов (ФС) требует разработки новых подходов к оценке их эффективности и определения влияющих на неё структурных факторов. Эффективность большинства ФС определяется в исследованиях либо на клеточных культурах, либо в растворах, что не позволяет получить количественную информацию об адсорбционных и фотодинамических свойствах ФС на мембране. Существует ряд работ, посвященных исследованию этих свойств на системах, моделирующих клеточную мембрану, которые в основном различаются выбором мишени синглетного кислорода (МСК) и способом регистрации её окисления.

Нами была разработана оригинальная методика для оценки фотодинамической активности ФС на бислойной липидной мембране (БЛМ) [1,2]. Она основана на измерении межфазных скачков потенциалов, возникающих при адсорбции, десорбции и/или разрушении исследуемых молекул, тремя различными методами. Сравнение полученных результатов позволяет определить, способны ли молекулы ФС проникать через мембрану, на какой глубине расположены их заряженные группы, а также оценить поверхностную плотность молекул в мембране. Фотодинамическую активность ФС, как и в других исследованиях, оценивают по скорости разрушения введенной в мембрану молекул МСК, адсорбция и разрушение которых регистрируется по изменению граничного потенциала. Применение этой методики для изучения коммерчески доступных сульфированных комплексов фталоцианина с алюминием [1] и четырежды сульфированного свободного порфирина [2], позволило установить, что фотодинамическая эффективность в значительной степени определяется адсорбцией ФС на мембране и глубиной их погружения в гидрофобную область мембраны.

Данная работа является продолжением упомянутых выше и посвящена изучению влияния структурных факторов ФС на их адсорбцию и фотодинамическую эффективность. В работе были изучены две схожие по структуре серии ФС, синтезированные в ИФХЭ РАН:

1. Комплексы порфирина с фосфором (V), различающиеся числом пиридиновых заместителей на периферии (0,1 или 2) и структурой аксиального лиганда: гидроксильный (ОН) или этоксильный (OEt);

2. Окта-катионные замещенные фталоцианины (свободный лиганд, комплексы с цинком (8bZnPc) и магнием (8bMgPc)), структура которых представлена в [3].

Адсорбция всех исследованных соединений приводит к изменению межфазных скачков потенциала, за исключением незамещенных порфиринов (не имеющих пиридиновых заместителей). Сравнение полученных данных показало, что все исследованные соединения адсорбируются на БЛМ с погружением заряженных заместителей в область фосфолипидных головок.

В случае порфиринов установлено, что структура аксиального лиганда наиболее сильно влияет на их положение в БЛМ, при этом не влияя на их сродство с мембраной. Порфирины с гидроксильными аксиальными лигандами P(OH)2 способны проходить через мембрану, в отличие от порфиринов с этоксильными P(OEt)2. Изменение граничного потенциала при адсорбции порфиринов P(OEt)2 по величине было больше, чем у P(OH)2. Данный факт, вероятнее всего, связан с различной ориентацией и положением в мембране порфиринов, имеющих разные аксиальные лиганды, что и объясняет способность проникать через мембрану только P(OH)2.

Потенциал адсорбции Фц почти не зависит от структуры иона в центре макрокольца Фц. Фц не способны проникать через мембрану. Адсорбция Фц на поверхности мембраны также регистрируется по их флуоресценции на липосомах. В буферном растворе эти соединения практически не флуоресцируют, поскольку существуют в виде агрегатов. Добавление липосом инициирует мономеризацию Фц с полным восстановлением флуоресцентных свойств. Полученные зависимости позволяют оценить константы ассоциации этих ФС с липидами DPhPC, которые составляют $4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, $5,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ для 8bZnPc и 8bMgPc соответственно.

Фотодинамическая активность ФС, которую определяли по скорости разрушения МСК, наблюдается со всеми соединениями, включая порфирины, адсорбция которых не наблюдается по изменению потенциала. Данный факт свидетельствует о том, что незамещенные порфирины также адсорбируются на БЛМ. Для порфиринов свойственна возрастающая линейная зависимость скорости разрушения МСК от концентрации ФС, причем P(OEt)2 обладают большей фотодинамической активностью, чем P(OH)2. Вероятнее всего, данное различие связано с различным положением ФС в БЛМ. С другой стороны, увеличение количества пиридиновых заместителей порфирина приводит к усилению его фотодеградаци, что приводит к уменьшению эффективности.

Концентрационная зависимость активности для Фц имеет более сложный характер: скорость разрушения МСК линейно возрастает при низких концентрациях ФС после чего выходит на плато. Данный факт можно

объяснить способностью Фц тушить синглетный кислород. Значительного различия в эффективностях Фц, имеющих различные ионы в центре макрокольца, не зафиксировано.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что фотодинамическая активность ФС в значительной степени определяется их положением и эффективностью связывания с мембраной, которая в свою очередь сильно зависит от природы заместителей на периферии макрокольца ФС и аксиального лиганда.

Работа поддержана проектом РНФ № 19-13-00410-Р.

1. Sokolov, V. S. et al. Residence time of singlet oxygen in membranes. Sci. Rep. 8, 1–11 (2018).

2. Konstantinova, A. N. et al. Adsorption and photodynamic efficiency of meso-tetrakis(p-sulfonatophenyl)porphyrin on the surface of bilayer lipid membranes. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 189, 74–80 (2018).

3. Bunin, D. A., Martynov, A. G., Safonova, E. A., Tsivadze, A. Y. & Gorbunova, Y. G. Robust route toward cationic phthalocyanines through reductive amination. Dye. Pigment. 207, 110768 (2022).

Влияние физических свойств тилакоидных мембран и морфологических особенностей хлоропластов на скорость state transitions в высших растениях

Ветошкина Д.В.^{1*}, Козулева М.А.¹, Проскуряков И.И.¹, Терентьев В.В.¹, Бережнов А.В.², Найдов И.А.¹,
Иванов Б.Н.¹, Борисова-Мубаракшина М.М.¹

¹*Институт фундаментальных проблем биологии РАН обособленное подразделение ФИЦ Пушинский
научный центр биологических исследований РАН;*

²*Институт биофизики клетки РАН обособленное подразделение ФИЦ Пушинский научный центр
биологических исследований РАН;
vetoshkina_d@mail.ru*

Фотосистемы высших растений отличаются по своим спектральным характеристикам, что в определенных условиях может быть причиной предпочтительного возбуждения только одной из двух фотосистем (ФС). Для восстановления баланса распределения энергии возбуждения между ФС запускается быстрый адаптационный механизм, называемый state transitions (ST). ST заключается в обратимой миграции части светособирающей антенны ФС2 (тримеров ССК2) между двумя фотосистемами при изменении спектрального состава света. В работе было исследовано влияние продолжительности освещения и интенсивности света на протекание процесса state transitions в листьях арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) и ячменя (*Hordeum vulgare*).

Для оценки протекания перехода ССК2 от ФС2 (состояние 1) к ФС1 (состояние 2) использовали измерения флуоресценции хлорофилла а при 77К и при комнатной температуре. Было показано более медленное развитие перехода из состояния 1 в состояние 2 в листьях растений арабидопсиса по сравнению с ячменем. Для выяснения причин наблюдаемых отличий в протекании ST в растениях арабидопсиса и ячменя нами были проанализированы свойства тилакоидных мембран, а также морфология хлоропластов исследуемых видов. Первым этапом перехода из состояния 1 в состояние 2 является фосфорилирование белков Lhcb1 и Lhcb2 с помощью STN7 киназы, которое необходимо для диссоциации ССК2 от ФС2 и присоединения к ФС1. Интересно, что мы не обнаружили различий в скорости накопления этих фосфорилированных белков в исследуемых растениях. Поэтому далее были оценены параметры, которые могут влиять на второй этап этого перехода, т.е. собственно миграцию комплексов ССК2 вдоль тилакоидной мембраны. Вязкость тилакоидных мембран, измеренная с помощью ЭПР, у арабидопсиса оказывалась выше, чем у ячменя. Используя конфокальную микроскопию, были обнаружены отличия в размере хлоропластов в листьях исследуемых видов: хлоропласты арабидопсиса оказывались достоверно больше по сравнению с хлоропластами ячменя.

Таким образом, отличия в развитии перехода из состояния 1 в состояние 2 у арабидопсиса и ячменя, по-видимому, связаны с более медленной скоростью миграции ССК2 у арабидопсиса через тилакоидную мембрану, чем у ячменя, а не различиями в фосфорилировании Lhcb1 и Lhcb2.

При исследовании влияния интенсивности света было показано, что в листьях арабидопсиса переход из состояния 1 в состояние 2 ингибировался при интенсивности света выше 300 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹, в то время как у растений ячменя этот процесс все еще наблюдался при интенсивности до 1000 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹. Протекание ST в листьях ячменя при более высоких интенсивностях света, вероятно, определяется ингибированием STN7 киназы только при интенсивностях света выше 1000 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹ т.к. при более низких интенсивностях света в листьях ячменя происходит значительное накопление фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №22-74-10088.

Выделение и характеристика каротиноид-белковых комплексов из тилакоидных мембран цианобактерии *Arthrospira platensis*

Телегина Т.А.¹, Вечтомова Ю.Л.^{1*}, Айбуш А.В.², Борзова В.А.¹, Геворгиз Р.Г.³, Буглак А.А.⁴, Крицкий М.С.¹

¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук;

²Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук ;

³Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»;

⁴Санкт-Петербургский государственный университет;
vechtomova@inbi.ras.ru

В тилакоидных мембранах фотосинтетических организмов наряду с суперсемейством хлорофилл-связывающих белков светособирающих комплексов (LHC) и реакционного центра, присутствуют низкомолекулярные светоиндуцируемые белки [1]. Полагают, что эти белки функционируют при фотозащите и сборке тилакоидных пигмент-белковых комплексов, экспрессируются конститутивно и их уровни экспрессии увеличиваются в ответ на стресс и в первую очередь на световой стресс. У мутантов, лишенных этих низкомолекулярных белков фотосинтетический транспорт электронов практически не обнаруживается. В цианобактериях, являющихся эволюционными предшественниками хлоропластов, эти белки называются Hlps (high light-inducible proteins) или SCP (small Cab-like proteins, малые хлорофилл-связывающие белки). Эти белки являются односпиральными мембранными низкомолекулярными и, как полагают, могут связывать хлорофилл, каротиноиды и липидные молекулы и участвовать в сборке фотосистемы I и II [1-2].

Мы полагаем, что такая структурирующая роль SCP/Hlp белков может быть связана с цис-конфигурацией каротиноидов в составе каротиноид-SCP белковых комплексов, присутствующих в тилакоидных мембранах, когда каротиноиды в цис- конфигурации могут являться как бы «склеивающим» началом. С целью выяснения структурирующей роли каротиноидов в фотосинтетическом аппарате разработан метод получения каротиноид-белковых комплексов из тилакоидов цианобактерии *Arthrospira planensis* (спирulina) с использованием ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте сахарозы (20-50% водный раствор). Солубилизованные с помощью детергента n-додецил-β-D-мальтозида (DDM) тилакоиды разделились при ультрацентрифугировании (220000 g, 3 часа, 40C) на шесть фракций, содержащих хлорофилл-каротиноид-белковые и каротиноид-белковые комплексы. Полученные комплексы были охарактеризованы методами УФ/видимой спектроскопии, кругового дихроизма, ИК колебательной спектроскопии (FTIR), линейного (в т.ч. резонансного) и нелинейного (BCARS) комбинационного рассеяния. Дополнительно, выделенные каротиноид-белковые комплексы подвергали разделению методом электрофореза в ПААГ и разделению в поле поперечного асимметричного потока (AF4) для оценки содержания низкомолекулярных белков. Проведено сопоставление спектров комбинационного рассеяния для каротиноидов в составе комплексов с теоретическими спектрами цис-каротиноидов, полученными методами квантовой химии с помощью нестационарной теории функционала плотности (TD-DFT) и функционала CAM-B3LYP.

В целом, показано наличие в тилакоидных мембранах спирулины каротиноидов в цис-конфигурации в составе каротиноид-белковых и хлорофилл-каротиноид-белковых комплексах, содержащих β-каротин с максимумом поглощения 340 нм и ксантофиллов (миксоксантофилла, осциллаксантина и зеаксантина) с максимумом поглощения в области 383 нм. Методом КД-спектрометрии показано, что в водных условиях солубилизованные с помощью DDM детергента каротиноид-белковые комплексы склонны к агрегации, вероятно, за счет агрегации каротиноидной составляющей комплекса. При этом фиксируется сильный сигнал КД в области цис-каротиноидов.

Работа была поддержана РНФ (грант №21-74-20155)

1. Beck J, Lohscheider JN, Albert S, Andersson U, Mendgen KW, Rojas-Stütz MC, Adamska I, Funck D. Small One-Helix Proteins Are Essential for Photosynthesis in Arabidopsis. // Front Plant Sci. 2017 Vol. 23:7

2. Rochaix JD, Bassi R. LHC-like proteins involved in stress responses and biogenesis/repair of the photosynthetic apparatus. // Biochem J. 2019 Vol. 476. P. 581

Высокая интенсивность автофлуоресценции ФАД как индикатор для выявления клеточной патологии

Брянская Е.О.^{1*}, Долгих А.И.¹, Винокуров А.Ю.¹, Дунаев А.В.¹

¹Лаборатория клеточной физиологии и патологии научно-технологического центра биомедицинской фотоники, Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева;
bryanskayae@mail.ru

Оптическая визуализация с использованием эндогенной флуоресценции ФАД, который участвует в процессах окисления жирных кислот, цикле Кребса и других окислительно-восстановительных реакциях, является одним из перспективных способов изучения метаболического статуса клеток. Возможность простого и неинвазивного определения ФАД основана на его автофлуоресценции, имеющей спектр возбуждения в диапазоне длин волн 350-500 нм с двумя пиками - при 370 и 450 нм, а спектр излучения приходится на область 500-600 нм с максимумом при 525 нм.

Согласно литературным источникам, клетки в разных физиологических состояниях имеют разные уровни интенсивности ФАД в зелено-синем спектре. Для определения физиологического состояния клеток по разнице в интенсивности сигнала ФАД в данной работе изучалась клеточная культура фибробластов кожи, после 20-дневного культивирования в питательной среде на основе DMEM (Gibco, Великобритания), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10% фетальной бычьей сыворотки (Biological Industries LTD, Израиль), пенициллин (100 ед/мл) (Gibco, США), стрептомицин (100 мкг/мл) (Gibco, США), в CO₂-инкубаторе (Thermo Scientific) при 37°C, относительной влажности 100% и содержании CO₂ 5% (Eppendorf AG). Исследования проводились с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа ZEISS LSM 900 с системой Airyscan 2 (Carl Zeiss AG, Германия) при длине волны 488 нм.

На первом этапе исследования производилась посадка фибробластов на покровные стекла толщиной 0,5 мм с предварительно нанесенной сеткой для определения местоположения отдельных клеток. Как показывает выполненный анализ, в клеточной культуре присутствовали клетки как с высокой, так и с низкой интенсивностью флуоресценции. Это можно было бы объяснить тем фактом, что клетки имели разный метаболический статус и находились на разных стадиях развития. Это позволило на основе интенсивности сигнала автофлуоресценции разделить клетки на две подгруппы: – с высоким сигналом автофлуоресценции (предположительно стареющие или патологические) и клетки с низким сигналом.

Спустя 24 часа долю некротических в культуре клеток анализировали с помощью двойного окрашивания Hoechst 33342 (5 мкм) и йодидом пропидия (20 мкм) в течение 30 мин при 37°C. Для подсчета общего количества клеток использовали Hoechst 33342, который окрашивает ядра клеток в любом физиологическом состоянии. Йодид пропидия, не способный проникать через целые мембраны и окрашивать жизнеспособные клетки, применяли для окрашивания и подсчета некротических клеток.

Согласно полученным данным, доля некротических клеток среди клеток с высокой интенсивностью автофлуоресценции ФАД составила 47,4%, тогда как среди клеток с низким сигналом автофлуоресценции ФАД – 27,3%. Интенсивный сигнал ФАД может быть связан с сильно окисленным состоянием кофермента, входящего в структуру окислительно-восстановительных ферментов.

На следующем этапе исследования для определения структуры сигнала ФАД производилось поочередное внесение растворов адrenalина (10 мкМ) для активации моноаминоксидазы (МАО-А), селегилина (20 мкМ) для ингибирования данного фермента, FCCP (2 мкМ), который является протонификатором и приводит к разобщению дыхания митохондрий, а после – KCN (1мМ), который является ингибитором комплекса IV электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). Это позволило определить уровень сигнала ФАД, связанного с МАО, а также общий пул ФАД комплекса II митохондрий. Было выявлено, что у клеток с высокой интенсивностью автофлуоресценции уровень МАО составил $12,3\% \pm 2,1$ от общего сигнала автофлуоресценции, тогда как у клеток с низкой интенсивностью – $6,4\% \pm 0,9$. Сочетание в клетках более высокого уровня пула МАО и пониженного уровня пула митохондриального ФАД может быть следствием образования при окислительном дезаминировании моноаминов соответствующих альдегидов, которые, как показывает анализ литературы, могут ингибировать сукцинатдегидрогеназу, в результате чего экспрессия данного фермента снижается. Таким образом, можно сделать вывод о нарушении работы комплекса II ЭТЦ.

Таким образом, данное исследование показывает возможность ранней диагностики различных заболеваний путем обнаружения сигнала автофлуоресценции ФАД и обнаружения клеток с высокой интенсивностью автофлуоресценции, которые преимущественно некротизированы. Низкий уровень жизнеспособности клеток с высокой интенсивностью автофлуоресценции в зелено-синем спектре может служить маркером, позволяющим осуществлять раннюю диагностику различных заболеваний, определяя точную локализацию и распространенность патологии в ткани. При этом повышенный сигнал ФАД обусловлен высокой активностью МАО, что позволяет в дальнейшем найти инструменты воздействия на данный фермент, предотвращая развитие патологического состояния клеток. Предложенный подход имеет важные преимущества,

включая неинвазивность, высокую чувствительность, безопасность и может быть применен для ранней диагностики различных заболеваний и мониторинга реакции пациентов на терапевтические вмешательства, в том числе в режиме реального времени.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации №075-15-2022-1095.

Дальний транспорт в регуляции фотосинтеза у харовых водорослей

Алова А.В.^{1*}, Булычев А.А.¹, Черкашин А.А.¹, Крупенина Н.А.¹, Шапигузов С.Ю.¹, Еремин А.², фон Рюлинг Ф.², Рубин А.Б.¹

¹МГУ, биологический факультет;

²Университет им. Отто фон Герике в Магдебурге, Институт Физики;
annaalova@gmail.com

Фотосинтез тесно связан с дальним транспортом и межклеточным распределением ассимилятов и сигнальных молекул. Дальний перенос веществ и преодоление межклеточных барьеров могут служить узким звеном в общем процессе и лимитировать фотосинтетическую продукцию. Наличие множественных межклеточных барьеров в листьях высших растений лимитирует латеральный обмен реагентами и продуктами реакций между клетками мезофилла. По этой причине начальные стадии (при $t < 10$ с) индукционных изменений флуоресценции (Фл) хлорофилла (Хл), измеряемые на ограниченном участке листа, не зависят от освещения или затемнения окружающих областей. Вместе с тем, измерения Фл Хл на временах 100–400 с при широком и узком поле освещения препарата позволяют выявить индукционные процессы фотосинтеза, связанные с дальними межклеточными взаимодействиями. В гигантских клетках харовых водорослей воздействие дальнего транспорта метаболитов на фотосинтез и Фл Хл должно быть особенно заметным, поскольку перенос в латеральном направлении (параллельно слою неподвижных хлоропластов) облегчен за счет быстрого ротационного течения цитоплазмы. Однако до настоящего времени не определены расстояния, на которые могут распространяться фотометаболиты с потоком цитоплазмы, нет достаточных сведений о роли дальних взаимодействий хлоропластов в индукции Фл Хл. Мало что известно о селективности транспорта метаболитов через межклеточные поры плазмодесмы. Данная работа посвящена выявлению роли дальнего внутри- и межклеточного транспорта в регуляции процессов фотосинтеза.

Дальний транспорт и дистанционные взаимодействия при фотосинтезе можно изучать по изменениям Фл Хл в ответ на локальное освещение участков растительного объекта, расположенных вдали от микрообласти регистрации Фл. Второй подход состоит в сравнении индукционных изменений Фл Хл при разной площади освещения объекта с использованием узкопольного и широкопольного освещения. Расхождения индукционных кривых Фл в этих вариантах обусловлены обменом метаболитов между областью измерения флуоресценции (ОИФ) и прилегающими частями исследуемого объекта. В данной работе эти подходы были применены для изучения дальних внутриклеточных и межклеточных взаимодействий в междоузлиях водорослей *Chara australis* и *Nitelloporosis obtusa*.

Показано, что фотометаболиты, экспортируемые из хлоропластов в области яркого локального освещения, распространяются с потоком цитоплазмы на расстояния до 10 мм и вызывают сравнительно быстрые переходное возрастание Фл Хл в ОИФ спустя долгое время (~120 с) после завершения светового стимула. Поскольку водоросли *N. obtusa* устойчивее к засолению, чем *C. australis*, мы предполагаем, что микрофлюидная сигнализация действует как у чувствительных, так и у устойчивых к действию солей харофитов.

Показано, что индукционные изменения Фл Хл, вызываемые освещением всей клетки, резко отличаются от варианта с освещением только ОИФ и прилегающих площадей, однако эти различия исчезают после остановки движения цитоплазмы в присутствии цитохалазина D. Для выяснения роли светозависимых транспортеров оболочки хлоропластов в индукционных изменениях Фл Хл использовали переходы от зонального (локального) к общему освещению препарата. Показано, что при таком переходе стадия S-M-T в индукционной кривой Фл определяется как внутренними процессами в хлоропластах ОИФ, так и обменом метаболитами между ОИФ и участками, лежащими за пределами этой области. Амплитуда и положение стадии S-M-T зависели от состояния активируемых светом ферментов, которые участвуют в транспорте фотометаболитов через мембраны оболочки хлоропластов. Установлено, что экспорт фотометаболитов из хлоропластов после перехода темнота-свет начинается значительно (на 50–60 с) раньше, чем поступление метаболитов из цитоплазмы в строму. Результаты указывают на участие дальних взаимодействий в индукционных переходах при фотосинтезе.

Проведены количественные оценки проникновения фотометаболитов через плазмодесмы *Chara*. Показано, что воздействие интенсивного локального светового импульса при низкой и повышенной интенсивностях фонового освещения вызывает появление в потоке цитоплазмы метаболитов двух типов, вызывающих

противоположные изменения Фл Хл. Установлено, что метаболиты-восстановители свободно проникают через межклеточные барьеры, а продукты-тушители Фл Хл не могут их преодолеть. По-видимому, плазмодесмы выступают в качестве селективного барьера и способны ограничивать прохождение потенциально деструктивных агентов, генерируемых на свету повышенной интенсивности.

Было изучено влияние генерации потенциала действия (ПД) на проводимость плазмодесм. Для измерений выбирали некальцифицированные участки клетки, в которых Фл Хл нечувствительна к возбуждению плазмалеммы. Показано, что генерация ПД в междоузлиях Chara подавляет межклеточный перенос метаболитов гораздо сильнее, чем их внутриклеточный транспорт. Результаты указывают на существование специфических механизмов регуляции проводимости плазмодесм, которые опосредованы повышением концентрации Ca^{2+} в цитоплазме во время генерации ПД.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и DFG в рамках научного проекта № 20-54-12015, а также в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7.

Диагностика и зрительное излучение

Егоров В.В.², Круглова Л.В.^{1*}

¹РУДН;

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина»;
kruglova_lv@pfur.ru

Использование параметров излучения человека для мониторинга и диагностики его состояния описано в [1]. В частности глаз человека связан с другими органами и системами организма, нарушения функционирования и структуры которых отражаются в зрительной системе [2-5]. Предположение о наличии зрительного излучения человека на основании результатов косвенных опытов: хемилюминесценции, измерения показателей всхожести семян и с использованием электрохимической ячейки было высказано в трудах Журавлева А. И., Егорова В. В., Цетлина В. В. [6,7].

В настоящей работе впервые осуществлена непосредственная регистрация такого излучения в ИК области. Исследования проводились с помощью инфракрасного термометра КМ (ООО «Тимол», регистрируемый спектральный диапазон 8-14 мкм), подключенного к персональному компьютеру, при комнатной температуре на расстоянии 5 см от глаз. Измерения фиксировались с частотой 1 Гц. Опыты проводились при различной освещенности: 100 лк (дневной свет), 10 лк (темнота). Всего было проведено десять экспериментов с разными испытуемыми по семь опытов в каждом. Измерялось тепловое излучение сначала закрытых, а потом открытых глаз. Найдено достоверное отличие излучения открытых глаз от закрытых в световом и темновом режимах.

Как отмечалось, параметры излучения глаз являются важным диагностическим фактором, который может быть использован как при первичном осмотре для диагностики состояния человека, так и в процессе лечения в целях контроля качества применяемых процедур и методов терапии.

Список литературы

1. Круглова Л.В. Создание алгоритмического и программного обеспечения бесконтактной системы коррекции психофизиологического состояния: Автореф. дис. канд. техн. наук. – Тула, 1999.
2. Плюхова А.А., Балацкая Н.В., Будзинская М.В. Изменения органа зрения при системном атеросклерозе. Вестник офтальмологии. 2013; 129(1): 7174.
3. Трухан Д.И., Тарасова Л.В., Лебедев О.И., Сафонов А.Д. Изменения органа зрения при заболеваниях органов пищеварения. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2014; 110 (10): С. 83–87.
4. Егоров В.В. Излучение и восприятие света животными. – М: ЗооВетКнига. 2018.
5. Егоров В.В., Цетлин В.В. К проблеме излучения глаз.//Ветеринария. Зоотехния. Биотехнология. 2016. №8. С.82.

Димеры хлорофилла в белках семейства WSCP - фотосенсибилизаторы редокс-реакций

Неверов К.В.^{1,2*}, Обухов Ю.Н.^{1,2}, Малеева Ю.В.², Крицкий М.С.¹

¹ИИБИ РАН;

²МГУ имени М.В.Ломоносова;

neverovk@mail.ru

Хлорофилл-связывающие белки семейства WSCP (Water Soluble Chlorophyll-binding Proteins) высших растений, в отличие от мембранных пигмент-белковых ансамблей фотосинтетического аппарата, являются водорастворимыми комплексами; они локализованы вне мембранных структур хлоропластов и не участвуют в фотосинтезе. Холоформы WSCP имеют тетрамерную структуру и связывают до четырех молекул хлорофиллов (Хл) [1].

Молекулы Хл в холоформах WSCP уложены в виде молекулярных димеров - аналогов «специальной пары» хлорофиллов (бактериохлорофиллов) в фотосинтетических реакционных центрах (РЦ), то есть существует конвергентное сходство между WSCP и РЦ. Поскольку «специальная пара» Хл (БХл) в РЦ играет роль донора электрона в первичном фотохимическом акте, возникает вопрос о способности димеров Хл в составе WSCP проявлять фотохимическую активность. Несмотря на обнаруженную ранее фотогенерацию молекулами Хл в WSCP возбужденного триплетного состояния [2], способность WSCP фотоиндуцировать реакции переноса электрона изучена не была.

Для выяснения возможности участия Хл в составе WSCP в фотохимических процессах мы исследовали взаимодействие собранных *in vitro* холоформ WSCP с акцепторами и донорами электрона при облучении их растворов красным светом, поглощаемым только Хл. В качестве объектов были выбраны белки BoWSCP и LvWSCP - представители подклассов семейства WSCP IIa (связывают только Хл а) и IIb (связывают, помимо Хл а, до 30% Хл b), соответственно.

Облучение BoWSCP в присутствии цитохрома с красным светом ($\lambda \geq 650$ нм) в деаэрированной среде приводило к восстановлению цитохрома, детектируемому по приросту его пика поглощения при 550 нм. Константа скорости фотовосстановления цитохрома с линейно зависела от концентрации цитохрома, что свидетельствует о прямом взаимодействии цитохрома с фотовозбужденным димером Хл в WSCP. Установлено, что источником электрона для восстановления цитохрома в наших экспериментах служил Трис (трис(гидроксиметил)аминометан), присутствовавший в пробах в качестве буферного основания [3].

При облучении красным светом насыщенных воздухом растворов WSCP наблюдалось эффективное окисление доноров электрона - НАДН или аскорбата. В бескислородной среде фотоокисление доноров не происходило. Снижение скорости фотоокисления доноров при добавлении NaN₃ - тушителя триплетного состояния Хл и синглетного кислорода (¹O₂) - указывало на протекание реакции по механизму типа II, то есть через фотосенсибилизированную Хл генерацию ¹O₂. Константа скорости фотоокисления НАДН заметно не отличалась для BoWSCP и LvWSCP, что согласуется с близкими значениями квантового выхода генерации синглетного кислорода Хл а и Хл b.

В процессе фотоокисления НАДН и аскорбата интенсивность полосы поглощения Хл, а также амплитуда сигнала кругового дихроизма, соответствующего димерам Хл, падали незначительно (до 10% за 15 мин экспозиции). Это указывает на значительную устойчивость как самого Хл в WSCP, так и его димерной структуры к активным формам кислорода. Константа скорости фотоиндуцированного BoWSCP окисления аскорбата была выше, чем НАДН, хотя последний является более сильным восстановителем. Это, очевидно, связано с разной эффективностью взаимодействия доноров электрона с синглетным кислородом: константа тушения ¹O₂ аскорбатом ($k_q = 4 \times 10^8$) вдвое превышает её значение для НАДН ($k_q = 2 \times 10^8$).

Обнаруженная фотосенсибилизирующая активность димера Хл в составе холобелков WSCP открывает перспективу для установления механизмов фотопротекторной функции белков этого семейства в растительной клетке. Выявление фотохимической редокс-активности у димеров Хл в WSCP является предпосылкой для конструирования на основе этих белков водорастворимых моделей реакционных центров фотосинтетических систем с целью исследования эволюции фотосинтетического аппарата, а также разработки нового поколения нанобиосенсоров, искусственных конверторов солнечной энергии и фототерапевтических препаратов.

Работа поддержана фондом РФФИ (грант № 21-74-20155).

1. Малеева Ю.В., Неверов К.В., Обухов Ю.Н., Крицкий М.С. Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки растений: структура, свойства и функции // Молекулярная биология. 2019, №6: Т. 53. - стр. 998-1011.

2. Agostini A., Palm D.M., Schmitt F.-J., Albertini M., Valentin M.D., Paulsen H., Carbonera D. An unusual role for the phytol chains in the photoprotection of the chlorophylls bound to Water-Soluble Chlorophyll-binding Proteins // Scientific Reports. 2017, V.7, P.7504.

3. Обухов Ю.Н., Неверов К.В., Малеева Ю.В., Крицкий М.С. Димеры хлорофилла а в составе водорастворимого белка BoWSCP фотосенсибилизируют восстановление цитохрома с // Доклады РАН. Науки о жизни. 2023. Т. 509(1). С. 88–92.

Зависимость агрегации эритроцитов от эндогенных и экзогенных факторов: исследование с помощью лазерных методов в экспериментах *in vitro*

Ермолинский П.Б.^{1*}, Максимов М.К.¹, Муравьев А.В.², Корнеев К.Н.¹, Умеренков Д.А.¹, Луговцов А.Е.¹, Приезжев А.В.¹

¹*Физический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*

²*Ярославский государственный педагогический университет, Ярославль, Россия;*
ermolinskiy.pb15@physics.msu.ru

Кровь человека состоит из жидкой части, плазмы крови, и клеток крови, большая часть которых – эритроциты. Эритроциты – это клетки, которые доставляют кислород к тканям организма. В крупных артериях и венах (при низких напряжениях сдвига) эритроциты обратимо и спонтанно взаимодействуют друг с другом, образуя линейные или более сложные структуры, называемые агрегатами эритроцитов; процесс образования данных структур называется агрегацией эритроцитов. Агрегация эритроцитов существенным образом влияет на микроциркуляцию крови и на здоровье человека в целом [1,2]. Механизмы агрегации эритроцитов до сих пор остаются неясными и противоречивыми [1]. Известно, что агрегация эритроцитов может происходить только в растворе, содержащем макромолекулы с большой молекулярной массой (более 70 кДа). С середины прошлого века сосуществуют две основные гипотезы механизмов агрегации эритроцитов: теория "обедненного слоя" и модель "мостиков" [1]. Согласно теории "обедненного слоя", эритроциты взаимодействуют друг с другом под действием осмотических сил, возникающих в растворе макромолекул (например, белков или синтетических макромолекул), окружающих клетки. В "мостиковой" модели взаимодействие эритроцитов описывается силами со стороны адсорбировавшихся макромолекул на поверхности мембран эритроцитов. По сей день существуют веские аргументы в пользу обеих моделей, и есть основания считать, что оба механизма влияют на агрегацию эритроцитов [3].

Агрегационные свойства крови могут изменяться под влиянием многих клеточных факторов (патологические свойства клеток, старение эритроцитов, деформируемость эритроцитов и т.д.) и факторов среды (изменение состава плазмы крови, изменение температуры крови, осмолярности среды и т.д.) [1]. На сегодняшний день влияние этих факторов на агрегацию эритроцитов до конца не изучено. В данной работе продемонстрировано влияние различных эндогенных и экзогенных факторов с помощью лазерных методов, таких как лазерная агрегометрия и лазерный пинцет [4].

Показано, что агрегация эритроцитов сильно зависит от белков плазмы крови, таких как фибриноген и гамма-глобулин. Более того, проагрегантный эффект носит синергетический характер. Интересно отметить, что влияние гамма-глобулина на агрегацию эритроцитов практически незначительно в диапазоне концентраций нормы. Было показано, что влияние с-реактивного белка в различных концентрациях незначительно. Также было изучено влияние старения эритроцитов на их агрегационные свойства. Согласно результатам [5], можно сделать вывод, что чем больше возраст взаимодействующих эритроцитов, тем сильнее они взаимодействуют. Кроме того, были исследованы другие факторы агрегации эритроцитов. Эти результаты важны для полного понимания механизмов агрегации эритроцитов.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 22-15-00120) в соответствии с программой развития Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова "Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина".

[1] Baskurt O., Neu B., and Meiselman H. "Red Blood Cell Aggregation", CRC Press, Boca Raton, United States (2012).

[2] Yaroslavsky A.N., Yaroslavsky I.V., "Optics of blood. In Handbook of Optical Biomedical Diagnostics", 2nd ed.; Tuchin, V.V., Ed.; SPIE PRESS: Bellingham, WA, USA, Volume 1, pp. 161–220 (2016).

[3] Fantoni R., Giacometti A., Santos A., "Bridging and depletion mechanisms in colloid-colloid effective interaction: A reentrant phase diagram". J. Chem. Phys., 142, 224905 (2015).

[4] Priezhev A.V., Lee K., Firsov N.N., and Lademann J. "Optical Study of RBC Aggregation in Whole Blood Samples and on Single-Cell Level," Chapter 1 in "Handbook on Optical Biomedical Diagnostics", V. V. Tuchin – editor, 2nd Edition, SPIE Press Bellingham, WA, United States (2016).

[5] Ermolinskiy P., Lugovtsov A., Yaya F., Lee K., Kaestner L., Wagner C., and Priezhev A., "Effect of Red Blood Cell Aging In Vivo on Their Aggregation Properties In Vitro: Measurements with Laser Tweezers", Applied Sciences 10(21) (2020).

Защитное действие света на кислород-выделяющий комплекс фотосистемы 2 в тилакоидных мембранах шпината в условиях теплового стресса

Ловягина Е.Р.^{1*}, Локтюшкин А.В.¹, Семин Б.К.¹

¹МГУ, биологический факультет;

Elena.Lovyagina@gmail.com

Кислород-выделяющий комплекс (КВК) фотосистемы 2 (ФС2) является одним из наиболее чувствительных к тепловому стрессу компонентов хлоропластов. Известно, что ингибирование выделения кислорода начинает проявляться в области $\sim 40^\circ\text{C}$ в результате диссоциации периферических белков и последующего разрушения Mn_4CaO_5 -кластера, в процессе которого участвуют, по-видимому, активные формы кислорода. На чувствительность донорной стороны ФС2 к тепловой обработке значительное воздействие может оказывать pH среды, поскольку этот фактор влияет на протонирование/депротонирование аминокислотных остатков и молекул воды, связанных с каталитическим центром окисления воды – марганцевым кластером. В этой связи исследование изменений в КВК, происходящих в результате модуляции pH внутритилакоидной среды, могут способствовать обнаружению новых механизмов устойчивости растений в условиях стресса.

Ранее мы обнаружили, что устойчивость марганцевого кластера к действию температуры в препаратах ФС2 без катиона Ca в КВК существенно зависит от pH среды: устойчивость минимальна при pH 6,5, увеличивается при снижении pH до 5,7 и остается практически постоянной при дальнейшем уменьшении pH до 4,0 (Lovyagina and Semin 2022). Эти результаты хорошо соотносятся с полученными нами данными (Semin et al. 2015, 2018; Davletshina and Semin 2020), демонстрирующими, что при pH 5,7 в КВК происходит структурный переход, сопровождающийся увеличением устойчивости катионов марганца к действию восстановителей и фотоингибированию.

В настоящей работе мы исследовали термоинактивацию КВК ФС2 в тилакоидных мембранах шпината в темновых условиях и при освещении, не вызывающем фотоингибирования. Показано, что выраженное ингибирование выделения кислорода тилакоидами наблюдается с 40°C – на $\approx 50\%$. Однако освещение тилакоидов (30% интенсивности насыщающего света в полосе Сорэ) при их прогреве существенно уменьшает ингибирующий эффект температуры. Максимальное различие мы наблюдали при 40°C – уменьшение ингибирования более, чем на 20%. Мы связываем этот эффект с подкислением люмена до pH 5,7 в результате формирования протонного градиента на мембране тилакоидов при освещении. Для проверки этой гипотезы мы измерили кривые выделения кислорода тилакоидными мембранами после их прогрева в темноте и на свету в присутствии разбавителей, снимающих протонный градиент, – нигерицина и хлорида аммония. Действительно, в присутствии разбавителей фотопротекторный эффект на термоинактивацию КВК полностью отсутствовал.

Мы предполагаем, что повышение устойчивости ФС2 к тепловому стрессу на свету при подкислении люмена (pH 5,7) определяется изменением окислительно-восстановительного потенциала E_m одного или нескольких катионов марганца в КВК. Изменение E_m в свою очередь увеличивает устойчивость катионов марганца к восстановителям, например, активным формам кислорода, участвующим в процессе деструкции марганцевого кластера. Таким образом, структурный переход в КВК при pH 5,7 может играть роль встроенного механизма, защищающего ФС2 как от фотоингибирования, так и от температурного стресса.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500058-7.

Davletshina LN, Semin BK (2020) pH dependence of photosystem II photoinhibition: relationship with structural transition of oxygen-evolving complex at the pH of thylakoid lumen. *Photosynth Res* 145: 135–143. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00769-0>

Lovyagina ER, Semin BK (2022) Elevation of photosystem II thermal stability at pH 5.7 due to the structural transition in the oxygen-evolving complex. *J Plant Biochem Biotechnol* 31:440–445. <https://doi.org/10.1007/s13562-021-00693-x>

Semin BK, Davletshina LN, Rubin AB (2015) Correlation between pH dependence of O_2 evolution and sensitivity of Mn cations in the oxygen-evolving complex to exogenous reductants. *Photosynth Res* 125: 95–103. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0155-4>

Semin BK, Davletshina LN, Seibert M, Rubin AB. (2018) Creation of a $3\text{Mn}/1\text{Fe}$ cluster in the oxygen-evolving complex of photosystem II and investigation of its functional activity. *J Photochem Photobiol B* 178: 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.11.016>

Изучение в модели тилакоида редокс состояния пула пластохинонов и регуляции переходов 2→1 для водоросли *Scenedesmus obliquus* и цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803 на основе анализа сигналов индукции флуоресценции и P700

Беляева Н.Е.^{1*}, Булычев А.А.¹, Клементьев К.Е.², Пащенко В.З.¹, Ризниченко Г.Ю.¹, Рубин А.Б.¹
¹Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
 Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия;

²Биологический факультет Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэнь, Шэньчжэнь, 518172, Китай;
natalmurav@yandex.ru

Отличия структуры тилакоидных мембран (ТМ) клеток эукариотов (микроводоросли) и прокариотов (цианобактерии) определяют особенности фотосинтетического аппарата одноклеточных водных организмов. Замкнутая система ТМ в хлоропластах (листья, водоросли) и в цитозоле цианобактериальных клеток включает одинаковые элементы электронно-транспортной цепи (ЭТЦ). Однако, в отличие от хлоропластов, цианобактериальные ТМ (ЦБ-ТМ) содержат компоненты ЭТЦ взаимосвязанные с элементами дыхательной цепи (обзор [1]).

При переходах образцов от темноты к свету особенности состояния мембран тилакоидов [1] проявляются в динамике длительных индукционных сигналов флуоресценции (ФЛ) [2] и P700+ редокс превращений [3, 4]. В диапазоне времени от микросекунд до 10 минут мы измерили сигнал индукции флуоресценции (ИФ) микроводоросли *Scenedesmus obliquus* (*Scenedesmus*) на стадиях ОЖП нарастания до секунды и медленного PSMT спада [5]. При интенсивности света 1800 мкмоль фотон м⁻² с⁻¹ ход ИФ от минимума F0 (O) до максимума FM (P) дает соотношение FM/F0≈2.85 [5]. За спадом к S –фазе (10 -100 с) следует SM нарастание на 2-3 минутах, которое связывают с увеличением выхода ФЛ в переходе состояний 2→1 (qT2→1) [1-4]. Процесс qT2→1 обеспечивает согласование величин энергии света, поступающей в реакционные центры (РЦ) фотосистем II и I (ФС II и ФС I) за счет переноса мобильной антенны к LHCP комплексу. В работе [4] для культуры цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*) в интервале от микросекунд до 100 с измерили одновременно изменения флуоресценции Хл а (ИФ) и окисления-восстановления P700 ФС I. Для ОЖП-SMT паттерна *Synechocystis* при FM/F0≈1.5 пик Р является доминантным, а на медленной волне ИФ около 10 с наблюдается слабый спад до S минимума и мало выраженный вторичный локальный М максимум. Следовательно, по измерениям ИФ от десятков микросекунд до минут величины локальных Р-SM экстремумов можно сопоставить с типом клеток – водоросль / цианобактерия. Для количественного описания системы ТМ мы проводили фитирование (находили параметры) модели ТМ по данным измерений [6, 7].

Основной круг процессов модели ТМ [7] был достаточен при фитировании решений в интервале от микросекунд до 100 с [5] по быстрой ОЖП-S волне паттерна ИФ *Scenedesmus* без учета регуляции переходов состояний. В данной работе к основному базовому набору процессов в модели ТМ [7] добавлено минимальное количество процессов, учитывающих переходы состояний qT2→1, qT1→2 и альтернативные потоки в строке.

В модели ТМ или ЦБ-ТМ включены пути сопряженного переноса электронов и протонов (e⁻ и H⁺) по линейной цепи (LEF) от KBK до FNR редуктазы и по циклическому пути (CEF) от Fdr до пластохинола PQH2 в люменальном сайте цитохромного комплекса (Цит b6f). Однако, для ЦБ-ТМ роль антенн выполняют фикобилисомы на внешней стороне ЦБ-ТМ; а у водорослей антенны подвижны и погружены в фазу ТМ. Действительно, фитирование по длительным паттернам ИФ дает близкие значения параметров внутреннего переноса и стабилизации зарядов в РЦ, но различные параметры описания структурных отличий двух типов мембран. Эффективная антенна водоросли A_{eff} = 140 больше чем антенна A_{eff} = 72 ЦБ-ТМ при отличающейся стехиометрии 2-х типов мембран тилакоида. Для концентраций компонент ФСII: ФСI: Цит b6f: PQпул:Рс:Fd:NADPH соотношения составили у ТМ водоросли 1.6: 1.6: 1.6: 16: 3.2: 5: 1.6 (мМ), а ЦБ-ТМ 1.6: 3.2: 1.6: 20.2: 5.7: 4.4: 1.0 (мМ) Темновая восстановленность PQ/PQH2 –пула ЦБ-ТМ, повышена до 20.8% в сравнении с 2.5% у водоросли.

Переходы состояний qT2→1, qT1→2 объясняют редокс состоянием PQ/PQH2 –пула [1-4], когда накопление PQH2 при освещении мембраны тилакоида инициирует отсоединение порции AntMob мобильной антенны от LHCP водоросли и присоединение к антенне ФСI в переходе qT1→2. Наоборот, активация переноса зарядов в ЭТЦ приводит к окислению PQ пула с обратным переносом AntMob к LHCP при qT2→1 с увеличением интенсивности ФЛ. В модели ТМ AntMob задавали как новую переменную №70 системы дифференциальных уравнений. Скорость изменения AntMob(t), задавали уравнением Хилла, определив начальный размер мобильной антенны, соединенной с ФСII после темновой адаптации и увеличение размера антенны LHCP при адаптации (qT2→1) образца к свету.

Обновленная версия модели тилакоида включила расчет переходов состояний как причину формирования SM стадии ИФ вместе с возможно наименьшим учетом альтернативных стромальных потоков. В вычислениях моделировали отток электронов от акцепторной стороны ФСI, перенесенных на flavodiiron proteins (Flv1/Flv3) и последующее протекание реакции типа Мелера [1-4] с подачей электронов на кислород без образования его

активных форм. Включение в модель кинетических констант оттока электронов от ФС1 в строму позволило выполнить точное фитирование сигнала P700 на ОАВ –стадиях, промежуточных перед терминальными DE фазами. Дальнейшая работа с моделированием процессов ТМ и ЦБ-ТМ может уточнить фитирование SM стадий ИФ и достижение терминальной стадии окисления кофактора P700.

Изучение возможностей лазерной предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур

Бурдышева О.В.^{1*}, Шолгин Е.С.¹, Лисина Т.Н.¹

¹Пермский НИИСХ филиал ПФИЦ УрО РАН;

burdyshevaolga@gmail.com

Опыт применения лазеров в аграрной сфере довольно широк, начиная от использования лазеров при проектировании и производстве сельскохозяйственной техники и заканчивая лазерным облучением непосредственно биологических организмов [1].

Одним из практических применений лазерных технологий в сельском хозяйстве является предпосевная обработка семян. Обработка семян в инфракрасном излучении позволяет интенсифицировать биохимические процессы зародыша, в результате чего увеличивается энергия прорастания и всхожесть. Ультрафиолетовая обработка позволяет снизить фитопатогенную нагрузку. На сегодняшний день имеется много исследований, доказывающих, что воздействие низкоинтенсивного когерентного света повышает энергию прорастания семян, увеличивает устойчивость к неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам [2-5]. Это позволяет снизить объём применения токсичных защитных препаратов – фунгицидов. Последние научные приоритеты в сфере аграрной политики предусматривают ограничение применения химических средств, гормональных препаратов и пестицидов при возделывании сельскохозяйственных культур. Методы лазерной предпосевной обработки способствуют реализации этой политики.

В лаборатории Агробιοфотоники Пермского НИИСХ филиала ПФИЦ УрО РАН ведутся исследования по разработке экспериментальной установки для предпосевной обработки семян и технологии ее использования для разных сельскохозяйственных структур. Научная новизна разрабатываемой технологии состоит в комплексном воздействии разных оптических источников. Стимулирующее действие лазерного и инфракрасного излучения на всхожесть семян должно быть совмещено с ультрафиолетовым облучением для воздействия на фитопатогены. Обработку семян возможно будет проводить одновременно с протравлением семян химическими реактивами.

На данный момент проведены испытания лабораторной осветительной установки, включающей в себя иттербиевый лазер с длиной волны 1080 нм (с возможностью варьировать оптическую мощность в диапазоне от 0.05 до 18 Вт), набор линз для формирования пучка, блок питания, ПК с ПО для управления лазерным диодом.

В работе исследованы девять различных сельскохозяйственных культур: 1 – ячмень яровой Родник Прикамья (некондиционные семена), 2 – овес голозерный Першерон, 3 – пшеница мягкая яровая Ирень, 4 – овес яровой Стайер, 5 – клевер луговой Лобановский, 6 – лен масличный Уральский, 7 – горчица белая Раподия, 8 – ячмень яровой Родник Прикамья (кондиционные семена), 9 - Горох посевной Ульяновец. Семенной материал для исследований был предоставлен лабораторией агротехнологий Пермского научно-исследовательского института сельского хозяйства ПФИЦ УрО РАН.

В ходе исследований подтверждено различие во влиянии лазерного излучения на различные сельскохозяйственные культуры. Вне зависимости от мощности излучения наибольший прирост проросших семян показал голозерный овес Першерон; лазерная обработка в течение 1 минуты и плотностью мощности 113,23 Вт/м² способствовала увеличению прорастания на 11% по сравнению с контрольной группой. Зафиксировано негативное влияние: для семян ячменя Родник Прикамья наблюдалось уменьшение прорастания до 19% при облучении в течении 1 минуты и плотностью мощности 113,23 Вт/м². Для семян льна продемонстрировано повышение процента всхожести семян на 10%, а также существенное увеличение длины их ростков. При облучении пшеницы наблюдалось увеличение прорастания на 7 % при 3 минутах облучения плотностью мощности 113,23 Вт/м². В случае облучения овса Стайлер наблюдалось увеличение прорастания на 6 % при 1 минуте облучения плотностью мощности 509,55 Вт/м². При облучении клевера Луговой Лобановский прорастание увеличивалось на 9 % при 5 минутах облучения плотностью мощности 113,23 Вт/м² и уменьшении прорастания на 9 % при 3 минуте облучения плотностью мощности 509,55 Вт/м². Облучение семян горчицы привело к увеличению всхожести на 10% при 1 минуте облучения и плотности мощности 509,55 Вт/м². Семена гороха после облучения в течение 3х минут демонстрируют достоверное увеличение длины ростков, однако, процент всхожести не изменяется.

После лабораторного этапа планируется проведение исследований в условиях защищенного грунта для оценки возможного отложенного во времени эффекта влияния лазерной обработки на развитие семени, на последующие стадии развития растений.

Работа выполняется в рамках государственного задания, номер государственной регистрации НИОКТР 122031100058-3.

Список литературы

1. Попов А. Ю., Попова Н. А., Тюрин А. В. Физическая модель воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения на биологические объекты // Оптика и спектроскопия. – 2007. – Т. 103. – №. 4. – С. 690-697.
2. Ю. Н. Кульчин. Агробиофотоника – влияние света на развитие растений. – Фотон-Экспресс, 2019, 6(158), с. 64.
3. А. В. Будаговский. Дистанционное межклеточное взаимодействие. – М.: НППЦ «Техника», 2004. – 104 с.
4. С.Х. Ким, С. З. Цой, С. Ч. Ким. Обработка рисовых семян лазерным светом. – Международный научно-исследовательский журнал. - №4-6 (46), 2016, с. 43-46.
5. Dolgovykh O.G., Krasil'nikov V.V., Gaztdinov R.R. Inženernyj vestnik Dona (Rus). 2012. №4. URL: ivdon.ru/magazine/archive/n4p2y2012/1422.

Изучение изменения конформации моноклеосом в присутствии кверцетина методом флуоресцентной микроскопии одиночных частиц

Андреева Т.В.^{3*}, Любителей А.В.³, Студитский В.М.^{3,1}, Феофанов А.В.^{3,2}

¹*Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, 19111 Pennsylvania, USA;*

²*Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Российская академия наук, Москва, Россия;*

³*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоинженерии, Москва, Россия;*
andreeva.tatyana.2014@post.bio.msu.ru

Кверцетин – флавоноид природного происхождения, обладающий антиоксидантной, иммуномодулирующей, противораковой, противовоспалительной, противовирусной и антибактериальной активностями. Кверцетин может быть использован для лечения сердечно-сосудистых заболеваний и ожирения [1]. Он может вызывать эпигенетические изменения, которые подавляют онкогены и реактивируют гены-супрессоры опухолей [2]. Известно, что кверцетин может связываться в бороздке, образовывать водородные связи, интеркалировать, а также взаимодействовать электростатически с ДНК [3-5]. Наша работа посвящена исследованию действия кверцетина на конформацию нуклеосом, так как данный аспект свойств кверцетина не изучен [6].

Исследование было проведено методом микроскопии одиночных частиц на основе эффекта FRET (Фёрстеровский резонансный перенос энергии) [7] с использованием моноклеосом с двумя линкерными участками ДНК по 20 п.н. Каждая нуклеосома содержала пару флуоресцентных меток, расположенных в соседних супервитках нуклеосомной ДНК в положениях +13 и +91 п.н. от начала нуклеосом-позиционирующей последовательности. Чтобы оценить эффект, оказываемый кверцетином, мы измеряли коэффициент Е (аналог эффективности FRET) для одиночных свободно диффундирующих нуклеосом в отсутствии и присутствии кверцетина и анализировали полученные частотные распределения нуклеосом по величине Е. На основе этих данных нами были рассчитаны доли нуклеосом с $E < 0,3$ (LE). К данной субпопуляции относятся нуклеосомы, у которых нарушена укладка ДНК на октамере гистонов.

Показано, что конформационные изменения в структуре нуклеосомы регистрируются при концентрации кверцетина 6 мкМ и выше. Они детектируются как концентрационно-зависимое увеличение доли LE-субпопуляции нуклеосом от 1-5% в отсутствии кверцетина до ~40% в присутствии 24 мкМ кверцетина. Эти структурные перестройки затрагивают 20 п.н. линкерной ДНК и не менее 13 п.н. ДНК в области кор-нуклеосомы и, по-видимому, сопровождаются отворачиванием ДНК от октамера гистонов.

В соответствии с данными литературы константа диссоциации комплекса кверцетина с ДНК равна 14 мкМ [3], поэтому обнаруженные структурные изменения, по всей видимости, вызваны непосредственным взаимодействием кверцетина с нуклеосомной ДНК.

Полученные нами данные могут свидетельствовать о том, что кверцетин увеличивает доступность нуклеосомной ДНК для различных белковых факторов, участвующих во внутриядерных процессах, и может регулировать эти процессы.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 21-74-20018.

Литература

- 1) Massi A., Bortolini O., Ragno D., Bernardi T., Sacchetti G., Tacchini M., De Risi C. Research Progress in the Modification of Quercetin Leading to Anticancer Agents // *Molecules*. 2017. № 8. P. 1270.
- 2) Carlos-Reyes A., L'opez-Gonz'alez J. S., Meneses-Flores M., Gallardo-Rinc'on D., Ru'iz- ' Garc'ia E., Marchat L. A., Astudillo-de la Vega H., Hern'andez de la Cruz O. N. and L'opez-Camarillo C. Dietary Compounds as Epigenetic Modulating Agents in Cancer // *Front Genet*. 2019. Vol. 10. P.79.
- 3) Kanakis C. D., Tarantilis P. A., Polissiou M. G., Diamantoglou S., Tajmir-Riahi H. A. DNA interaction with naturally occurring antioxidant flavonoids quercetin, kaempferol, and delphinidin // *J. Biomol. Struct. Dyn*. 2005. № 6. P. 719-24.
- 4) Sha Y., Chen X., Niu B., Chen Q. The Interaction Mode of Groove Binding Between Quercetin and Calf Thymus DNA Based on Spectrometry and Simulation // *Chem. Biodiversity*. 2017. № 14. e1700133.
- 5) Srivastava S., Somasagara R. R., Hegde M., Nishana M., Tadi S. K., Srivastava M., Choudhary B., Raghavan S. C. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis // *Scientific Reports*. 2016. № 6. P. 24049.
- 6) Andreeva T., Lyubitelev A., Bondarenko E., Studitsky V., Feofanov A. Quercetin Affects Nucleosome Structure // *Microsc. Microanal.* 2021. Vol. 27. № S1. P. 1740-1741.
- 7) Kudryashova KS, Chertkov OV, Nikitin DV, Pestov NA, Kulaeva OI, Efremenko AV, Solonin AS, Kirpichnikov MP, Studitsky VM, Feofanov AV. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // *Methods Mol Biol*. 2015. Vol. 1288. P.395-412.

Изучение цветовых предпочтений и реакций *Danio rerio* на свет

Любарец Е.И.², Хавронюк И.С.², Скуратовская Е.Н.¹, Кузнецов А.В.^{1,2*}

¹Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН;

²Севастопольский государственный университет;

andrei_kouznetsov@hotmail.com

Понимание основ восприятия организмами световых и цветовых сигналов из окружающей среды – это важная задача биофизики. Большинство видов позвоночных имеют зрительную систему, основанную на опсинах чувствительных к красному, зелёному, синему и УФ свету [Bowmaker, 2008]. *Danio rerio* является удобной моделью в эмбриологии, её геном секвенирован [Howe et al., 2013], многие опсины клонированы и определены их спектральные характеристики [Robinson et al., 1993; Vihtelic et al., 1999]. Тем не менее, причины цветовых предпочтений *D. rerio* и их смена во время индивидуального развития остаются недостаточно изучены [Peeters et al., 2016]. Интересно связать количество цветных опсинов, обнаруженных у *D. rerio*, и их структурные особенности с паттернами поведения рыб под разными источниками света.

D. rerio содержали в аквариуме 41x25x35 см при 25°C и суточном освещении. Эксперименты проводили в аквариуме, либо в каналах. Применяли полупроводниковые лазеры мощностью ~1 Вт: красный (650 нм), зелёный (532 нм) и синий (405 нм), а также миниатюрный УФ (395 нм) источник света и цветные светодиоды (LEDs): красный (620 нм), зелёный (529 нм) и синий (470 нм), а также белый. Светодиоды подключали к плате Arduino для импульсного освещения со случайными вспышками света и паузами между ними длительностью до 1 с. Лазерный луч направляли на рыб, плавающих в аквариуме при дневном свете либо в темноте. Оценивали поведенческие реакции при остром световом воздействии. В другом варианте опытов, *D. rerio* помещали в каналы белого цвета (200x6x3 см) или каналы, раскрашенные в разные цвета (100x6x3 см). Иногда часть канала закрывали крышкой от дневного света, имитируя грот с одним или тоннель с двумя входами-выходами. Светодиоды размещали с краю или в центре канала над поверхностью воды так, чтобы они светили вниз в полной темноте. После 3 мин экспозиции, в воду опускали перегородки и подсчитывали долю рыб в отсеках. Каждый опыт повторяли 3 раза. Исследование длилось 2 месяца и состояло из нескольких серий, в которых участвовало 20 особей в возрасте от 1 месяца.

Аминокислотные последовательности опсинов *D. rerio* искали в базе данных NCBI. Множественное выравнивание полипептидных последовательностей выполняли на сервере Clustal Omega. Пространственные модели опсинов строили на сервере PyMol. Докинг ретиналя осуществляли на сервере SwissDock.

Обнаружено, что на свету *D. rerio* проявляют выраженную реакцию на зелёный и синий лазеры, а в темноте бурно реагируют на зелёный лазер и заметно на лучи остальных цветов (белый, красный, синий, УФ), что коррелирует с содержанием чувствительных к зелёному свету опсинов (4 гомолога).

При рассеянном дневном свете *D. rerio* равномерно распределяются по каналу, 2/3 рыб прячутся в гроте и практически все собираются в тоннеле. Этот факт предполагает участие 4 типов опсинов (красный, зелёный, синий, УФ) в обработке белого света.

В двухцветных каналах рыбы сосредотачивались в красной половине и не задерживались в белой части; в зелёной части собиралось в ~2 раза меньше рыб, чем в голубой; при сравнении красного цвета с зелёным, *D. regio* выбирали красный. Наблюдения свидетельствуют, что *D. regio* предпочитает основные цвета в следующем порядке: красный $\approx$ голубой > зелёный > белый, причём белый цвет и освещённые участки являются наименее предпочтительными. В таких местах рыбки задерживаются лишь на короткое время, что согласуется с [Avdesh et al., 2012].

При постоянном освещении LEDs, рыбы были индифферентны к белому и красному свету. Напротив, *D. regio* уходили от постоянного зелёного или синего света. Случайные вспышки белого света пугали рыб и они хаотично распределялись по каналу. Цветные случайные вспышки оказывали менее выраженный эффект, что снова указывает на комплексную обработку входных световых сигналов нервной системой [Connaughton et al., 2021].

Корреляция между опытами с расположением источников света (W, R, G, B) с краю или в центре канала для постоянного освещения составляет $r=0,62$, а для случайных вспышек света $r=-0,04$. Этот результат говорит о закономерной реакции рыб на постоянное освещение разного цвета и о непредсказуемой реакции на случайные вспышки, что напоминает испуг [Kooyama et al., 2021].

Обнаружено 145 опсино-подобных белков *D. regio*, из них проанализирован 121 опсин. Выявлено 9 кластеров: чувствительные к красному, зелёному, синему и УФ свету опсины, родопсины, меланопсины, опсины костных рыб, древние опсины позвоночных и неохарактеризованные протеины. Наибольший интерес представляют 4 группы опсинов чувствительных к красному, зелёному, синему и УФ свету. Число опсинов было редуцировано до 11 уникальных полипептидов.

Охарактеризованы следующие опсины: NP_001300644.1 (R-опсин 1, 357 aa, 39,89 кДа) и NP_001002443.1 (R-опсин 2, 356 aa, 39,51 кДа), NP_571328.2 (G-опсин 1, 349 aa, 38,85 кДа), NP_878311.1 (G-опсин 2, 349 aa, 38,71 кДа), NP_878312.1 (G-опсин 3, 349 aa, 38,89 кДа) и NP_571329.1 (G-опсин 4, 349 aa, 38,72 кДа), чувствительный к синему цвету опсин колбочек BAC24133.1 (354 aa, 39,49 кДа), 2 коротковолновых опсина колбочек AAN60894.1 (336 aa, 37,26 кДа) и AAN67683.1 (336 aa, 37,28 кДа), а также 2 чувствительных к УФ опсина колбочек AAD24756.1 (336 aa, 37,15 кДа) и BAC24134.1 (336 aa, 37,27 кДа).

Отмечены уникальные N-терминальные пептиды, а также делеция в C-терминальной области у красных опсинов, кроме того, ниже по последовательности обнаружена делеция у УФ опсинов, при этом у зелёных опсинов делеция находится на N-конце. Выявлена дивергентная эволюция УФ опсинов AAD24756.1 и BAC24134.1. Ретиналь встраивается в 3D-модели УФ опсинов со значениями $-\Delta G$: 8,68 для AAN60894.1, 8,62 для AAN67683.1, 8,58 для BAC24134.1 и 8,45 ккал/моль для протеина AAD24756.1.

Из экспериментов и расчётов следует, что *D. regio* способна различать как минимум 2 оттенка красного, 4 оттенка зелёного, синий и, возможно, не менее 2 оттенков УФ цвета на определённых этапах эмбриогенеза, процессировать полученную информацию в нейронной сети и принимать решения, выражающиеся в двигательной активности.

Использование показателей флуоресценции хлорофилла для предсказания накопления биомассы и засухоустойчивости пшеницы

Шерстнева О.Н.^{1*}, Громова Е.Н.¹, Киор Д.С.¹, Абдуллаев Ф.Ф.¹, Воденеев В.А.¹

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

sherstneva-oksana@yandex.ru

Для выведения новых сортов сельскохозяйственных растений с желаемыми хозяйственно-значимыми признаками необходимо применение комплекса исследований, обеспечивающего высокую надёжность отбора линий растений, направляемых на последующие стадии селекционных испытаний. Помимо этого, в настоящее время одним из ключевых аспектов в развитии способов отбора перспективных линий является его ускорение за счёт уменьшения длительности цикла испытаний. Для достижения этой цели широко используются методы генотипирования, а также фенотипирования, позволяющего получить информацию о состоянии исследуемых растений в раннем возрасте и найти связь между фенотипическими параметрами и хозяйственно-значимыми признаками в более позднем возрасте. Среди методов фенотипирования особую роль занимают оптические методы. Благодаря высокой скорости получения данных и неинвазивности они позволяют проводить массовые исследования большого количества вариантов растений, не выводя их из дальнейшего селекционного процесса.

Целью данной работы был поиск показателей флуоресценции хлорофилла, обладающих потенциалом для предсказания накопления биомассы и устойчивости растений пшеницы к засухе в более позднем возрасте.

Объектом исследования выступали проростки пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) яровой 11 сортов. Культивирование растений осуществлялось в контролируемых условиях вегетационной комнаты (температура 24°C, относительная влажность воздуха 50%, режим освещения свет/темнота 16/8 ч). В двухнедельном возрасте у

исследуемых растений регистрировались показатели флуоресценции хлорофилла с использованием метода РАМ-флуориметрии, для чего использовалась система для флуоресцентной визуализации Open FluorCam FC 800-O/1010-S, Photon Systems Instruments, Чехия). После этого у опытной группы прекращался полив; при этом каждые пять дней (на 5, 10 и 15 день засухи) у опытной и контрольной групп регистрировались показатели флуоресценции хлорофилла и морфометрические показатели. Для оценки активности фотосинтеза анализировались количественные параметры временных динамик квантового выхода фотохимии фотосистемы II (ФПСII) и нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ); среди морфометрических параметров оценивались сырой и сухой вес, а также длина корней и побегов.

Для того чтобы оценить связь флуоресцентных показателей молодых проростков с накоплением биомассы и засухоустойчивостью растений в более позднем возрасте проводился корреляционный анализ. Для этого вычислялся коэффициент корреляции Пирсона значений показателей флуоресценции хлорофилла двухнедельных проростков пшеницы с величиной сухого веса растений в возрасте 30 дней (для связи с накоплением биомассы) и с величиной остаточного сухого веса 30-дневных растений (для связи с засухоустойчивостью). Остаточный сухой вес как мера засухоустойчивости вычислялся как отношение сухого веса растений, подвергнутых засухе, к сухому весу контрольных растений.

Была показана статистически значимая корреляция ($p < 0,05$) эффективного ($r = 0,74$) и темнового ($r = 0,69$) квантового выхода фотосистемы II (ФПСIIef и ФПСIIId) и времени полувыхода на ФПСIIef после включения актиничного света ($t_{1/2}(\text{ФПСIIef})$) ($r = -0,65$) у двухнедельных проростков пшеницы с величиной сухого веса растений пшеницы в возрасте 30 дней, что говорит о достаточно высоком предсказательном потенциале этих параметров при прогнозировании накопления биомассы пшеницы.

В случае исследования анализируемых флуоресцентных параметров как предикторов засухоустойчивости пшеницы в качестве перспективного был отмечен только темновой уровень квантового выхода фотосистемы II ФПСIIId ($r = -0,63$, $p < 0,05$). Стоит отметить, что этот параметр коррелировал как с накоплением биомассы пшеницы, так и с устойчивостью к засухе, однако зависимости были разнонаправлены.

Использование выявленных предикторов признаков пшеницы может служить инструментом для повышения эффективности и ускорения селекционного процесса. За счёт неинвазивности и высокой скорости анализа применяемый метод может дополнять другие методы исследования без исключения перспективных линий из следующих стадий испытаний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России проекта «Хлеба России» по соглашению № 075-15-2021-1066 от 28.09.2021 г.

Исследование возможности применения фосфоресцентных сенсоров в опухолевых клетках

Комарова А.Д.^{1,2*}, Критченков И.С.³, Щеславский В.И.², Ширманова М.В.²

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского;

²Приволжский исследовательский медицинский университет;

³Санкт-Петербургский государственный университет;
komarova.anastasiia@gmail.com

Исследование локальных концентраций кислорода в клетках и тканях представляет большой интерес для многих областей физиологии и медицины, включая онкологию. Перспективным оптическим методом для оценки содержания кислорода в клетках и тканях в режиме реального времени является фосфоресцентный имиджинг с временным разрешением PLIM (Phosphorescence lifetime imaging). На данный момент актуальной задачей является поиск новых фосфоресцентных сенсоров, имеющих высокую чувствительность к кислороду, способных эффективно накапливаться в клетках и тканях и не имеющих выраженной токсичности.

Целью исследования являлась оценка возможности использования новых фосфоресцентных сенсоров в опухолевых клетках в качестве сенсоров молекулярного кислорода.

В работе были исследованы водорастворимые металлорганические комплексы на основе Ir(III): Ir-1, Ir-2, Ir-2a, Ir-3 и Ir-4. Тестирование комплексов проводили на опухолевых клетках колоректального рака мыши – CT26. Цитотоксичность комплексов оценивали методом МТТ-теста. Анализ динамики проникновения комплексов в опухолевые клетки *in vitro* осуществляли в интервале от 1 до 6 ч. Субклеточное распределение оценивали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) при возбуждении на длине волны 543 нм, с мощностью лазера 8 мВт. Сигнал комплекса детектировали в диапазоне 650 – 750 нм. Методом PLIM проведена оценка времени жизни фосфоресценции комплексов в опухолевых клетках CT26 в

условиях гипоксии и нормоксии. Возбуждение комплексов осуществляли в двухфотонном режиме на длине волны 760 нм, детекция сигнала осуществлялась в диапазоне 596 – 660 нм.

По результатам МТТ-тест установлено, что комплексы Ir-2, Ir-3 и Ir-4 являются наименее токсичными. Через 24 часа инкубации клеток СТ26 с комплексами процент жизнеспособных клеток при концентрации комплексов 125 мкМ составил $87.9 \pm 4.5 \%$, $94.6 \pm 0.5 \%$ и $92.5 \pm 2.7 \%$, соответственно. Для комплекса Ir-2a при концентрации 75 мкМ процент жизнеспособных клеток составил $83.2 \pm 6.5 \%$. Комплекс Ir-1 проявляет наибольшую цитотоксичность из исследуемых комплексов, IC50 составила 50 мкМоль. Дальнейшие исследования *in vitro* проводили на комплексах Ir-2, Ir-2a, Ir-3 и Ir-4, обладающих наименьшей токсичностью и хорошей водорастворимостью. Методом лазерной сканирующей микроскопии установлено, что фосфоресцентные комплексы Ir-2 и Ir-2a проникают в живые опухолевые клетки. Интенсивность люминесценции комплексов в опухолевых клетках увеличивается в период от 1 до 6 часов, что свидетельствует о повышении концентрации комплексов в живых опухолевых клетках. Исследование внутриклеточной локализации комплексов показало, что комплексы равномерно распределяются в цитоплазме клеток, не проникают в клеточное ядро. Методом PLIM были зафиксированы вариации времен жизни фосфоресценции в опухолевых клетках при моделировании гипоксии. Время жизни фосфоресценции для комплекса Ir-2 в условиях нормоксии составило 1.48 ± 0.05 мкс, в условиях гипоксии – 2.42 ± 0.09 мкс, для комплекса Ir-2a в условиях нормоксии – 1.04 ± 0.16 мкс, в условиях гипоксии – 1.94 ± 0.32 мкс. Таким образом, время жизни фосфоресценции комплексов Ir-2 и Ir-2a в условиях нормоксии уменьшилось в 1.6 раз и 1.8 раз соответственно, следовательно, комплексы обладают чувствительностью к кислороду.

По полученным результатам исследования можно заключить, что комплексы Ir-2 и Ir-2a являются наиболее перспективными для дальнейших исследований *in vivo*, и могут быть применены в качестве сенсоров молекулярного кислорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект № 18-73-10021.

Исследование прямого возбуждения растворенного молекулярного кислорода в области 800-1300 нм в связи с моделированием терапевтического действия лазеров

Козлов А.С.¹, Журавлев С.Г.², Егорова О.Н.², Медведков О.И.², Красновский А.А.^{1*}

¹ФИЦ Биотехнологии РАН;

²ФИЦ «Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН»;

phoal@mail.ru

Терапия, основанная на применении ИК лазерных источников излучения низкой и средней интенсивности в области 800-1300 нм, активно используется для лечения различных заболеваний. Так как известно, что кислород имеет полосы поглощения в ближней ИК области спектра, выдвинута гипотеза, что молекулярный кислород, растворенный в живых клетках и тканях, может быть фоторецептором лазерного излучения. Чтобы выяснить, насколько вероятен этот механизм лазерной терапии, мы исследовали действие ИК лазерного излучения с длиной волны 800-1300 нм на кислород, растворенный в аэробных условиях при комнатной температуре и атмосферном давлении. Данные получены с помощью набора диодных и волоконных ИК лазеров, при этом использовали кюветы с длиной оптического пути 1 см. Скорость генерации синглетного кислорода при возбуждении кислородных молекул лазерным излучением измеряли с помощью химической ловушки синглетного кислорода – 1,3-дифенилизобензофурана, а в качестве растворителей использовали четыреххлористый углерод, гексафторбензол, хлорон-113, ацетон, этанол и тяжелую воду. Установлено, что во всех растворителях в спектрах действия окисления ловушки, наиболее интенсивна полоса, совпадающая с основной абсорбционной полосой кислорода с максимумом 1273 нм (переход ($1\Delta_g(0) \leftarrow 3\Sigma_g^-(0)$)). Кроме нее, обнаруживается примерно в 100 раз менее интенсивная полоса с максимумом 1070 нм и полушириной 8-18 нм (в зависимости от среды), соответствующая первому вибронному переходу молекулярного кислорода ($1\Delta_g(1) \leftarrow 3\Sigma_g^-(0)$). Добавление тушителей синглетного кислорода (ацетона в гексафторбензоле и азиды натрия в тяжелой воде) приводило к уменьшению скорости выцветания ловушки под действием лазеров на 1070 и 1273 нм. Измерены молярные коэффициенты поглощения кислорода в этих максимумах во всех средах ($\epsilon_{1273} = 1,6 \div 5,1 \times 10^{-3}$ М-1см-1, $\epsilon_{1070} = 1,1 \div 4,9 \times 10^{-5}$ М-1см-1). При действии ИК излучения в диапазоне 800-1060 нм скорость выцветания ловушки во всех средах была еще на порядок более низкой, причем она не зависела от длины волны возбуждения и почти не превышала скорость темнового выцветания ловушки в отсутствии облучения. Отсюда следует, что величина коэффициентов поглощения кислорода, соответствующих этой области спектра, гораздо меньше, чем даже у полосы при 1070 нм. Таким образом, проведенные измерения позволили впервые получить абсорбционные коэффициенты, соответствующие полосе 1070 нм в спектре поглощения молекулярного кислорода, растворенного в естественных условиях в полярных и неполярных

средах; с другой стороны, они говорят о том, что терапевтические эффекты ИК излучения, особенно в области 800-1100 нм, по-видимому, не связаны с возбуждением кислорода. Часть результатов этой работы опубликована в статье [1]. Работа была частично поддержана грантом РФФИ № 19-04-00331 А и госзаданием ФИЦ Биотехнологии РАН.

Литература

1. Kozlov A.S., Egorova O.N., Medvedkov O.I., Krasnovsky A.A., Jr. Activation of oxygen molecules by 1070 nm laser radiation in aerated solvents. // Optics Letters. 2021. vol. 46. №3. pp. 556-559.

Исследование роли PI3-киназы в механизме Ca²⁺-сигналикации, индуцированной ацетилхолином

Дымова Е.А.^{1*}, Рогачевская О.А.¹, Котова П.Д.¹

¹Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия;
dymova.ek.a@gmail.com

PI3-зависимый выброс депонированного Ca²⁺ вносит ключевой вклад в агонист-индуцированную мобилизацию Ca²⁺ в невозбудимых клетках. Эффективность фосфоинозитидного каскада, сопрягающего поверхностные рецепторы с мобилизацией внутриклеточного Ca²⁺, модулируется рядом киназ, включая фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K), которая, фосфорилируя PIP₂, продуцирует фосфолипид PIP₃. Ранее нами было показано, что ингибитор PI3K вортманнин не влияет на способность клеток НЕК-293 генерировать Ca²⁺-ответы на ацетилхолин, тогда как ингибитор PI3K другой химической природы PI828 полностью подавляет эти ответы. Разная эффективность вортманнина и PI828 могла быть связана с тем, что в клетках НЕК-293 функционируют изоформы PI3K, существенно более чувствительные к PI828. Для выяснения ясности в этот вопрос нами была получена моноклональная линия клеток НЕК-293, экспрессирующих два генетически кодируемых сенсора, а именно сенсор цитозольного Ca²⁺ (R-GECO1) и сенсор PIP₃ PH(Akt)-Venus. Клетки этой линии позволяли одновременно регистрировать Ca²⁺-сигналы и проводить мониторинг активности PI3K. Характерной особенностью R-GECO1 является увеличение интенсивности флуоресценции при повышении концентрации цитозольного Ca²⁺, в то время как PH(Akt)-Venus при PI3K-зависимой генерации PIP₃ в плазмалемме перераспределяется из цитозоля в мембрану клетки. Оказалось, что ацетилхолин инициировал кратковременное повышение внутриклеточного Ca²⁺, но не влиял на распределение PIP₃-сенсора в цитоплазме клеток. Последнее указывало на отсутствие ацетилхолин-зависимой активации PI3K. В то же время инсулин, стимулирующий PI3K при участии тирозин-киназных рецепторов, вызывал перераспределение молекул PH(Akt)-Venus из цитозоля в мембрану клеток, что демонстрировало инсулин-индуцированную активность PI3K. Этот феномен не наблюдался в присутствии вортманнина или PI828, что свидетельствовало об эффективном подавлении активности PI3K этими соединениями. Таким образом, стимулируя внутриклеточную Ca²⁺-сигнализацию в клетках НЕК-293, ацетилхолин не инициировал активацию PI3K-пути, который, следовательно, не был вовлечен в холинергическую трансдукцию. Хотя полученные данные свидетельствуют об эффективном ингибировании активности PI3K вортманнином и PI828, последний подавлял ацетилхолин-индуцируемую Ca²⁺-сигнализацию неспецифически, т.е. воздействуя не на PI3K, а на какую-то иную клеточную мишень.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-75-10068.

Исследование структуры сосудистого русла и уровня оксигенации опухолей различного морфогенеза

Глявина А.М.^{1,2*}, Ахмеджанова К.Г.^{1,2}, Курников А.А.¹, Хоченкова Ю.А.³, Хоченков Д.А.³, Субочев П.В.¹, Орлова А.Г.¹

¹*Институт прикладной физики Российской академии наук, Нижний Новгород, Россия;*

²*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия;*

³*«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, России;
annaglyavina@gmail.com*

В отличие от сосудов нормальных тканей, сосуды злокачественных новообразований обладают рядом структурных и функциональных аномалий. Они извилистые, мешковидные, их стенки высоко проницаемы благодаря неравномерному покрытию базальной мембраной, эндотелием и перипитами. Такие аномалии способствуют формированию участков гипоксии опухоли, в итоге вызывая снижение чувствительности к лечению. Важно отметить, что различные типы опухолей существенно отличаются друг от друга по структуре сосудов, и эти различия рассматриваются как прогностический критерий и определяют выбор способа терапии. Понимание особенностей и характеристик кровеносного русла новообразования позволит своевременно предсказать ответ опухоли на лечение и скорректировать воздействие на ткань.

В настоящей работе для оценки структуры сосудистого русла и уровня оксигенации экспериментальных новообразований было предложено сочетание методов оптоакустической (ОА) микроскопии и оптической диффузионной спектроскопии (ОДС). Оптоакустическая ангиография - удобный неинвазивный метод визуализации сосудов. Он основан на регистрации ультразвуковых волн, индуцированных расширением участка тканей после поглощения лазерных импульсов молекулами гемоглобина. Метод ОА позволяет визуализировать трехмерное распределение гемоглобина, давая картину расположения кровеносных сосудов тканей. Оценка кислородного статуса возможна с помощью метода оптической диффузионной спектроскопии. ОДС также основан на абсорбционной способности гемоглобина. При этом метод позволяет оценить концентрации и соотношение окси- и дезокси- формы данного соединения, характеризующих баланс доставки кислорода к тканям и его потребления. Целью работы было сравнение структуры сосудов и уровня оксигенации экспериментальных опухолей различного морфогенеза методами ОА и ОДС. Для верификации данных ОДС проводилось иммуногистохимическое (ИГХ) исследование опухолевых тканей с маркером гипоксии пимонидазолом (ПМ).

Исследование было проведено на мышах самках линии Balb/c-nude с привитыми подкожно опухолями. Для эксперимента были выбраны три опухолевые модели на основе клеточных линий SN-12C (рак почки человека, n = 4), НСТ116 (рак толстого кишечника человека, n = 4), Colo320 (рак толстого кишечника человека, n = 4). Исследование осуществляли при среднем объеме новообразования 700 мм³ на 29 день роста опухолей НСТ116 и Colo320, и на 125 день роста SN-12C.

Для ОА и ОДС исследований животные под изофлурановым наркозом закреплялись в положении на боку на переносной опорной пластине, имеющей отверстие для расположения зоны исследования над датчиком ОА микроскопа. Для ОА использована установка (ИПФ РАН) с лазером с длиной волны 532 нм и частотой следования и длительностью импульсов 2 кГц и 1 нс. Для ОДС использована установка (ИПФ РАН) с оптическим зондом из четырех волокон, использующая в качестве источника светодиод с длиной волны 400-700 нм и спектрометр в качестве детектора. Для ИГХ ПМ вводили внутривенно, через 45 минут опухоли извлекали, изготавливали криосрезы. Срезы окрашивали с использованием мышиных моноклональных антител к пимонидазолу, конъюгированных с флуоресцинизиотиоцианатом. Относительную гипоксическую фракцию рассчитывали как процент площади ПМ-положительных зон от общей площади образца.

В ходе работы показано, что опухоли SN-12C характеризуются низкой скоростью роста по сравнению с Colo320 и НСТ116, время удвоения объема опухоли данной модели превышает таковое для Colo320 2,5 раз и для НСТ116 в 2,3 раза. Методом ОДС у Colo320 показано повышенное содержание гемоглобина и сниженный уровень насыщения крови кислородом по сравнению с SN-12C и НСТ116. Причиной сниженной оксигенации является высокое содержание дезоксигемоглобина, характеризующего потребление кислорода тканями. С помощью ОА визуализации показано отсутствие регулярной структуры сосудистой сети всех экспериментальных новообразований. Опухоль Colo320 характеризуется присутствием обширных гемоглобин-содержащих структур, предположительно, кровоизлияний, а также более высокими значениями размера и фракции сосудов. Для НСТ116 и SN-12C значения данных показателей были сопоставимы с нормой. Методом ИГХ у Colo320 выявлены более высокие значения относительной гипоксической фракции по сравнению с SN-12C и НСТ116, что подтверждает результаты ОДС.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда № 21-15-00032.

Исследование физико-химических характеристик флуоресцентных зондов класса азолотриазинов для идентификации микроорганизмов

Вандышев Д.Ю.^{1*}, Крутских А.С.¹, Колтаков И.А.¹, Потапов А.Ю.¹, Антипов С.С.¹, Шихалиев Х.С.¹,
Хмелевская Т.Н.²

¹Воронежский государственный университет ;

²Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко;
francy_2007@mail.ru

Большинство известных зондов характеризуются невысокими значениями Стоксова сдвига, что затрудняет выделение флуоресцентного сигнала на фоне рассеянного света возбуждения, в частности излучения в УФ-области при флуоресцентной навигации. Кроме этого, большинство из них обладают достаточно высокой цитотоксичностью. Поэтому актуальной задачей остается проблема выбора и создания номенклатуры библиотек флуоресцентных молекул, обладающих меньшей энергией возбуждения и, как следствие, менее опасными для живых организмов, оптимально подходящих для идентификации бактериальных штаммов.

Отправной точкой исследования стал скрининг спектральных характеристик азолотриазиновых флуоресцентных зондов синтезированных *de novo*. Было использовано 4 образца зондов, которые обладали несколькими максимумами поглощения в диапазоне длин волн 361–504 нм. Первый зонд (3-метил-6-фенилимидазо[1,2-*b*][1,2,4]триазин-2-карбоновая кислота) – далее ФЗ-1, имел два максимума в области 361 и 523 нм, второй зонд (2-(6-оксо-2-фенилимидазо[1,2-*b*]пиридо[4,3-*e*][1,2,4]триазин-7(6Н)-ил)этансульфоновая кислота) – далее ФЗ-2, обладал двумя максимумами в области 379.5 и 504.4 нм, третий ((6-оксо-2-фенилимидазо[1,2-*b*]пиридо[4,3-*e*][1,2,4]триазин-7(6Н)-ил)уксусная кислота) – далее ФЗ-3, при 372.5 и 495 нм, а четвертый (2-(6-оксо-2-фенилимидазо[1,2-*b*]пиридо[4,3-*e*][1,2,4]триазин-7(6Н)-ил)пентандиовая кислота) – далее ФЗ-4, в области 374 и 493.5 нм. Интенсивность максимумов поглощения первых двух красителей имела схожее значение, у третьего зонда интенсивность максимума была на 27% ниже, а интенсивность максимума поглощения четвертого зонда составляла ~ 23% от интенсивности первых двух зондов. Таким образом, полученные данные предполагают различную эффективность при взаимодействии, как с отдельными молекулами белка, так и с бактериальными клетками. Поэтому, для проверки такого предположения, на следующем этапе было проведено экспериментальное тестирование изменений параметров флуоресценции на двух модельных объектах разного уровня организации. В качестве модели белка был использован коммерческий препарат белка лизоцима, а в качестве модельного микроорганизма был использован штамм *Escherichia coli* BL21*(DE3).

Оценка эффективности флуоресценции комплекса зонд-белок была исследована с использованием возбуждающей длинной волны, соответствующей максимумам поглощения выявленным экспериментально. Модельным белком был лизоцим – антибактериальный фермент класса гидролаз, структура и функции которого хорошо изучены. В ходе регистрации спектров флуоресценции комплекса зонд-лизоцим было выявлено смещение максимума флуоресценции для ФЗ-1 и ФЗ-3 в более коротковолновую область спектра, а для ФЗ-2 и ФЗ-4 – в длинноволновую. Помимо этого, для ФЗ-2 и ФЗ-3 в присутствии лизоцима наблюдалось падение интенсивности флуоресценции почти в 10 раз, для раствора ФЗ-1 – в 2 раза, а для раствора лизоцима и ФЗ-4 падение интенсивности составило примерно в 5 раз по сравнению с исходным значением. Спектры регистрировали непосредственно сразу после приготовления и после инкубации раствора в течение 45 минут при 37°C. Интенсивность сигнала флуоресценции свежеприготовленных образцов выходила за пределы чувствительности прибора, поэтому содержание этих красителей в пробе было снижено в 5 и в 10 раз. При снижении содержания в пробе ФЗ-1 в 10 раз интенсивность флуоресценции падала почти в два раза, а 45-ти минутная инкубация комплекса при 37°C приводила к еще двукратному понижению интенсивности. Однако, уменьшение содержания этого зонда в 5 раз, наоборот, вызывало почти двукратное увеличение флуоресценции, которая снижалась в течение 45 минут при 37°C, но не достигала исходного значения. Снижение содержания в пробе ФЗ-2 и ФЗ-3 носило сходный характер. Их разбавление в 10 и в 5 раз приводило почти к 10-ти и 5-ти кратному снижению сигнала флуоресценции, а после инкубации при 37°C в течение 45 минут сигнал снижался еще почти в два раза. Использование ФЗ-4 приводило к изменению сигнала, аналогичным, как и в экспериментах с ФЗ-1. Тем не менее стоит отметить, что исходная интенсивность флуоресценции ФЗ-4 была на 27% ниже, чем первого.

Цитохимическое окрашивание клеток *E.coli* проводили по модифицированному и оптимизированному протоколу. Для получения изображений был использован флуоресцентный микроскоп Nikon Eclipse Ni-E с возбуждающей длиной волны 260-380 нм. В качестве контроля были использованы клетки, не обработанные красителем. Полученные данные свидетельствуют о том, что в контрольной группе сигналы флуоресценции от объектов, размеры которых сопоставимы с клетками *E.coli*, не обнаружены. Результаты окрашивания клеток с использованием ФЗ-2 и ФЗ-3 не дали значимых результатов, что согласуется с данными спектральных

исследований. Цитохимическое окрашивание клеток с использованием ФЗ-4 давало сигнал, но интенсивность его была значительно ниже, а число объектов было меньше, по сравнению со случаем использования ФЗ-1.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что химическая структура и свойства флуоресцентных зондов в значительной степени отличаются. Оптимальным, для решения поставленной задачи, является зонд ФЗ-1. Учитывая тот факт, что значительного снижения роста бактериальных клеток не происходило при добавлении зонда ФЗ-1, то его можно рассматривать в качестве потенциального низкотоксичного красителя для изучения цитоархитектоники биосистем методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Для улучшения показателей ФЗ-2 и ФЗ-3 и, отчасти, ФЗ-4 требуются внедрение дополнительных химических якорных групп (введение иных групп, заместителей и т.д.) для лучшей связки с матриксом бактериальных клеток, что может быть связано с более тщательной синтетической переработкой для увеличения сдвига Стокса в более длинноволновую область спектра.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (проект МК-4978.2022.1.3).

Исследование флуоресценции EGFP при его де- и ренатурации, и при добавлении наночастиц

Можаева В.А.^{1*}, Саримов Р.М.¹

¹*Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия;*
1996-racer@mail.ru

Зеленый флуоресцентный белок (GFP) был впервые выделен из медузы *Aequorea Victoria*. Он проявляет ярко-зеленую флуоресценцию. Так называемый усиленный GFP (EGFP) представляет собой мутантную версию GFP, с улучшенными спектральными характеристиками, а также более эффективным фолдингом при относительно высоких температурах, что обеспечивает возможность использования EGFP в клетках млекопитающих. Этот белок широко используется в клеточной биологии с применением метода флуоресцентной микроскопии.

Важно изучить влияние различных факторов внешней среды на GFP и его производные, в частности, исследовать стабильность его флуоресцентных свойств и способность восстанавливать флуоресцентный сигнал в процессе денатурации-ренатурации. Ранее [1], исследователям удавалось достичь ренатурации 90% белка GFP. В данной работе мы провели исследование денатурации-ренатурации наиболее часто используемой сегодня версии этого белка – EGFP, а также влияния на его флуоресценцию добавления наночастиц.

Спектр флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре JASCO FP-8300 с разрешением 1 нм в кювете с оптическим путем 1 мм. Диапазон измерений составлял: для возбуждения (Ex) – 240-540 нм, для излучения (Em) – 260-600 нм. Итоговый объем всех измеряемых образцов был равен 1.5 мл. Денатурация белка EGFP проводилась в течение 30 мин в 6 М растворе гуанидина HCl (GdHCl). К EGFP добавляли частицы оксида железа (FeO, Fe₂O₃, Fe₃O₄), покрытые цитратом натрия (TSC-IONP). Наночастицы были получены путем химического осаждения оксида гидратом аммония из водного раствора смеси солей хлоридов железа. Наночастицы образуют самоорганизующиеся стабильные кластеры размером ~10 и 50–80 нм, состоящие из НЧ размером 3 нм. Стабильность контролировали с помощью метода динамического светорассеяния.

Результаты

Были записаны спектры флуоресценции нативного EGFP. Помимо основного пика флуоресценции Ex488nm/Em510nm (основной пик) наблюдался пик Ex277nm/Em511nm (минорный пик), наличие которого было объяснено существованием двух различных конформаций этого белка ранее [2]. Также присутствовал пик, обусловленный ароматическими остатками, с характерной длиной волны возбуждения в районе 280 нм. При денатурации наблюдалось полное тушение основного и минорного пиков флуоресценции. При этом пик, обусловленный ароматическими остатками, становился более интенсивным (примерно в 2 раза). Это может быть связано с выходом гидрофобных остатков на поверхность белка при его денатурации.

Чтобы пронаблюдать ход денатурации во времени, мы измерили кинетику флуоресценции этого процесса. Нам удалось наблюдать тушение флуоресценции во времени при денатурации EGFP в концентрации 0.053 г/л: интенсивность основного максимума падала в 2 раза менее чем за полминуты. Мы также установили, что при росте концентрации белка тушение флуоресценции при его денатурации замедляется. Так, при концентрации 0.067 г/л уменьшение интенсивности основного максимума в 2 раза происходило уже примерно за 0.8 мин. Вероятно, это связано с уменьшением отношения (число молекул GdHCl)/(число молекул белка) при росте концентрации белка.

Мы также провели исследование восстановления флуоресценции EGFP, подвергнутого денатурации, при ренатурации этого белка путем разбавления (водой) его раствора в GdHCl в 10 и в 50 раз. В первом случае

восстановления сигнала флуоресценции не произошло, тогда как при разбавлении в 50 раз (при этом, конечная концентрация EGFP - 0.002 г/л) мы обнаружили восстановление интенсивности флуоресценции в размере 40% от первоначального сигнала. Исходя из предположения о линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации белка, это число можно рассматривать как процент ренатурации.

Дополнительно, было исследовано влияние на спектры флуоресценции добавления различного количества TSC-IONP (концентрации 10 нм кластеров $\sim 10^{13}$ - 10^{14} мл⁻¹). В данном случае рассматривалось только изменение положения максимума флуоресценции, так как изменение интенсивности флуоресценции было обусловлено, в первую очередь, уменьшением светопропускания раствора наночастиц при увеличении их концентрации. Было обнаружено, что при добавлении TSC-IONP происходит дрейф основного максимума флуоресценции белка в сторону больших длин волн. Это может быть связано с изменением окружения, с которым хромофор белка электростатически взаимодействует. Известно [3], что рядом с хромофором находится ряд полярных групп и структурированных молекул воды. Возможно, частицы, посредством взаимодействия с внешней поверхностью белка, изменяют это окружение хромофора.

Таким образом, нам удалось продемонстрировать частичную ренатурацию EGFP и выяснить некоторые детали процесса денатурации-ренатурации. Мы также обнаружили сдвиг основного максимума флуоресценции белка в сторону больших длин волн при добавлении наночастиц оксида железа.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-22-00951, <https://rscf.ru/project/22-22-00951/>

Список источников

1. Ward WW, Bokman SH. Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry*. 1982 Sep 14;21(19):4535-40. doi: 10.1021/bi00262a003.
2. Dos Santos NV, Saponi CF, Greaves TL, Pereira JFB. Revealing a new fluorescence peak of the enhanced green fluorescent protein using three-dimensional fluorescence spectroscopy. *RSC Adv*. 2019 Jul 24;9(40):22853-22858. doi: 10.1039/c9ra02567g.
3. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:509-44. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.509.

Конструирование экспериментального гроубокса для микроклонального размножения картофеля

Бурдышева О.В.¹, Шолгин Е.С.¹, Лисина Т.Н.^{1*}, Цема Л.Г.¹

¹Пермский НИИСХ филиал ПФИЦ УрО РАН;

atea2@yandex.ru

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) это значимая культура для экономики многих стран, в том числе для России. Ключевым моментом в успешном получении высокого урожая картофеля является качество посадочного материала. Для получения оздоровленного посадочного материала картофеля проводится размножение в культуре *in vitro*, где очень важны условия освещения [1]. На продуктивность картофеля в светокультуре оказывают влияние такие характеристики освещения как интенсивность, продолжительность фотопериода, импульсное/непрерывное излучение, спектральный состав [2,3]. Разные сорта картофеля имеют специфичный ответ на освещение с разными спектральными характеристиками [4,5], поэтому в работе с картофелем на стадии микроклонального размножения важно подобрать оптимальное освещение с учетом сортовых особенностей.

Целью работы является конструирование экспериментального гроубокса для выявления освещения с оптимальными характеристиками спектра для разных сортов картофеля.

Сотрудниками лаборатории агробиофотоники Пермского НИИСХ ПФИЦ УрО РАН сконструирован гроубокс. Для формирования достаточного количества экспериментальных секторов полки гроубокса разделялись отражающими экранами. Микроклимат в гроубоксе поддерживается при помощи вентиляционных отверстий и за счет установленных систем климат-контроля в лабораторных помещениях. Для измерения температуры внутри секторов гроубокса установлены термодатчики ТП-А-2488-10-4-ХА. Сбор и хранение данных с термодатчиков реализованы при помощи микрокомпьютера Orange Pi Zero 2 V1.3.

Необходимый 16-часовой фотопериод внутри гроубокса реализован при помощи механического таймера Systec. В качестве основного освещения использованы люминесцентные фитолампы OSRAM L 30W/77 T8 Fluora. Для внесения дополнительной спектральной составляющей к основному спектру реализованы светодиодные линейки. Используются 3W SMD диоды, которые устанавливались на радиаторы в линейку. Светодиодные линейки закреплены рядом с основными лампами. Питание светодиодных линеек реализовано от блока питания "PM(P4) 350W" выходом 12V к 7 линейкам, параллельно соединенных в рамках одной полки и последовательно между полками. В исследовании влияния источника освещения были использованы следующие

добавочные спектры к фитолампе OSRAM L 30W/77 T8 Fluora: в видимой области - 420-430 нм, 660 нм, 730 нм; ИК - 850 нм, 940 нм; УФ- 365 нм, 395-400 нм; контроль - без добавочного спектра.

Проведя анализ спектров, можно заметить, что линейки светодиодов 365 нм, 395-400 нм, 420 - 430 нм не внесли значительного вклада в общий фотосинтетический фотопоток. Линейки 660 и 730 нм дали значительную прибавку в общий фотопоток. Линейки 850 и 940 нм соразмерны основному спектру фитолампы по интенсивности.

Таким образом, в Пермском НИИСХ ПФИЦ УрО РАН сконструирован гроубокс для экспериментального определения оптимального спектрального состава освещения для микроклонального культивирования картофеля *in vitro*. Спектральные характеристики освещения в секторах гроубокса подобраны с учетом опубликованных результатов экспериментальных работ по изучению влияния освещения на растения картофеля.

1. Seabrook J.E.A. Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro*: a review. *Am. J. Potato Res.*, 2005, 82: 353-367 doi: 10.1007/BF02871966.

2. PLANT MORPHOGENESIS UNDER DIFFERENT LIGHT INTENSITY Kulchin Yu.N., Nakonechnaya O.V., Gafitskaya I.V., Grishchenko O.V., Epifanova T.Yu., Orlovskaya I.Yu., Zhuravlev Yu.N., Subbotin E.P. *Diffusion and Defect Data. Pt A Defect and Diffusion Forum*. 2018. T. 386 DDF. C. 201-206.

3. Мартиросян Ю.Ц., Диловарова Т.А., Мартиросян В.В., Креславский В.Д., Кособрюхов А.А. Действие светодиодного облучения различного спектрального состава на фотосинтетический аппарат растений картофеля в культуре *in vitro*. *Сельскохозяйственная биология*, 2016, 51(5): 680-687 doi: 10.15389/agrobiology.2016.5.680rus.

4. Е. П. Субботин, И. В. Гафицкая, О. В. Наконечная, Ю. Н. Журавлев, Ю. Н. Кульчин. Влияние искусственного солнечного света на рост и развитие растений-регенерантов *Solanum tuberosum* / *Turczaninowia* 21 (2): 32–39 (2018).

5. Варушкина, А., Луговская, Н., & Максимов, А. (2019). Рост и продуктивность картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в условиях светокультуры. *Вестник Пермского федерального исследовательского центра*, (2), 37–46. <https://doi.org/10.7242/2658-705X/2019.2.4>

Лазерная плазмонно-резонансная фототермическая терапия модельной перевитой опухоли почки у крыс

Генина Э.А.^{1,2*}, Генин В.Д.^{1,2}, Бучарская А.Б.^{3,1}, Кириллин М.Ю.⁴, Зарьков С.В.⁵, Наволокин Н.А.^{3,1}, Терентюк Г.С.³, Хлебцов Б.Н.^{6,1}, Хлебцов Н.Г.^{6,1}, Маслякова Г.Н.³, Тучин В.В.^{1,2,5}

¹*Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского;*

²*Национальный исследовательский Томский государственный университет;*

³*Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского;*

⁴*Институт прикладной физики РАН;*

⁵*Институт проблем точной механики и управления РАН;*

⁶*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН;*
eagenina@yandex.ru

В настоящее время наряду со многими, уже ставшими традиционными, методами лечения, такими как хирургия, химиотерапия, фотодинамическая терапия, лучевая терапия и т. д. все большее внимание привлекают методы, основанные на использовании современных нанотехнологий и, в частности, лазерная плазмонно-резонансная фототермическая терапия (ПФТТ). Действие ПФТТ основано на накоплении плазмонно-резонансных наночастиц в тканях опухоли и локальном нагреве их с помощью лазерного облучения с соответствующей длиной волны, что позволяет снизить дозу лазерного излучения и уменьшить ущерб, причиняемый окружающим опухоль здоровым тканям.

В данном исследовании в качестве модели использовалась культура клеток рака почки, полученная из банка опухолевых штаммов Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина, перевитая подкожно крысам-самцам альбиносам. Золотые наностержни (ЗНС) с максимумом длины волны поглощения 800 нм вводились внутриопухолево. Облучение проводилось чрескожно с помощью диодного лазера. Измерены оптические свойства отдельных слоёв (капсула, периферия и центральная часть) зрелой опухоли и кожи крыс в спектральном диапазоне 350-2200 нм, и с помощью метода инверсного добавления-удвоения рассчитаны коэффициенты поглощения, рассеяния, анизотропии рассеяния и транспортный коэффициент рассеяния. Моделирование распространения фотонов в коже и опухоли до и после введения суспензии ЗНС, проводилось методом Монте-Карло и использовалось для оценки поглощения лазерной энергии в опухоли. Получены результаты численного моделирования распределения тепла в опухоли и окружающих тканях. Результаты моделирования хорошо согласуются с экспериментально измеренной кинетикой температуры поверхности кожи

над опухолью в процессе проведения ПФТТ. Экспериментально изучены изменения оптических свойств исследуемых биотканей в результате проведения ПФТТ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-52-56005.

Механизм возрастного падения концентрации меланина в клетках ретинального пигментного эпителия глаза

Донцов А.Е.^{1*}, Яковлева М.А.¹, Васин А.А.², Гулин А.А.², Айбуш А.В.², Надточено В.А.², Островский М.А.¹

¹ФГБУН Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН;

²ФГБУН ФИЦ ХФ имени Н.Н. Семенова РАН;

adontsovnick@yahoo.com

Известно, что в процессе старения происходит значительное снижение количества меланосом в клетках ретинального пигментного эпителия (РПЭ) глаза человека [1,2]. Однако конкретные механизмы этого явления неизвестны.

Ранее мы показали, что при взаимодействии меланина меланосом с радикалами супероксида происходит его окислительная деструкция с образованием водорастворимых флуоресцирующих продуктов [3], содержащих высокоактивные карбонильные соединения [4]. В настоящем исследовании методами флуоресцентного анализа, ВЭЖХ и масс спектрометрии показано, что при облучении видимым светом меланолипофусциновых гранул, выделенных из клеток РПЭ глаза человека, образуются водорастворимые флуоресцирующие продукты. Образование этих продуктов происходит в результате окислительной деструкции меланина, вызванной радикалами супероксида, которые генерируются липофусциновой частью меланолипофусциновой гранулы. Важно подчеркнуть, что при облучении фракций меланосом и липофусциновых гранул, образования водорастворимых флуоресцирующих продуктов не происходит. Деструкция меланосом при действии света возможна, однако для этого требуются значительно более высокие интенсивности облучения, чем при облучении меланолипофусциновых гранул. Объясняется это тем, что в меланосомах, в отличие от меланолипофусциновых гранул, отсутствует липофусцин – свето-зависимый генератор радикалов супероксида.

Были определены флуоресцирующие продукты свето-индуцированного распада меланина как в составе меланосом, так и в составе меланолипофусциновых гранул. Статистический анализ методом главных компонент (РСА) для масс спектрометрических данных, полученных методом ToF-SIMS, позволил идентифицировать пики, характерные именно для этих продуктов свето-индуцированного распада меланина. Впервые было показано, что водорастворимые продукты деградации меланина, вызванной радикалами супероксида, являются свето-чувствительными генераторами активных форм кислорода. Из этого следует, что процесс свето-индуцированного распада меланина в меланолипофусциновой грануле может усиливаться по мере накопления продуктов деградации меланина.

Делается вывод о том, что падение концентрации меланина в клетках РПЭ глаза человека с возрастом обусловлено его окислением активными формами кислорода, генерируемыми липофусцином в составе меланолипофусциновых гранулах под действием света.

Литература

1. Feeney-Burns, L., Hilderbrand, E.S., and Eldridge, S. (1984) Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 25, 195–200.
2. Rozanowski, B., Cuenco, J., Davies, S., Shamsi, F.A., Zadlo, A., Dayhaw-Barker, P., Rozanowska, M., Sarna, T., and Boulton, M. (2008). The phototoxicity of aged human retinal melanosomes, Photochem. Photobiol., 84, 650–657.
3. A E Dontsov, N L Sakina, M A Ostrovsky. Loss of Melanin by Eye Retinal Pigment Epithelium Cells Is Associated with Its Oxidative Destruction in Melanolipofuscin Granules. Biochemistry (Mosc). 2017, 82(8):916-924. doi: 10.1134/S0006297917080065
4. Gulina A. A., Dontsov A. E., Yakovleva M. A., Trofimova N. N., Aybush A. V., Vasin A. A., Ostrovsky M. A., Oxidative destruction of human RPE melanosomes induced by superoxide radicals leads to the formation of reactive aldehydes and ketones, St. Petersburg State Polytechnical University Journal. Physics and Mathematics. 15 (3.2) (2022) 311–316. doi: <https://doi.org/10.18721/JPM.153.257>

Механизм ингибирования кислород-выделяющего комплекса фотосистемы 2 катионами лантаноидов

Ловягина Е.Р.^{1*}, Локтюшкин А.В.¹, Семин Б.К.¹

¹МГУ, биологический факультет;

Elena.Lovyagina@gmail.com

Катионы La^{3+} и других лантаноидов (Ln^{3+}) были использованы в качестве аналогов катиона Ca^{2+} для исследования роли этого катиона в работе кислород-выделяющего комплекса (КВК) фотосистемы 2 (ФС2). Ghanotakis et al. (1985) обнаружили, что La^{3+} ингибирует активность КВК, вытесняя катион Ca^{2+} из каталитического центра Mn_4CaO_5 . Реакция выделения кислорода в мембранах ФС2, содержащих катион Ln^{3+} вместо Ca^{2+} , не восстанавливается экзогенным катионом Ca^{2+} , т. е. связанный с Са-связывающим участком катион Ln^{3+} не вытесняется катионом Ca^{2+} . В частицах ФС2 без Ca^{2+} (ФС2(-Са)) катионы Ln^{3+} конкурируют с катионами Ca^{2+} за Са-связывающий участок (Оно 2000).

Помимо Са-связывающего участка лантаноиды эффективно связываются и с Мп-связывающим участком, а именно, с высокоаффинным Мп-связывающим участком ФС2, из КВК которой предварительно были экстрагированы катионы марганца (Lovyagina et al. 2021). Высокоаффинный Мп-участок локализован в нативной кристаллической структуре ФС2 в позиции Mn_4 согласно нумерации Umena et al. (2011). Лигандами этого катиона марганца являются остатки аминокислот Asp170 и Glu333 в полипептиде D1 (Asada and Mino 2015). Интересно отметить, что остаток D1-Asp170 участвует также и в связывании катиона кальция, являясь бидентантным лигандом. Эта особенность позволяет предполагать возможность взаимодействия Са-связывающего участка с высокоаффинным Мп-участком КВК при связывании катионов Ln^{3+} . В данной работе подобная возможность была исследована.

В работе были использованы мембранные препараты ФС2, из КВК которых был экстрагирован катион кальция путем обработки средой с высокой ионной силой (2М NaCl). Предварительно было установлено, что катионы La^{3+} и Tb^{3+} необратимо связываются с Са-связывающим участком (связанный катион не удаляется центрифугированием и отмывкой препарата). Далее, после соответствующей обработки, была измерена кинетика восстановления искусственного акцептора электронов 2,6-дихлорфенолиндифенола в присутствии экзогенных доноров электронов – пары $[\text{Mn}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2]$, донирующей электроны только через высокоаффинный Мп-связывающий участок, или 2,5-дифенилкарбазида, донирующего электроны через два участка – высокоаффинный и низкоаффинный. Были исследованы следующие образцы. 1) Из частиц ФС2(-Са) был экстрагирован марганец обработкой гидроксиламином или гидрохиноном. 2) ФС2(-Са) мембраны были инкубированы с катионом La^{3+} или Tb^{3+} , после чего несвязанные катионы лантаноидов были удалены центрифугированием и из мембран был экстрагирован марганец. 3) Из мембран ФС2(-Са) после инкубации с катионом La^{3+} или Tb^{3+} и пересадки был экстрагирован марганец, после чего был добавлен катион лантаноида, и измерена кинетика в присутствии катиона Ln^{3+} . Полученные результаты показали, что связанный с Са-участком катион Ln^{3+} значительно ингибирует окисление донорной пары $[\text{Mn}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2]$ через высокоаффинный Мп-связывающий участок (65 – 80 % ингибирования при полной экстракции марганца гидроксиламином, образец 2). Это означает, что связанный с Са-участком катион Ln^{3+} эффективно ингибирует связывание катиона Mn^{2+} с высокоаффинным участком. Возможны два механизма модификации катионом Ln^{3+} координационной сферы высокоаффинного Мп-участка – до экстракции марганца или после. Существенное ингибирование процесса окисления воды катионом Ln^{3+} в препаратах ФС2(-Са) без экзогенного донора электронов (примерно на 50%) означает, что модификация высокоаффинного Мп-связывающего участка катионом лантаноида происходит при связывании его с Са-связывающим участком до экстракции марганца из КВК.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500058-7.

Asada M, Mino H (2015) Location of the High-Affinity Mn^{2+} Site in Photosystem II Detected by PELDOR. J Phys Chem B 119:10139–10144. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.5b03994>

Ghanotakis DF, Babcock GT, Yocum CF (1985) Structure of the oxygen-evolving complex of photosystem II: calcium and lanthanum compete for sites on the oxidizing side of photosystem II which control the binding of water-soluble polypeptides and regulate the activity of the manganese complex. Biochim Biophys Acta 809:173–180. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(85\)90060-X](https://doi.org/10.1016/0005-2728(85)90060-X)

Lovyagina ER, Loktyushkin AV, Semin BK (2021) Effective binding of Tb^{3+} and La^{3+} cations on the donor side of Mn depleted photosystem II. J Biol Inorg Chem 26:1–11. <https://doi.org/10.1007/s00775-020-01832-w>

Ono T (2000). Effects of lanthanide substitution at Ca^{2+} -site on the properties of the oxygen evolving center of photosystem II. J Inorg Biochem 82:85-91. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(00\)00144-6](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(00)00144-6)

Umena Y, Kawakami K, Shen J-R, Kamiya N (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. Nature 473:55–60. <https://doi.org/10.1038/nature09913>

Механизмы образования и диффузии пероксида водорода в хлоропластах высших растений

Борисова-Мубаракшина М.М.^{1*}, Козулева М.А.¹, Найдов И.А.¹, Ветошкина Д.В.¹, Руденко Н.Н.¹, Иванов Б.Н.¹

¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН;
mubarakshinamm@gmail.com

Известно, что в хлоропластах высших растений пероксид водорода (H₂O₂) образуется в реакции диспропорционирования супероксидных анион-радикалов (O₂^{•-}), катализируемой супероксиддисмутазой (СОД) в строме хлоропластов (Asada, 1999). Нами показано, что часть молекул H₂O₂ образуется в тилакоидных мембранах хлоропластов, и что при увеличении интенсивности действующего света рост образования H₂O₂ происходит, в основном, за счет образования в мембране. В мембране отсутствует СОД, кроме того, реакция диспропорционирования O₂^{•-} в апротонной среде мембраны с низкой диэлектрической проницаемостью затруднена, предполагая протекание другого, отличного от диспропорционирования, пути образования H₂O₂ в тилакоидной мембране. Нами установлено, что образование «мембранного» H₂O₂ происходит в результате реакции O₂^{•-} с пластогидроксином (ПХН₂): ПХН₂ + O₂^{•-} → ПХ[•] + H₂O₂; реакция является термодинамически выгодной вследствие большой разницы между величинами окислительно-восстановительных потенциалов пар ПХ[•]/ПХН₂ (Em₇ 370 мВ) (Hauska и др., 1983) и O₂^{•-}/H₂O₂ (Em₇ 940 мВ) (Asada, 1999); расчетная константа термодинамического равновесия реакции ~ 5×10⁹ (Mubarakshina, Ivanov, 2010). Согласно этим потенциалам, реакция ПХН₂ + O₂^{•-} протекает на границе фаз тилакоидная мембрана/строма.

H₂O₂ – одна из наиболее важных сигнальных молекул среди активных форм кислорода (АФК). Основопологающим фактором осуществления ретроградного сигнала (сигнала от органелл к ядру) является способность АФК диффундировать от места образования до места передачи сигнала. Нами были исследованы а) возможность диффузии H₂O₂ через мембраны оболочки хлоропласта и б) механизм этой диффузии с помощью метода ЭПР с применением гидрофильной спиновой ловушки POBN, а также с помощью конфокальной микроскопии и красителя Amplex Red. Полученные результаты показали, что даже при низкой интенсивности света часть молекул H₂O₂, образующихся внутри хлоропластов, способны диффундировать через мембраны хлоропластов.

Для выяснения механизма диффузии H₂O₂ была исследована роль аквапоринов – белков, формирующих поры в хлоропластной мембране, через которые проходят молекулы воды. Используя ингибиторы аквапоринов AgNO₃ и ацетазоламид (AZA), было показано, что H₂O₂ диффундирует через оболочку хлоропласта через аквапорины. В экспериментах с использованием AZA, который помимо ингибирования аквапоринов, известен также как ингибитор карбоангидраз (КА), ферментов, катализирующих обратимую реакцию образования угольной кислоты из диоксида углерода и воды, было обнаружено, что оболочка хлоропласта обладает КА активностью, что указывает на наличие КА, связанной(ых) с оболочкой хлоропласта.

Учитывая, что произвольная диффузия молекул H₂O₂ через мембраны маловероятна, коэффициент распределения гидрофобная фаза (бензол)/вода 0.005 (Leo и др., 1971), участие аквапоринов в транспорте H₂O₂ через оболочку хлоропластов позволяет рассматривать эти белки как важный элемент внутриклеточной сигнализации. Полученные нами данные о наличии КА, связанной(ых) с оболочкой хлоропласта, свидетельствуют о том, что регуляция активности аквапоринов, связана, по-видимому, с функционированием карбоангидраз мембранной оболочки хлоропластов.

Митогенетический эффект сверхслабого свечения: спящая красавица или алхимическое прошлое? (к столетию открытия А.Г. Гурвичем сверхслабого свечения биообъектов)

Володяев И.В.¹, Наумова Е.В.^{2*}

¹Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова;

²Институт физики полупроводников им. А.В.Ржанова СО РАН;
naumova@yandex.ru

Как известно, первая работа по сверхслабому свечению (ССИ) биологических объектов была опубликована в 1923 г А.Г. Гурвичем [1], и исследования ССИ получили широкое развитие в последующие годы (см., например, монографии [2,3]). Кроме непосредственного продолжения в лабораториях Гурвича, эти исследования привлекли широкое внимание биологов, физиков и химиков во всем мире и привели к появлению более 1000 публикаций из крупных лабораторий СССР, Германии, Франции, Италии, Нидерландов, США и

других стран (см. обзоры [4-7]), в том числе более десятка работ в *Nature* и других высокорейтинговых журналах (например, [8-11]). Значительный вклад в исследования того времени внесли выдающиеся ученые: нобелевский лауреат Д. Габор [3], акад. Г.М. Франк и акад. Ю.Б. Харитон [12,13], выдающийся химик Р. Одюбер [14], известные микробиологи О. Rahn [15] и L.K. Wolff [11] и др.

Авторы этого периода относили наблюдаемое ими ССИ к УФ диапазону по совокупности экспериментальных данных: пропусканию излучения фильтрами из материалов с различными окнами прозрачности, результатам спектральных исследований, измерениям с помощью УФ-чувствительных газоразрядных счетчиков. Значительная доля работ того времени по тематике ССИ была посвящена его влиянию на скорость митозов ряда биологических объектов (бактерий, дрожжевых грибов, меристем растений и т.п.). Этот «тип ССИ» был назван митогенетическим излучением (МГИ).

С началом Второй мировой войны публикации по теме МГИ практически полностью прекратились, а последующее переоткрытие явления ССИ [16-18] привело к успешному развитию области собственной сверхслабой хемилюминесценции в видимом и ИК диапазонах. При этом упоминания «ранних работ» 1920-х—1940-х гг остались преимущественно в исторических обзорах.

В то же время, ряд проблем, поднятых в ранних публикациях, остались без однозначного решения. Так, в работах [19-21] эффект тушения МГИ крови человека и животных использовался для диагностики онкологических заболеваний. Эффективность онкодиагностики была проверена в ведущих онкологических клиниках Москвы, Ленинграда и ряда других городов СССР, а также на экспериментальных животных моделях, и показала совпадение с диагнозом с точностью 95-97% [19-21]. Кроме того, сам факт утверждаемой авторами стимуляции митозов в тканях за счет их экспонирования МГИ других биообъектов является неожиданным (в контексте современных знаний о природе ССИ в более длинноволновых диапазонах) и его проверка имеет фундаментальное значение.

Нам посчастливилось получить доступ к сохранившейся библиотеке А.Г. Гурвича и его семьи и ознакомиться с оригиналами работ того времени. Большинство из них по разным причинам практически недоступны современному читателю, и рассмотрены нами в ряде обзоров по этой теме [4-7] и готовящейся монографии по эндогенной биофотонике (Springer-Nature, 2023). Здесь мы анализируем методические аспекты работ по МГИ и сопоставляем их результаты с современными данными по физике, биофизике и физиологии объектов исследования. Хотя часть работ того времени выполнена на несовременном уровне доказательности, а в ряде случаев имеются прямые ошибки, целый ряд глубоких тщательных экспериментальных работ (например, [3,11-13,19]) заслуживает серьезного внимания и проверки современными исследователями.

Значимых попыток повторить и проверить эти работы, соблюдая описанные авторами условия, за редким исключением (например, [22]), не было, по-видимому, ввиду их малой доступности.

Мы убеждены, что точная, грамотно проведенная проверка феномена МГИ будет иметь большое научное значение – как фундаментальное (исследование сигнальных каскадов и регуляторных процессов), так и прикладное (диагностика онкозаболеваний, неинвазивный метод оценки состояния различных систем). Значительный прогресс в области методов клеточной биологии, биохимии и биофизики, физических методов и техники эксперимента позволяют надеяться, что на современном уровне эта проблема, имеющая важное фундаментальное и прикладное значение, будет решена.

1 A. G. Gurwitsch, Arch. Mikr. Anat. Entwickl. 100 (1-2), 11 (1923).

2 А. Г. Гурвич, Л. Д. Гурвич, Митогенетическое излучение. (ВИЭМ, Л., 1934).

3 T. Reiter and D. Gabor, Zellteilung und Strahlung. (Springer-Verlag, Berlin, 1928).

4 И. В. Володяев, Л. В. Белоусов, И. И. Концевая и др., Биофизика 66 (6), 1082 (2021).

5 Е. В. Наумова, Ю. А. Владимиров, Л. В. Белоусов и др., Биофизика 66 (5), 900 (2021).

6 E. V. Naumova, A. E. Naumova, D. A. Isaev et al, J Biomed Phot & Eng 4 (4), 040201 (2018).

7 I. V. Volodyaev, L. V. Belousov, Frontiers in physiology 6 (00241), 1 (2015).

8 A. G. Gurwitsch, L. D. Gurwitsch, Nature 143 (3633), 1022 (1939).

9 M. Heinemann, Nature 134, 701 (1934).

10 E. G. Prokofiewa, Nature 134 (3389), 574 (1934).

11 L. K. Wolff and G. Ras, Nature 133 (3361), 499 (1934).

12 J. Chariton, G. Frank, и N. Kannegiesser, Naturwiss. 18 (19), 411 (1930).

13 G. Frank, Biol. Zentr. 49, 129 (1929).

14 R. Audubert, Ang. Chemie 51 (11), 153 (1938).

15 O. Rahn, Invisible radiations of organisms. (Gebrüder Bornträger, Berlin, 1936).

16 L. Colli, U. Facchini, Il Nuovo Cimento 12 (1), 150 (1954).

17 Б. Н. Тарусов, А. И. Поливода, А. И. Журавлев, Биофизика 6 (4), 490 (1961).

18 Ю. А. Владимиров, Ф. Ф. Литвин, Биофизика 4 (5), 601 (1959).

19 Б. С. Песоченский, Феномен тушения митогенетического излучения крови при раке и "предраковых состояниях: Дисс. д-р мед.наук, Л., 1942.

20 Е. Е. Авчина, О прогностическом значении реакции тушения митогенетического излучения крови при лечении рака матки: Дисс. канд. мед. наук, Л., 1950.

- 21 А. Г. Гурвич, Л. Д. Гурвич, С. Я. Залкинд и др., Учение о раковом тушителе, АМН СССР, М., 1947.
22 R. N. Tilbury, T. I. Quickenden, J Biolum & Chemilum 7 (4), 245 (1992).

Модификация хромофорной группы как метод тонкой настройки оптических свойств микробных родопсинов

Ходонов А.А.^{1*}, Беликов Н.Е.¹, Сафинова А.Я.¹, Демина О.В.¹, Петровская Л.Е.², Крюкова Е.А.²,
Долгих Д.А.², Лукин А.Ю.³, Кирпичников М.П.², Варфоломеев С.Д.¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;

³МИРЕА — Российский технологический университет;

khodonov@gmail.com

Ретиналь-содержащие белки играют ключевую роль в ряде важнейших биологических и физиологических процессов — в зрении и дифференцировке тканей у высших животных и в светозависимом транспорте протонов, ионов хлора или фототаксисе у некоторых видов микроорганизмов.

Цель настоящей работы состояла в разработке и осуществлении на практике комплексного подхода к исследованию структурно-функциональных отношений в микробных родопсинах путем химической модификации функционально значимых элементов структуры молекулы хромофорной группы.

Как было показано ранее нами для образования ковалентной связи между аналогом ретиналя и апобелком - опсином необходимо наличие в молекуле аналога ретиналя фрагмента полиеновой цепи, содержащей от двух до четырех сопряженных кратных связей с терминальной формильной группой, в то время как триметилциклогексеновое кольцо может быть легко заменено на более массивный остаток.

На основе результатов собственных исследований и литературных данных была создана база данных “Properties of artificial bacteriorhodopsin analogs. From 1975 to 2019”, версия 2.0, 2020, суммирующая сведения о способности апобелка (бактериоопсина - ВО) к образованию ковалентных и нековалентных комплексов с различными полиеновыми соединениями и об их фотохимических и функциональных свойствах. Она включает перечисленные ниже структурные, спектральные и фотохимические параметры и другие сведения о продуктах взаимодействия более 440 полиеновых соединений с бактериоопсином (ВО).

Структура всех полиеновых соединений была классифицирована на основании их отличий от природного хромофора (all-E-ретиналя).

Рассмотрены следующие серии модификаций аналогов ретиналя:

A - Природный хромофор - ретиналь и его изомеры

B - Модификация терминальной полярной группы

C - Модификация полиеновой цепи

D - Изменение типа связей и их расположения в полиеновой цепи хромофора

E - Изменение длины полиеновой цепи, расположения связей и типов терминальных групп.

F - Изменение или блокировка конфигурации связи. Неизомеризуемые аналоги хромофора

G - Изменение триметилциклогексенового кольца. Модификации кольца

H - Изменение триметилциклогексенового кольца. Замена кольца на ароматические или гетероциклические фрагменты

I - Изменение триметилциклогексенового кольца. Ациклические аналоги

J - Разные смешанные модификации

K - Меченные производные ретиналя (радиоактивные, фотоаффинные, флуоресцентные, аналоги с «тяжелыми» атомами, парамагнитные (SL), ионофорные и фотохромные зонды)

Основными дескрипторами являлись: структура конкретного тестируемого изомера полиенового соединения; λ_{max} исходного соединения; моделей (оснований Шиффа с н-бутиламином в метаноле, в непротонированной и протонированных формах); нековалентного комплекса с бактериоопсином; пигмента в водном буфере (адаптированного к свету и темноте (LA и DA-формы); наличие и тип фотоцикла, его основные интермедиаты; эффективность протонного транспорта; изомерный состав хромофора (соотношение all-E- и 13Z-изомеров); “опсиновый” сдвиг; устойчивость продуктов взаимодействия к гидроксилламину и all-E-ретиналю и прочие дополнительные данные.

Сравнительный анализ нашей базы данных, показал, что, диверсифицируя природу хромофора, можно напрямую изменять λ_{max} в спектрах аналогов бактериородопсина в довольно широком интервале (от 412 до 830 нм), хотя далеко не все эти новые пигменты способны к циклическим фотохимическим реакциям.

Работа была частично поддержана РФФИ (проект № 20-03-00139а).

1. Khodonov A.A., Belikov N.E., Demina O.V. Properties of artificial bacteriorhodopsin analogs. From 1975 to 2019. Editors: Chupin V.V., Varfolomeev S.D. Version 2, 2020. IBCP/MIPT, Moscow, Russia 186 pp. http://biochemphysics.ru/assets/upload/documents/docs/BRDT_v2.pdf

Обобщённый метод определения оптической спектральной плотности пигментных молекул; моделирование поглощения каротиноидов и порфириновых красителей

Курков В.А.^{1,2*}, Чесалин Д.Д.¹, Разживин А.П.³, Пищальников Р.Ю.¹

¹*Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук;*

²*Московский физико-технический институт;*

³*НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ;*

v.k27@yandex.ru

Использование полуклассических квантовых теорий взаимодействия электромагнитного излучения с веществом для моделирования оптических свойств фотосинтетических мономерных пигментов показало [1,2], что использование оптимизационных алгоритмов позволяет не только рассчитать с высокой степенью точности профиль линии поглощения электронного перехода молекулы, но и оценить степень статистической значимости найденных параметров исследуемой системы. Учитывая результаты предыдущих исследований, мы предложили способ анализа электрон-фононных взаимодействий для любых органических молекул в растворителе, поглощающих в видимом диапазоне. Ключевым объектом вычислений является понятие обобщённой спектральной плотности – характеристической функции электронного перехода молекулы, с помощью которой рассчитываются корреляционные функции дипольного момента электронного перехода. В наших предыдущих работах для подгонки экспериментальных данных мы использовали в качестве свободных параметров только Хуан-Рис факторы – эффективные параметры электрон-фононного взаимодействия, в то время как значения частот вибронных мод брались из экспериментов комбинационного рассеяния. Новый метод способен вычислять спектры поглощения и одновременно оценивать параметры спектральной плотности исключительно по форме спектра электронного перехода. Более того, применение эволюционного алгоритма оптимизации позволяет оценить статистическую значимость найденных параметров квантовой модели. Таким образом, данный метод является эффективным инструментом для моделирования оптических свойств органических молекул и позволяет создавать квантовые модели мономерных пигментов и использовать полученные данные для расчёта систем взаимодействующих молекул и кристаллов. В данной работе представлены результаты обработки спектров поглощения каротиноидов, порфириновых красителей и анализ полученных данных.

Исследование выполнено за счёт гранта РФФИ № 22-21-00905, <https://rscf.ru/project/22-21-00905/>

[1]. Pishchalnikov, R.Y.; Yaroshevich, I.A.; Zlenko, D.V.; Tsoraev, G.V.; Osipov, E.M.; Lazarenko, V.A.; Parshina, E.Y.; Chesalin, D.D.; Sluchanko, N.N.; Maksimov, E.G. The role of the local environment on the structural heterogeneity of carotenoid β -ionone rings. *Photosynthesis Research* 2022, doi:10.1007/s1120-022-00955-2.

[2]. Chesalin, D.D.; Kulikov, E.A.; Yaroshevich, I.A.; Maksimov, E.G.; Selishcheva, A.A.; Pishchalnikov, R.Y. Differential evolution reveals the effect of polar and nonpolar solvents on carotenoids: A case study of astaxanthin optical response modeling. *Swarm Evol. Comput.* 2022, 75, 101210, doi:10.1016/j.swevo.2022.101210.

Обратимость окислительно-восстановительных реакций оммохромов сложного глаза насекомых

Яковлева М.А.^{1*}, Донцов А.Е.¹, Айбуш А.В.², Гулин А.А.², Губина М.В.², Васин А.А.², Надточено В.А.², Островский М.А.^{1,3}

¹ФГБУН Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН;

²ФГБУН ФИЦ ХФ имени Н.Н. Семенова РАН;

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
lina.invers@gmail.com

Оммохромы относятся к большому классу веществ, встречающихся в различных тканях беспозвоночных животных, главным образом у членистоногих. Они выполняют функцию экранирования избыточного света, антиоксидантной защиты и окраски тела [1]. Изменение окраски оммохромов обычно связано с окислительно-восстановительными переходами в молекуле пигмента. Под действием окислителей и восстановителей оммохромы могут переходить из восстановленной в окисленную форму и обратно, что было зафиксировано по обратимым изменениям в положении их максимума абсорбции [2]. В этом случае при окислении оммохромов их максимум поглощения смещается в более коротковолновую область, а при восстановлении возвращается в исходное положение [3].

Окислительно-восстановительный статус оммохромов имеет большое значение в жизнедеятельности членистоногих. Так например, в период полового созревания у некоторых видов стрекоз окраска тела меняется с желтой на красную, что связано с появлением большего количества восстановленных оммохромов. Кроме того, известно, что антиоксидантной и антигликирующей активностями оммохромы обладают только в восстановленном состоянии [1]. Поэтому способность оммохромов к обратимому окислению-восстановлению имеет важное биологическое значение.

Целью данной работы было исследование физико-химических свойств окисленной и восстановленной форм оммохромов сложного глаза насекомых методами ИК-Фурье спектроскопии, КАРС спектроскопии, флуоресцентной спектроскопии и ВЭЖХ-анализа. Впервые показаны обратимые изменения флуоресцентных характеристик оммохромов насекомых при окислительно-восстановительных реакциях. Продемонстрировано обратимое изменение состава оммохромов в реакциях окисления-восстановления. Методом ВЭЖХ-анализа образцов из глаза мухи «черная львинка» показана возможность практически полного восстановления окисленных форм пигмента. Результаты данной работы важны как для общего развития знаний об физико-химических свойствах оммохромов, так и для понимания функционального значения этих соединений в тканях насекомых.

Измерения в рамках ИК-Фурье и КАРС спектроскопии выполнены ЦКП/УНУ ФИЦ ХФ РАН (рег. номера № 1440743 и № 506694 в базе ЦКП РФ).

Список литературы.

1. AE Dontsov, MA Ostrovsky. Ommochromes of the Compound Eye of Arthropods from the Insects and Crustaceans Classes: Physicochemical Properties and Antioxidant Activity. In: "Arthropods-New Advances and Perspectives" (Ed V.D.C. Shields), 2022, IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.107058

2. F. Figon, J.Casas, Ommochromes in invertebrates: Biochemistry and cell biology, Biol. Rev. Camb. Philos. Soc., 2019, V. 94, P. 156–183.

3. R. Futahashi, R. Kurita, H. Mano, T. Fukatsu. Redox alters yellow dragonflies into red. PNAS, 2012, v. 109 (31). P. 12626–12631. doi/10.1073/pnas.1207114109

Особенности строения, функционирования и оптические свойства фотосинтетических реакционных центров

Пищальников Р.Ю.^{1*}

¹ИОФ РАН;

rpishchal@kapella.gpi.ru

Среди большого разнообразия фотосинтетических пигмент-белковых комплексов, реакционные центры представляют наибольший интерес для теоретического исследования, поскольку как для окисленных, так и для аноксигенных фотосинтезирующих организмов, обладают схожим пространственным расположением пигментных молекул. Главная особенность любого реакционного центра - наличие двух ветвей пигментных молекул, состоящих из хлорофиллов, феофитинов (бактериохлорофиллов и бактериофеофитинов),

каротиноидов, а также хинонов. Существует два типа реакционных центров, классифицируемых по типу терминального акцептора электронов. К первому типу относятся реакционные центры, у которых акцепторами электронов являются железосерные кластеры (фотосистема 1, зелёные серобактерии, гелиобактерии); у реакционных центров второго типа (хлорофлексии, пурпурные бактерии, фотосистема 2) роль акцепторов выполняют хиноны. Теоретическое моделирование результатов различных методов спектроскопических измерений позволяет проанализировать наблюдаемые оптические свойства реакционных центров и описать механизм эффективного преобразования солнечной энергии в электронные возбуждённые состояния и состояния с разделёнными зарядами. Более того, использование рентгеноструктурных данных пигмент-белковых комплексов, а также современных вычислительных и оптимизационных методов, делает возможным построение универсальных квантово-механических моделей, необходимых для описания процессов фотосинтеза у разных организмов.

Исследование выполнено за счёт гранта РНФ № 22-21-00905, <https://rscf.ru/project/22-21-00905/>

Оценка связывания цинковых фталоцианинов с наноалмазами для применения в фотодинамической терапии

Гудкова В.Р.^{1*}, Долматов В.Ю.², Максимов Е.Г.¹

¹МГУ имени М. В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики;

²ФГУП СКТБ Технолוג;
gudkova.v.r@gmail.com

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является перспективным методом для лечения онкологических заболеваний[1]. Фотосенсибилизаторы (ФС) первого поколения характеризуются интенсивной полосой поглощения в области 400 нм (полоса Core). К их недостаткам относится невысокий выход активных форм кислорода (АФК) и низкая поглощательная способность в области 650-850 нм. ФС второго поколения значительно лучше поглощают свет в диапазоне 600-700 нм (Q-полоса поглощения), что обеспечивает большую эффективность ФДТ не только на поверхности, но и в глубине ткани. Тем не менее, такие ФС лишены селективности по отношению к раковым клеткам, а также имеют склонность к взаимодействию с белками крови, что снижает их эффективность. Поэтому сейчас разрабатываются ФС третьего поколения, которые объединяют ФС второго поколения в комплекс с платформой для их доставки. В качестве такой платформы могут выступать углеродные наночастицы. Перспективными наночастицами являются наноалмазы (НА). К их преимуществам относится высокая стабильность, возможность химической модификации поверхности, а также высокое отношение площади поверхности к объёму.

Нами была проведено сравнение эффективности образования комплексов НА различных типов с ФС из линейки цинковых фталоцианинов. Были использованы НА, полученные в ФГУП СКТБ Технолוג (Россия) и имеющие коммерческие наименования ТАН и СТП. Также были охарактеризованы НА, синтезированные из взрывчатого вещества – тетрила, с последующей обработкой на воздухе при температуре 430°C. С помощью FTIR-спектроскопии были показаны различия в химических структурах НА. Была проведена химическая модификация НА ТАН карбоксильными группами, что было подтверждено данными FTIR-спектроскопии и методами динамического светорассеяния. Для оценки эффективности связывания НА с фталоцианинами была проведена процедура титрования различных растворов фталоцианинов суспензией НА с последующей регистрацией положения пика Q-полосы поглощения фталоцианинов. Также был разработан метод оценки константы адсорбции фталоцианина на НА, в основе которого лежит построение изотермы адсорбции.

Согласно полученным результатам, наиболее эффективное образование комплекса НА-фталоцианин идёт между фталоцианинами с холиниловыми заместителями и отрицательно заряженными НА. Фталоцианины с пирамидиновыми заместителями показали более низкую эффективность связывания с НА, что объясняется пространственными факторами. Фталоцианины с карбоксильными заместителями не взаимодействовали ни с положительно, ни с отрицательно заряженными НА.

Проделанная нами работа позволяет оценить перспективность использования различных НА и фталоцианинов для разработки фотосенсибилизаторов третьего поколения.

[1] I. A. N. J. Macdonald и T. J. Dougherty, «Basic principles of photodynamic therapy», сс. 105–129, 2001.

Первичные фотореакции родопсина *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) в зависимости от pH

Смитиенко О.А.^{1*}, Фельдман Т.Б.^{1,2}, Петровская Л.Е.³, Яковлева М.А.¹, Шелаев И.В.⁴, Гостев Ф.Е.⁴, Черепанов Д.А.⁴, Кольчугина И.Б.², Надточенко В.А.^{4,5}, Кирпичников М.П.^{2,3}, Островский М.А.^{1,2}

¹ИБХФ РАН;

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет;

³ИБХ РАН;

⁴ФИЦ ХФ РАН;

⁵МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет;

djolia@gmail.com

Микробный родопсин почвенной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) осуществляет светозависимый активный перенос протонов из клетки во внешнюю среду, тем самым преобразуя энергию света в электрохимический потенциал. В основе работы этого белка, как и других микробных родопсинов и родопсинов животных, лежит фотохимическая реакция изомеризации хромофорной группы ретиналя, протекающая в возбужденном состоянии в фемтосекундном диапазоне времени. Ранее нами было показано, что в пикосекундном диапазоне времени существует дополнительный нереакционный путь распада возбужденного состояния, который влияет на общий квантовый выход реакции [1]. Вероятно, наличие нереакционного пути связано с гетерогенностью начального состояния, которая сильно зависит от pH, что было продемонстрировано для близкородственного ESR протонного насоса протеродопсина (PR) [2], протонного насоса бактериородопсина (BR) [3] и натриевого насоса KR2 [4]. Для проверки этой гипотезы была изучена зависимость скорости и эффективности фотореакции ESR от pH.

Работа проведена методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии при возбуждении ESR импульсами длительностью 25-45 фс и зондировании в диапазоне 400-900 нм. ESR был экспрессирован в *E. coli*, очищен хроматографически и экстрагирован в 0,05-0,1% DDM при pH 5,3, 7,4 и 9,5. Времена наблюдаемых процессов были оценены путем построения модельных экспоненциальных кривых на основе экспериментальных кинетических кривых.

Было показано, что при каждом выбранном значении pH наблюдаются сигналы из возбужденного состояния, которые сменяются сигналами поглощения первых фотопродуктов, содержащих изомеризованный ретиналь, J и K. Продукт J образуется в фемтосекундном диапазоне времени и за несколько пикосекунд переходит в следующий продукт K. Динамика распада возбужденного состояния ESR состоит из двух компонент – быстрой фемтосекундной, характеризующей реакционный путь образования продукта J, и медленной пикосекундной, характеризующей нереакционный путь возвращения части возбужденных молекул в исходное состояние. При увеличении pH от 5,3 до 9,5 единиц наблюдается уменьшение быстрой компоненты от 830 до 490 фс, что свидетельствует об увеличении скорости фотореакции изомеризации хромофорной группы ретиналя. При этом вклад нереакционного возбужденного состояния уменьшается от 40 до 26%, а квантовый выход фотореакции значительно увеличивается, что видно по увеличению интенсивности сигнала фотопродукта K в 2,5 раза.

Полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии pH на скорость и эффективность фотореакции ESR. В работах [2-4] на примере других микробных родопсинов было показано, что гетерогенность начального состояния связана со степенью протонирования противоиона Шиффова основания (ШО) ретиналя, аминокислотного остатка аспартата, взаимодействие с которым в депротонированной форме сильно влияет на систему электронных уровней ретиналя и динамику фотореакции. В случае ESR это D85, который связан с протоном ШО сильной водородной связью через молекулу воды. При pH 9,5 он полностью депротонирован, что приводит к наиболее быстрой и эффективной фотореакции. Таким образом, можно заключить, что первичные реакции ESR имеют много общего с микробными родопсинами, выполняющими функции катионных насосов. Вероятно, эти свойства связаны с адаптацией родопсинов к условиям окружающей среды, pH которой сдвинут преимущественно в щелочную область, как, например, в море (PR, KR2) и соленых озерах (BR).

Список литературы:

1. Smitienko O.A. et al. // J. Phys. Chem. B. 2021. 125. 995–1008.
2. Chang, C.-F. et al. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2019. 21. 25728-25734.
3. Chang, C.-F. et al. // Angew. Chem. Int. Ed. 2022, 61, e202111930.
4. Tahara S. et al. // J. Phys. Chem. B. 2018. 122:18. 4784-4792.

Применение кремниевых наночастиц для нанотермометрии на наномасштабе

Герасимова Е.Н.^{1*}, Тимин А.С.¹, Зюзин М.В.¹

¹Университет ИТМО;

elena.gerasimova@metalab.ifmo.ru

В Российской Федерации по данным Минздрава каждый год диагностируют около 10 000 новых случаев заболевания меланомой. Современные методы терапии этого заболевания основаны либо на хирургическом вмешательстве, либо на использовании химиотерапии. Однако эти методы сопряжены с большим количеством побочных эффектов и часто бывают неэффективны. Альтернативой этим способам лечения может стать фототермическая терапия.[1] Этот метод заключается в накоплении наночастиц в зоне опухоли и последующим воздействием на них лазерным излучением для нагрева. Однако нагрев и чрезмерное изменение температуры сильно влияют на такие клеточные функции как деление клеток, экспрессия генов, активность факторов роста и метаболизм.[2] Таким образом, мониторинг температуры в режиме реального времени в процессе внешнего нагрева необходим не только для прогнозирования поведения клеток, но и для предотвращения возможных побочных эффектов в ходе терапии.[3,4]

Один из методов измерения температуры вне и внутри клеток основан на сдвиге стоксовой компоненты комбинационного рассеяния, например, от кремниевых наночастиц. Они способны преобразовывать лазерное излучение в тепловую энергию.[5,6] Также такие диэлектрические наночастицы обладают оптически индуцированными магнитными и электрическими резонансами Ми типа, что позволяет им не только усиливать сигнал рамановского рассеяния, но и эффективно поглощать свет и стимулировать оптический нагрев. Все вышеописанные достоинства кремниевых наночастиц делают эти носители пригодными для проведения онкотерапии с минимальным количеством побочных эффектов из-за контроля температуры.

Сначала было теоретически рассчитано, что диаметр кремниевых частиц около 180 нм наиболее эффективен для нагрева. Затем были синтезированы подходящие кремниевые частицы методом лазерной абляции под слоем жидкости. В качестве подложки использовалась кремниевая пластина, а процесс абляции происходил в воде. Для фильтрации кремниевых наночастиц по размеру была задействована технология создания градиента плотностей с использованием центрифугирования. Следующим шагом были проверены оптические свойства синтезированных кремниевых наночастиц. Экспериментально измеренные спектры темнопольной микроскопии продемонстрировали такое же положение пиков электрического и магнитного диполей, что и в теоретических расчётах.

Также были проведены эксперименты *in vitro* по оценке выживаемости и захвату кремниевых наночастиц на клеточной линии B16-F10. Оценка выживаемости клеток и токсичности наночастиц была проведена посредством анализа Аламар Блю. В результате эксперимента было показано, что кремниевые наночастицы практически не оказывают токсического эффекта на клетки. Клеточная выживаемость даже при максимальном количестве частиц (500 мкг/мл, 20 мкл) превышала 90%. В свою очередь, для изучения захвата кремниевых наночастиц клетками носители были предварительно помечены красителем Су 5, конъюгированными с бычьим сывороточным альбумином BSA. Мембрана клеток была помечена красителем флуоресцеин. Захват кремниевых наночастиц изучали с помощью метода конфокальной лазерной микроскопии. Было доказано, что кремниевые наночастицы были успешно захвачены клетками.

Нагрев кремниевых наночастиц вне и внутри клеток изучался с помощью комбинационного рассеяния света по спектральному сдвигу стоксовой компоненты. Кремниевые наночастицы были облучены HeNe лазером с длиной волны 632.8 нм. Интенсивность лазерного излучения составляла примерно $10 \approx 2$ мВт/мкм². Сдвиг стоксовой компоненты составлял для измерения вне клеток при максимальной мощности составил 4 см⁻¹, что соответствует нагреву около 120 градусов. Однако при экспериментах внутри клеток сдвиг был менее, около 2 см⁻¹, что соответствует нагреву в 70 градусов. Такого изменения температуры достаточно для терапии, потому что процесс апоптоза происходит примерно при 42 градусах Цельсия.

Также в работе было проверено и биораспределение полученных наночастиц *in vivo*. Частицы были модифицированы красителем Су 5 и введены в опухоль лабораторной мыши. Затем через 1, 3 и 7 дней мыши были выведены из эксперимента. Распределение частиц было изучено как в основных органах, так и в самой опухоли. Эксперименты показали, что частицы были локализованы только в опухоли и не мигрировали в другие органы.

Таким образом, кремниевые наночастицы способны эффективно конвертировать лазерное излучение в тепло. Это дает возможность более локально повышать температуру частиц, не перегревая окружающие клетки и ткани за счет локального измерения температуры. В перспективе планируется провести терапию и измерение температуры в режиме реального времени на живой лабораторной мыши.

1. Peltek O.O. et al. Fluorescence-based thermometry for precise estimation of nanoparticle laser-induced heating in cancerous cells at nanoscale // Nanophotonics. De Gruyter Open Ltd, 2022. Vol. 11, № 18. P. 4323–4335.

2. Gerasimova E.N. et al. Real-Time Temperature Monitoring of Photoinduced Cargo Release inside Living Cells Using Hybrid Capsules Decorated with Gold Nanoparticles and Fluorescent Nanodiamonds // ACS Appl Mater Interfaces. American Chemical Society, 2021. Vol. 13, № 31. P. 36737–36746.
3. Dibaba S.T. et al. NIR Light-Degradable Antimony Nanoparticle-Based Drug-Delivery Nanosystem for Synergistic Chemo–Photothermal Therapy in Vitro // ACS Appl Mater Interfaces. American Chemical Society, 2019. Vol. 11, № 51. P. 48290–48299.
4. Quintanilla M. et al. Thermal monitoring during photothermia: Hybrid probes for simultaneous plasmonic heating and near-infrared optical nanothermometry // Theranostics. Ivyspring International Publisher, 2019. Vol. 9, № 24. P. 7298–7312.
5. Zograf G.P. et al. All-Optical Nanoscale Heating and Thermometry with Resonant Dielectric Nanoparticles for Controllable Drug Release in Living Cells // Laser Photon Rev. Wiley-VCH Verlag, 2020. Vol. 14, № 3. P. 1900082.
6. Zograf G.P. et al. Resonant Nonplasmonic Nanoparticles for Efficient Temperature-Feedback Optical Heating // Nano Lett. American Chemical Society, 2017. Vol. 17, № 5. P. 2945–2952.

Разрушение метафазной пластинки в ооцитах мыши при помощи фемтосекундного лазерного излучения ближнего ИК диапазона

Осыченко А.А.^{1*}, Залесский А.Д.¹, Точило У.А.¹, Мартиросян Д.Ю.¹, Надточенко В.А.¹

¹ФИЦ ХФ РАН;

alina.chemphys@gmail.com

Коллективом авторов разработана оригинальная методика разрушения генетического материала (энуклеация) в ооцитах при помощи остросфокусированного фемтосекундного лазерного излучения с длиной волны 795 нм. Энуклеация ооцитов обычно осуществляется при помощи микроманипулятора и подразумевает прокалывание ооцита и высасывание части цитоплазмы, содержащей метафазную пластинку. Так получают энуклеированные ооциты (реципиентный цитопласт), который необходим для решения задачи клонирования животных и метода цитоплазматической замены у человека. Удаление из ооцита небольшого объема цитоплазмы, содержащей метафазную пластинку, может существенно повлиять на дальнейшее развитие, так как именно в этой области содержатся репрограммирующие факторы, такие как MPF, ORF1 и soronin. Преимущество лазера перед традиционным методом энуклеации – в возможности локализовать воздействие строго в области метафазной пластинки и избежать потери репрограммирующих факторов.

Ранее мы показали, что энуклеацию ооцитов мыши при помощи фемтосекундного лазерного излучения можно совершать с высокой точностью и малой инвазивностью (Osychenko A.A. et.al, Biomedical Optics Express, 2022). Для дальнейшего развития методики фемтосекундной лазерной энуклеации мы испытали различные параметры лазерного воздействия для определения диапазона неинвазивного воздействия на ооциты, а так же исследовали цитотоксический эффект фемтосекундного лазерного излучения.

Исследован диапазон параметров фемтосекундного лазерного излучения для осуществления локальной деструкции генетического материала ооцита мыши. Работа выполнена в режиме частоты повторения фемтосекундных импульсов 80 МГц, 1 кГц, 10 кГц и 100 кГц. Исследована эффективность проведения процедуры энуклеации ооцита мыши в зависимости от длины волны фемтосекундного лазерного излучения, энергии импульса, длительности цуга импульсов. Обнаружены ограничения диапазона параметров по энергии импульса и по длительности цугов, обусловленные скоростью проведения процедуры и частотой образования нежелательных паро-газовых пузырей.

Исследовано цитотоксическое действие процедуры фемтосекундной лазерной энуклеации методами флуоресцентной микроскопии. Было измерено время жизни флуоресценции NADH методом FLIM (Fluorescence-lifetime imaging microscopy) в ооцитах, облученных и не облученных (контрольных) фемтосекундным лазерным излучением. Полученные измерения указывает на приблизительно равный вклад в метаболизм ооцитов связанной и не связанной формы NADH, это соотношение не зависит от наличия или отсутствия облучения лазером, а так же не меняется существенно при наличии/отсутствии партеногенетической активации.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-75-10155. Работа выполнена на ЦКП № 506694 ФИЦ ХФ РАН и УНУ № 1440743.

Регуляция синуклеинами и синглетным кислородом выработки инсулина у мышей

Жарких Е.В.^{1*}, Локтионова Ю.И.¹, Дрёмин В.В.¹, Чапров К.Д.², Дунаев А.В.¹, Нинкина Н.Н.²,
Абрамов А.Ю.^{1,3}

¹ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», Орёл, Россия;

²Институт физиологически активных веществ ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Россия;

³Department of Clinical and Movement Neurosciences, UCL Queen Square Institute of Neurology, London, UK;

ev.zharkikh@gmail.com

Сахарный диабет является хроническим заболеванием, которое характеризуется повышенным содержанием глюкозы в крови. Состояние гипергликемии возникает в результате действия двух основных факторов: недостаточной выработки инсулина поджелудочной железой и снижения чувствительности клеток к нему. Для диабета характерно возникновение осложнений, затрагивающих все системы организма.

Ранее было продемонстрировано, что существует тесная связь между метаболизмом глюкозы, митохондриальной функцией и секрецией инсулина. Было показано, что потеря функции PINK1 (основная причина раннего начала аутосомно-рецессивной болезни Паркинсона (БП) – распространенного прогрессирующего нейродегенеративного заболевания), по-видимому, нарушает чувствительность к глюкозе, что приводит к усиленному высвобождению инсулина. На основе этих данных был сделан вывод о связи БП с сахарным диабетом 2 типа. В патофизиологии обоих заболеваний существуют общие механизмы, включающие митохондриальную дисфункцию, окислительный стресс, гипергликемию и воспаление. Гистопатологической характеристикой БП является формирование нейротоксических агрегатов нейрональных белков синуклеинов, вызванное различными факторами, включая мутации в генах синуклеинов. В физиологических условиях мономерный α -синуклеин продемонстрировал способность повышать эффективность АТФ-синтазы.

В связи с этим, целью данной работы явилось изучить регуляцию выработки инсулина синуклеинами. Дополнительно была поставлена задача оценить возможное влияние облучения светом с длиной волны 1267 нм, приводящего к выработке синглетного кислорода, на продукцию инсулина в организме животного.

Для измерения применяли иммуноферментный анализ с использованием фосфо-специфических антител против рецепторов инсулина (Rat/Mouse Insulin ELISA, Merck KGaA, Германия). Для исследований применялась плазма крови. Плазму получали, забирая у мышей 200 мкл цельной крови, которой позволяли свернуться при комнатной температуре в течение 30 мин и впоследствии центрифугировали при температуре 4 °С. В качестве положительного контроля использовали пробы мышинного инсулина в концентрациях 0,2, 0,5, 1, 2, 5 и 10 нг/мл. В исследовании использовались трансгенные мыши, нокаутные по генам SNCA, SNCB, SNCG и с тройным нокаутом генов альфа-, бета- и гамма-синуклеина, для контроля использовались мыши дикого типа.

Для оценки влияния низкоинтенсивного инфракрасного облучения с длиной волны 1267 нм на продукцию инсулина две мыши дикого типа были подвержены облучению. Излучение доставлялось по оптическому волокну специально сконструированного устройства, которое фиксировалось на проксимальной части середины хвоста животного для облучения хвостовой вены. Доза облучения составила 50 Дж/см² для одного животного и 100 Дж/см² для второго. Спустя 5 мин после осуществления облучения у животных отбирали по 200 мкл цельной крови для дальнейшего проведения иммуноферментного анализа.

Результаты работы показали, что в крови мышей дикого типа содержалось $2,7 \pm 0,2$ нг/мл инсулина. Практически таким же значением ($2,8 \pm 0,3$ нг/мл) обладали мыши с двойным нокаутом генов альфа- и гамма-синуклеина. Наименьшие уровни инсулина отмечены у мышей с нокаутом генов бета- ($0,2 \pm 0,1$ нг/мл) и гамма-синуклеина ($0,6 \pm 0,1$ нг/мл), а также у мышей с тройным нокаутом генов альфа-, бета- и гамма-синуклеина ($0,3 \pm 0,0$ нг/мл). Облучение крови животных лазером 1267 нм приводило к увеличению концентрации инсулина в крови, причем это увеличение, по всей видимости, имело дозозависимый эффект. При облучении светом с дозой 50 Дж/см² концентрация инсулина в крови составила $0,6 \pm 0,1$ нг/мл, при 100 Дж/см² – $1,9 \pm 0,2$ нг/мл.

Таким образом, в настоящей работе было показано, что нокаут генов, кодирующих белки синуклеинов, ассоциирован со снижением выработки инсулина с наиболее заметными проявлениями при нокауте генов бета- и гамма-синуклеина, а также при тройном нокауте. Неинвазивная оптическая генерация синглетного кислорода в организме животного приводит к дозозависимому повышению концентрации инсулина в крови.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2022-1095 (изучение связи нокаута генов с выработкой инсулина), а также гранта Российского Научного Фонда №22-75-10088 (исследования с лазером 1267 нм).

Регуляция фотосистемы 2 при выделении водорода микроводорослями

Цыганков А.А.^{1*}, Гречаник В.И.¹

¹*ИФПБ РАН, обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН;
ttt-00@mail.ru*

Отдельные группы микроводорослей способны после периода анаэробной адаптации к светозависимому выделению водорода. Однако процесс ингибируется кислородом и поэтому краткосрочен. После освещения накапливающийся кислород инактивирует гидрогеназу, и выделение водорода прекращается. Разработан подход продления выделения водорода. Для этого культуры помещают в условия недостатка серы, азота, фосфора или углерода. Через некоторое время адаптации культур к недостатку элемента питания приводит к понижению активности фотосистемы 2, скорость дыхания становится выше скорости фотосинтеза, и культуры переходят в анаэробные условия, в которых и синтезируется гидрогеназа. После ее синтеза начинается выделение водорода, которое длится несколько дней. В литературе имеются сообщения, что в снижении активности фотосистемы 2 могут участвовать несколько регуляторных механизмов: накопление Qb невосстанавливающих центров, перевосстановление пула пластохинонов, накопление закрытых реакционных центров, появление стабильно восстановленной формы QA, state transitions, ксантофиловый цикл, деградация D1 белка, фотоингибирование (окислительный стресс), накопление аскорбата с последующим использованием аскорбата в качестве донора электронов вместо воды. При этом разные авторы указывают один-два механизма ингибирования фотосистемы 2. Удивительно, что практически все работы сделаны на зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, помещенную в условия серного голодания. Согласно нашим исследованиям, указанные механизмы не работают одновременно, а реализация конкретного механизма ингибирования фотосистемы 2 определяется не недостатком элемента питания, а другими факторами внешней среды, прежде всего светом. В работе показано, что в зависимости от интенсивности света фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii* при недостатке элементов питания могут реализовывать различные механизмы ингибирования активности фотосистемы 2.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-14-00255.

Роль оптогенетики в регуляции нейрон-глиальных взаимодействий в гиппокампе и в восстановлении когнитивных функций у мышей с моделью болезни Альцгеймера

Герасимов Е.И.¹, Ерофеев А.И.¹, Большакова А.В.¹, Безпрозванный И.Б.^{1,2}, Власова О.Л.^{1*}

¹*Лаборатория молекулярной нейродегенерации Санкт-Петербургского Политехнического университета Петра Великого, Россия;*

²*Отделение физиологии юго-западного медицинского центра Техасского университета, Даллас, США;
olvlasova@yandex.ru*

На сегодняшний день болезнь Альцгеймера (БА) – одно из самых распространенных и неизлечимых нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), которое затрагивает процессы формирования памяти, ее последующего хранения и приводит к прогрессирующему снижению когнитивных способностей. Существуют различные гипотезы этиологии и патогенеза, а, также, различные подходы к лечению данного заболевания. В данной работе мы использовали преимущества оптогенетики для специфической активации астроцитов в срезах гиппокампа с целью изучения её влияния на синаптическую функцию и когнитивные способности на *in vivo* уровне, поскольку известно, что именно астроциты играют важную роль в поддержании и регуляции работы нейронных сетей головного мозга.

Путем высвобождения специфических глутрансмиттеров астроциты воздействуют на рецепторы нейронов, модулируя нейрональную возбудимость, синаптическую передачу и пластичность. Астроциты отвечают на внешний стимул внутриклеточными волнами кальция [Ca²⁺]. В ходе распространения этой волны происходит выброс серина, цитокинов и лактата, которые в дальнейшем модулируют активность нейронов. Способность астроцитов высвобождать глутамат позволяет регулировать функцию NMDA-рецепторов, тем самым регулируя возбуждение в нейронной сети. Астроциты тесно связаны с патогенезом и патологическими процессами НДЗ, поэтому возможность управлять их активностью становится актуальной и необходимой задачей терапии [1]. Результаты. Проведенные исследования показали рост активности пирамидальных нейронов гиппокампа в ответ на оптическую стимуляцию астроглиальных клеток, трансдуцированных вирусом AAV5_GfaABC1D_opto-a1AR-EYFP (кодирует Gq-связанный метаболитный рецептор). Было зарегистрировано увеличение ответных полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (пВПСП) в области гиппокампа после световой активации астроцитов, экспрессирующих Opto-a1AR [2]. Наблюдалась, также, значительная

активация «немедленной-ранней» экспрессии генов в срезах гиппокампа [3]. Были получены предварительные результаты по восстановлению когнитивных способностей у мышей с моделью болезни Альцгеймера после оптогенетической активации метаболитного рецептора *in vivo*. Заключение. В работе продемонстрирована положительная реакция нейронов гиппокампа на световую активацию астроглиальных клеток *ex vivo* и *in vivo* с помощью метаболитного конструктора.

Работа была поддержана грантом Российского научного фонда 20-65-46004 (ОЛВ).

1. Optogenetic and chemogenetic modulation of astroglial secretory phenotype. / A.B. Salmina [et al.] // *Reviews in the neurosciences*. – 2021.

2. Optogenetic Activation of Astrocytes-Effects on Neuronal Network Function. / E. Gerasimov [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 17.

3. Bidirectional regulation by “star forces”: Ionotropic astrocyte’s optical stimulation suppresses synaptic plasticity, metabotropic one strikes back. / A. Maltsev [et al.] // *Hippocampus*. – 2022. – № November 2022. – P. 18-36.

Сравнение методов РАМ-флуориметрии и гиперспектрального имиджинга в досимптомной детекции вирусной инфекции в растениях *Nicotiana benthamiana*

Гришина А.И.^{1*}, Жаворонкова А.С.¹, Гринберг М.А.¹, Хлопков А.Д.¹, Агеева М.Н.¹, Брилкина А.А.¹,
Воденеев В.А.¹

¹ННГУ;

79159532707@yandex.ru

Фитопатогены являются одной из существенных причин потерь урожая. Несмотря на то, что в настоящее время в сельском хозяйстве используют в основном сорта растений, обладающие достаточно высокой устойчивостью к заражению различными патогенами и их негативному воздействию, ежегодно во всем мире наблюдается снижение урожайности сельскохозяйственных культур на 10–20% из-за болезней растений, что представляет серьезную угрозу глобальной продовольственной безопасности. Используя сразу несколько методов визуализации параллельно, можно обнаружить очаги заражения при отсутствии видимых симптомов и принять своевременные меры борьбы с патогенами.

Целью данной работы является сравнение методов РАМ-флуориметрии и гиперспектрального имиджинга в ранней детекции вирусных инфекций в растениях.

Исследования проводились на четырёхнедельных растениях *Nicotiana benthamiana*, в которых наблюдали распространение вируса PVX, имеющего сшитый с белком оболочки флуоресцентный белок GFP. Инфицирование растений проводили с помощью агробактериальной инфильтрации четвертого настоящего листа. В качестве методов обнаружения инфекции применяли РАМ-флуориметрию, гиперспектральный имиджинг и RGB-фотографии. Замеры производили каждый день в одно и то же время в течение 10 дней с помощью IMAGING-PAM M-Series MINI и гиперспектрального датчика Specim IQ.

В неинкубированном (10 листе) листе табака регистрировали вызванные инфицированием изменения параметров флуоресценции хлорофилла (квантовый выход фотосистемы II (YII) и нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ)), а также спектры отражения в здоровых и инфицированных частях листа. После 12-ти минутной адаптации растений в темноте в зараженной области неинкубированного листа наблюдалось небольшое отличие стационарных значений YII и NPQ по сравнению с таковыми в здоровой области того же листа. В отличие от стационарных показателей, динамика YII и NPQ, обусловленная включением актиничного света в здоровых и зараженных участках листа, существенно различалась, начиная со вторых суток после проникновения вируса в неинкубированный лист. Также имеет место различие спектров отражения здоровых и инфицированных растений.

Полученные результаты позволяют предположить подход для уверенного раннего детектирования вирусной инфекции в листьях табака. В частности, четкое разграничение на здоровые и зараженные участки на основе показателя YII в диапазоне 40–60 с после включения актиничного света и в диапазоне 20–40 с на основе NPQ.

Анализ спектров отражения показал, что имеются различия между зараженной и здоровой областью листьев. Различия обнаружены в нескольких участках спектра. Представляется оптимальным использование нормализованного отражательного индекса, чтобы избежать различий в абсолютной величине интенсивности сигнала. Сопоставление методов выявило, что РАМ является более чувствительным методом и с его помощью обнаружить вирусную инфекцию можно уже на 1-2 день после прихода вируса в лист.

Работа выполнена в ходе выполнения проекта НЦМУ «Центр фотоники» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, договор № 075-15-2020-927.

Сравнительное исследование влияния железа и палладия на фотобиологические свойства циано(арил)порфиразинов, содержащих эти металлы в качестве центральных катионов

Шестакова Л.Н.^{1,2*}, Белотелов А.О.¹, Любова Т.С.², Клапшина Л.Г.², Лермонтова С.А.²,
Балалаева И.В.¹, Шилягина Н.Ю.¹

¹Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского;

²Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева;

lshn1998@yandex.ru

Поиск «идеального» фотосенсибилизатора (ФС) является ключевым звеном в развитии фотодинамической терапии (ФДТ). Одним из подходов к разработке «идеального» ФС является модификация химической структуры ФС, использующихся в клинической практике или известных в доклиническом применении. Модификации подвергается как сам макрогетероцикл, например, за счет включения катиона металла, так и его периферийное обрамление. Показано, что присутствие и природа центрального атома оказывает значительное влияние на фотохимические, фотофизические и фотобиологические свойства ФС. Кроме того, ряд исследований сообщает об усилении противоопухолевого эффекта за счёт реакций Фентона при наличии в составе ФС катиона железа.

В качестве потенциальных ФС нами были синтезированы тетра(арил)тетра(циано)порфиразины в виде свободных оснований и металлокомплексов, содержащих атомы железа или палладия в центре макроцикла, с тиофеновыми, бензотиофеновыми и нафтильными группами в периферийном окружении макроцикла. Для оценки вклада реакций Фентона мы использовали для сравнения металлокомплекс с благородным металлом, не катализирующим реакций фентоновского типа, и комплекс железа.

Нами было показано, что для исследуемых свободных оснований и их металлокомплексов характерно наличие пиков поглощения и флуоресценции в красной и дальне-красной области спектра. Мы подтвердили принадлежность исследуемых металлокомплексов к классу флуоресцентных молекулярных роторов, зарегистрировав выраженную зависимость квантового выхода флуоресценции от вязкости окружающей среды. Показано, что добавление катиона металла в макроцикл приводит к изменению фотофизических свойств тетра(арил)тетра(циано)порфиразинов. Так, для комплексов железа мы отметили более высокую вязкостную чувствительность и повышение фотостабильности по сравнению со свободным основанием.

Мы показали интенсивное накопление свободных оснований и комплексов железа и палладия клетками эпидермоидной карциномы человека A431. Нами было показано увеличение фотодинамических индексов, отражающих во сколько раз ФС токсичнее на свету по сравнению с темновыми условиями, для комплексов железа и палладия по сравнению со свободными основаниями. Это может указывать на потенциальное уменьшение побочных эффектов в отношении здоровых органов и тканей. Важно заметить, что фотодинамический индекс для комплексов, содержащих железо, оказался выше, чем для комплекса с палладием. Мы так же зарегистрировали повышение уровня продукции синглетного кислорода для соединений, содержащих катион железа, по сравнению со свободными основаниями. Мы продемонстрировали увеличение времени жизни возбуждённого состояния порфиразиновых металлокомплексов, локализованных в цитоплазме клеток A431, после фотодинамического воздействия. Мы предполагаем, что это может свидетельствовать о фотоиндуцированном локальном увеличении внутриклеточной вязкости.

В целом, полученные результаты демонстрируют, что присутствие катиона железа и палладия оказывает значительное влияние на фотофизические и фотобиологические свойства циано(арил)порфиразинов. Исследуемые соединения в виде свободных оснований и металлокомплексов могут быть рассмотрены в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов и высокочувствительных флуоресцентных сенсоров вязкости в клетке, в том числе при проведении фотодинамической терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-23-00515).

Тетра(арил)тетрацианопорфиразиновые свободные основания и их металлокомплексы для решения задач фотодинамической терапии злокачественных новообразований

Шилягина Н.Ю.^{1*}, Шестакова Л.Н.¹, Пескова Н.Н.¹, Плеханов В.И.², Лермонтова С.А.³, Клапшина Л.Г.³, Балалаева И.В.¹

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

²Институт прикладной физики Российской академии наук;

³Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева Российской академии наук;
nat-lekanova@yandex.ru

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – интенсивно развивающееся направление в лечении онкологических заболеваний, в основе которого лежит использование фотоактивного соединения, так называемого фотосенсибилизатора (ФС), способного при локальном воздействии света видимого или ближнего инфракрасного диапазона вступать в фотохимические реакции с образованием активных форм кислорода (АФК), индуцирующих развитие локального окислительного стресса, который, в конечном итоге, приводит к гибели облученных клеток.

Несмотря на высокую эффективность, избирательность и хорошую переносимость ФДТ задача создания «идеального» ФС остается нерешенной, именно поэтому поиск новых препаратов является ключевым звеном на пути совершенствования этой технологии. Помимо необходимости поиска «идеального» ФС, метод ФДТ ограничен отсутствием возможности адекватной и своевременной корректировки световой дозы, подводимой к опухоли, в зависимости от ответа облучаемой ткани. Вышеперечисленные сложности во многом препятствуют внедрению персонализированного подхода в данный вид терапии и развитию ФДТ в целом.

С целью развития персонализированного подхода в ФДТ нами была синтезирована и исследована серия тетра(арил)тетрацианопорфиразиновых макрогетероциклов в виде свободных оснований и металлокомплексов, обладающих уникальными фотофизическими свойствами. На сегодняшний момент получено и исследовано более тридцати соединений с различными боковыми заместителями в периферийном окружении макроцикла, в том числе соединения с включением в центр макроцикла таких металлов как иттербий, железо, медь, палладий, кобальт и другие. Преимуществом арилцианопорфиразинов, по сравнению со многими клинически одобренными ФС, является простота и мягкость условий их синтеза, а также высокий выход целевых продуктов. Наиболее интересной особенностью исследуемых соединений является обнаруженное нами сочетание свойств фотосенсибилизатора и молекулярного ротора. Молекулярные роторы – это соединения, демонстрирующие сильную зависимость фотофизических параметров, таких как квантовый выход и время жизни флуоресценции, от вязкости среды. Такая зависимость позволяет использовать порфиразины в качестве сенсоров изменения локального микроокружения и, в частности, микровязкости. В экспериментах на клеточных культурах нами было показано, что порфиразины эффективно накапливаются опухолевыми клетками, локализуясь преимущественно в мембранных органеллах клетки. Показано, что порфиразины способны вызывать фотоиндуцируемую генерацию АФК в клетке, приводящую к запуску клеточной гибели. Нами впервые показана принципиальная возможность использования порфиразинов в качестве зондов внутриклеточной вязкости, в том числе при проведении ФДТ. Более того, показано наличие выраженной дозовой зависимости ответа на фотодинамическое воздействие, а именно, увеличения времени жизни порфиразинов, обусловленное, по всей видимости, ростом микровязкости в клетке после проведения терапии. Установленная закономерность указывает на принципиальную возможность использования фотофизических параметров порфиразинов для дозиметрии при проведении ФДТ.

С целью увеличения избирательности накопления порфиразинов в опухоли нами были разработаны и охарактеризованы системы доставки на основе биосовместимых наноматериалов, таких как липосомы, полимерные щетки и субмикронные частицы карбоната кальция в полиморфной модификации ватерит. На примере частиц ватерита нами продемонстрирована возможность оценки процессов высвобождения порфиразинов из транспортного носителя в живой ткани в режиме реального времени. В эксперименте на животных-опухоленосителях нами показано быстрое (в течение нескольких часов) и высокоселективное накопление в опухоли порфиразинов при введении в составе наноразмерных носителей. Установлено, что порфиразины накапливаются и локализуются в цитоплазме опухолевых клеток, а не в межклеточном пространстве или сосудах, питающих опухоль. Доказана способность порфиразинов вызывать биологически значимое торможение опухолевого роста и полную элиминацию опухолей в семидесяти процентах случаев. Более того, было показано, что некоторые соединения из группы порфиразинов способны вызывать иммуногенную клеточную смерть.

Впервые с помощью метода флуоресцентного имиджинга с функцией временного разрешения нами показана возможность прижизненного контроля изменения вязкостных свойств опухолевой ткани в ходе проведения фотодинамической терапии с порфиразаинами. Предложенный подход в дальнейшем позволит обеспечить повышение эффективности фотодинамической терапии за счет объективного оптического

мониторинга проводимого лечения, а именно подбора индивидуальных доз светового воздействия на основании изменения времени жизни флуоресценции в опухолевой ткани после облучения.

Таким образом, мы предполагаем, что тетра(арил)тетрацианопорфирины обладают большим потенциалом как препараты для фотодинамической терапии онкологических заболеваний и могут способствовать внедрению персонализированного подхода в данный вид терапии и развитию ФДТ в целом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-23-00515) и государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № FSWR-2023-0032.

УФ-индуцированные структурные модификации сывороточного альбумина и рибонуклеазы А

Башарина О.В.^{1*}, Секретарева У.С.¹, Артюхов В.Г.¹

¹Воронежский государственный университет;

bov-bio@yandex.ru

Изучение спектров поглощения биомолекул остается одним из наиболее эффективных и доступных методов при анализе структурных свойств биомолекул. Спектральные свойства белковых макромолекул исследуются в основном в области поглощения боковых групп ароматических аминокислот в диапазоне длин волн 240 - 320 нм. Часто детектируемые изменения связываются с разворачиванием/сворачиванием белковой глобулы, сопровождающимся экспонированием/экранированием ее хромофорных групп относительно поверхности белковой макромолекулы.

Объекты исследования – растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА) и бычьей панкреатической РНКазы А в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л в 0.1 моль/л Na-фосфатном буфере (pH 7.4).

Растворы БСА и РНКазы облучали УФ-светом с помощью облучателя Bio-Link-BLX (Vilber Lourmat, Франция) в узких диапазонах длин волн: с $\lambda_{\max}$ 254 нм. Интенсивность облучения 1 лампы из 6 - 0,3 Дж/(см²•мин). Регистрировали спектры поглощения растворов сывороточного альбумина на спектрофотометре UV-2401 PC («Shimadzu», Япония) в диапазоне длин волн от 240 до 400 нм, спектральная ширина щели 0.5 нм, шаг сканирования 0.5 нм, скорость сканирования соответствовала режиму Slow. Измерения были проведены в стандартной кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм. Увеличение разрешения в спектрах поглощения образцов осуществлялось путем вычисления второй производной.

Сложная полоса поглощения исследуемых белков в области 250-300 нм обусловлена светопоглощением фенилаланина (коротковолновое плечо полосы поглощения), триптофана и тирозина. Из анализа производной спектра поглощения нативного БСА следует, что локальные максимумы (переходы в полосе поглощения) наблюдаются при длинах волн: $\lambda = 242,9; 255,8; 262,5; 267,0; 271,2; 282,1; 289,2$ и $295,2$ нм; наиболее отчетливо выражен максимум поглощения при 282,1 нм, он обусловлен присутствием триптофана в составе альбумина. Спектр поглощения РНКазы имеет максимум поглощения при $\lambda_{\max} = 276,6$ нм, который обусловлен наличием тирозина в составе рибонуклеазы. Такой вид спектра, в котором хорошо наблюдается только один максимум, объясняется значительными отличиями аминокислотного состава исследуемых белков: в молекуле БСА 30 остатков фенилаланина, 21 – тирозина и 3 – триптофана, тогда как в РНКазе всего 3 остатка фенилаланина и 6 – тирозина. Главный вклад в спектр поглощения РНКазы вносит тирозин, что обусловлено отсутствием триптофана, именно с этим связано более коротковолновое положение максимума поглощения (по сравнению с БСА). Низкая молекулярная масса, меньшее количество ароматических аминокислот и отсутствие триптофана являются причиной более низкой оптической плотности, и, соответственно, низкого коэффициента экстинкции рибонуклеазы.

Под действием УФ-света происходит повышение оптической плотности белковых растворов во всем исследуемом диапазоне длин волн. При этом повышение оптической плотности относительно нативного белка для РНКазы составило при действии УФ-света в дозе 755 Дж/м² 22,5 %; при 1510 Дж/м² – 37,5 %; 3020 Дж/м² – 32,3 %. Для БСА повышение оптической плотности относительно нативного белка при облучении в дозе 3020 Дж/м² – 6 %, что указывает на его большую фотостабильность.

При этом в спектрах УФ-облученных белков не изменяется положение характеристических точек по сравнению с нативным образцом, следовательно, не происходит образования окисленных продуктов ароматических аминокислот, возможное изменение микроокружения хромофорных групп не приводит к сдвигу длин волн электронных переходов в ароматических радикалах аминокислот.

Измеренная оптическая плотность – это сумма истинного значения оптической плотности и оптической плотности, обусловленной рассеиванием света. Вклад светорассеяния можно учесть путем экстраполяции значений оптической плотности из области, где отсутствует вклад истинного поглощения хромофорами (в

данном случае – 340 - 400 нм). Для учета вклада светорассеяния использовали формулу $D_{\text{рас}} = 10^a \cdot \lambda^n$, а a и n – эмпирические коэффициенты, характеризующие светорассеяние.

Зависимость полученных коэффициентов для БСА линейная, для РНКазы мы видим неоднаправленные изменения данного параметра, что, по-видимому, указывает и на неоднаправленные изменения объема белковой глобулы.

Полученные нами данные показывают, что, используя спектрофотометрический метод, можно корректным образом описать структурные изменения в молекуле белка.

Фотоиндуцированные внеклеточные ловушки нейтрофилов

Закрытная Д.С.^{1*}, Демина Е.М.¹, Шутиков А.А.¹, Арынбек Е.А.¹, Маматкулов К.М.¹, Арзуманян Г.М.¹

¹Объединённый институт ядерных исследований, ЛНФ;

darya.zakrytnaya@nf.jinr.ru

Нетоз - это запрограммированная гибель клеток, которая происходит в ответ на различные виды стимулов. В последнее время появляется все больше работ, посвященных изучению фотоиндуцированного нетоза. Данная работа посвящена исследованию активации нейтрофилов по двум длинам волн вызывать фотоиндуцированный нетоз при трех различных дозах облучения (4, 16, 32 Дж/см²). В качестве положительного контроля для активации использовали Форбол 12-миристат 13-ацетат (ФМА). Мы полагаем, что цитохромы являются первичными фотоакцепторами источников света. Цитохромы запускают всю нисходящую цепь, начиная с активации генерации АФК и заканчивая высвобождением внеклеточных ловушек. Цитохромы входят в состав НАДФ-оксидазы и митохондрий гранулоцитов. Применение ингибиторов показало, что под воздействием излучения двух длин волн происходит механизм нетоза посредством двух сигнальных путей.

Фотохимия растений, растущих под стеклом с фотоконверсионными люминесцентными нанокompозитами Eu

Пасхин М.О.^{1*}, Яныкин Д.В.^{1,2}, Победоносцев Р.В.¹, Гудков С.В.¹

¹ИОФ РАН;

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Россия;

pashin.mark@mail.ru

Фотоконверсионные материалы имеют большой потенциал для применения в сельском хозяйстве [1], так как они преобразуют малоиспользуемый или даже вредный для растений свет, в фотосинтетически активное излучение (ФАИ) [2,3]. Люминесценция в области ФАИ достигается за счёт даунконверсии фотонов ультрафиолетового излучения. Подобными свойствами обладают некоторые редкоземельные металлы, в частности наночастицы на основе Eu.

Были получены, два вида наночастиц на основе Eu: Eu₂O₃, полученные с помощью лазерной фрагментации Eu₂O₃, и Eu³⁺:LaF₃, полученные методом гидротермально-микроволновой обработки. Были протестированы их физические и люминесцентные свойства. После этого наночастицы наносились на поверхность стекла и проводилось изучение влияния изменённого света на морфометрические, физиологические и фотохимические параметры культуры томатов *Solanum lycopersicum*.

В результате исследований было установлено, что размер обоих видов наночастиц составил 200 нм. Наночастицы Eu₂O₃ немного уменьшают интенсивность света в ФАИ. Полученные частицы флуоресцируют в красной области: Eu₂O₃ на длине волны 612 нм и 626 нм, а Eu³⁺: LaF₃ 592 нм и 620 нм. Выращивание растений под таким покрытием приводило к изменениям их морфометрических параметров, в частности, у растений, растущих под покрытиями с наночастицами Eu₂O₃, увеличилась площадь листовой поверхности на 37%, длина стебля на 25% по сравнению контрольными растениями, растущих под Eu³⁺: LaF₃ наночастицами, а количество листьев не изменялось ни в одном эксперименте. При этом количество хлорофилла упала в обоих экспериментах, по сравнению с контролем.

Статистически значимые отличия в фотохимических экспериментах появляются на 43 день после появления всходов. Было обнаружено, что развитие показателя эффективного квантового выхода фотосистемы II (Y(II)) происходит быстрее у растений, растущих под покрытием с наночастицами Eu₂O₃, а показатели

квантового выхода регулируемого ($Y(NO)$) и нерегулируемого ($Y(NPQ)$) рассеяния тепла были меньше и выходили на плато быстрее, чем у остальных образцов. Аналогичные результаты были получены для фотохимического (q_L) и нефотохимического (q_N) тушения. Кроме того, скорость переноса электронов фотосистемы II ($ETR(II)$) также быстро увеличивалась у образцов, растущих под Eu_2O_3 покрытием. Полученные результаты могут говорить о более высокой скорости адаптации растений к свету, что приводит к более быстрому росту и развитию растений, на что указывают измеренные показатели.

1. Pashkin, M. O., Yanykin, D. V., & Gudkov, S. V. Current Approaches to Light Conversion for Controlled Environment Agricultural Applications: A Review. *Horticulturae* 8(10), 885 (2022).

2. Q. Xia, M. Batentschuk, A. Osvet, P. Richter, D.P. Häder, J. Schneider, C.J. Brabec, L. Wondraczek, A. Winnacker. Enhanced photosynthetic activity in *Spinacia oleracea* by spectral modification with a photoluminescent light converting material. *Opt. Express* 21, 909–916 (2013).

3. Z. Zhang, Q. Han, S. Liu, Z. Wang, M. Hu, S.M.W. Domnic, R. Lau, B. Xing. Recombination and storage of sunlight with intelligent phosphors for enhanced photosynthesis. *Dalton Trans.* 50, 11025–11029 (2021).

Фотоцитотоксичность комплексов апконверсионных наночастиц с фотосенсибилизатором *in vitro*

Анисимов Р.А.¹, Верховский Р.А.¹, Ломова М.В.¹, Наволокин Н.А.³, Кочубей В.И.^{1,2}, Янина И.Ю.^{1,2*}
¹СГУ;

²Национальный исследовательский Томский государственный университет;

³Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского;
irina-yanina@yandex.ru

Уникальные фотолюминесцентные свойства апконверсионных наночастиц (АКНЧ) перспективны для биовизуализации за счет увеличения контрастности изображений из-за отсутствия аутофлуоресценции ткани и фотостабильности, что позволяет проводить длительную визуализацию на уровне отдельных наночастиц [1]. Данные свойства делают АКНЧ привлекательными в качестве контрастных агентов или биологических сенсоров, для биомедицинской визуализации и терапии различных заболеваний [2].

В связи с противоречивостью данных о цитотоксичности АКНЧ часто проводится капсулирование частиц в различные носители, такие как частицы ватерита, и основанные на его ядрах-оболочках и полиэлектролитных капсулах [3]. Ранее было показано, что образование полых микрокапсул или микрокапсул ядро-оболочка помогает дистанционно контролировать проницаемость оболочек [4]. Интерес представляет разработка комплекса, содержащего в себе АКНЧ и фотосенсибилизатор (ФС).

В экспериментах использовали фибробласты L-929 и 4T1 *in vitro*. Клетки высевали отдельно в специальные планшеты для клеточных культур и культивировали в DMEM среде с 1% коктейлем пенициллина-стрептомицина, 2 mM L-глутамина и 10% фетальной бычьей сыворотки. Культивирование проводили в специальном инкубаторе, содержащем 5% CO₂ при 37 °C. Среды заменяли на свежие каждые 2 дня. Культуры клеток с образованием 75-85% монослоя снимали с использованием 0,25% трипсина и подсчитывали с помощью гемоцитометра количество клеток.

В работе использовались АКНЧ собственного производства NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺. АКНЧ (размером около 80 нм) были синтезированы гидротермальным методом. Концентрация АКНЧ составляла 5 мг/мл. В качестве ФС использовали Cu₂ и Cu⁺.

Выживаемость клеток изучали путем добавления суспензии АКНЧ и последующего ИК-облучения (время воздействия от 5 до 45 минут). Проведено цитологическое и морфологическое сравнение ответов клеточных линий на воздействие.

Были получены системы ядро-оболочка субмикронного размера содержащие АКНЧ и ФС. В качестве ядра были использованы субмикронные частицы CaCO₃.

Показано наличие излучательного переноса энергии от АКНЧ к ФС при возбуждении люминесценции АКНЧ длинноволновым излучением (980 нм).

Частицы проявляли цитотоксические, цитостатические свойства. Полученные результаты могут быть учтены при разработке комплексных препаратов для фотодинамической терапии и изучения путей повышения их эффективности при проведении с их применением процедуры фотодинамической терапии (ФДТ).

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-72-10057, <https://rscf.ru/project/21-72-10057/>

[1] Li, Y. and Chen, G. (2022), Upconversion Nanoparticles for Cancer Therapy. *Adv. NanoBiomed Res.* 2200092. <https://doi.org/10.1002/anbr.202200092>

[2] Lakshmanan A, Akasov RA, Sholina NV, Demina PA, Generalova AN, Gangadharan A, Sardar DK, Lankamsetty KB, Khochenkov DA, Khaydukov EV, Gudkov SV, Jayaraman M, Jayaraman S. Nanocurcumin-Loaded UCNPs for Cancer Theranostics: Physicochemical Properties, In Vitro Toxicity, and In Vivo Imaging Studies. *Nanomaterials* (Basel). 2021 Aug 29;11(9):2234. doi: 10.3390/nano11092234. PMID: 34578550; PMCID: PMC8471946.

[3] Du, K., Feng, J., Gao, X. et al. Nanocomposites based on lanthanide-doped upconversion nanoparticles: diverse designs and applications. *Light Sci Appl* 11, 222 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41377-022-00871-z>

[4] Ravindran Girija, A.; Balasubramanian, S. Theragnostic potentials of core/shell mesoporous silica nanostructures. *Nanotheranostics* 2019, 3 (1), 1-40. DOI: 10.7150/ntno.27877.

Хемиллюминесцентная диагностика радикал-связывающей способности арабиногалактан-стабилизированных наночастиц серебра

Зверева М.В.^{1*}, Хитева Т.В.¹, Жмурова А.В.¹

¹*Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН;*
mlesnichaya@mail.ru

Поддержание гомеостаза животного организма остается одним из наиболее эффективных методов предупреждения развития ряда опасных заболеваний неинфекционной и инфекционной природы. Поиск новых высокоэффективных и безопасных радикал-нейтрализующих систем продолжается, и обусловлен тем, что в больших концентрациях или вследствие своей чрезмерной реактивности, известные органические антиоксиданты индуцируют свободно-радикальные реакции, проявляя при этом, прооксидантные свойства. С этой точки зрения особое внимание привлекает использование в качестве потенциальных антиоксидантов - наночастиц, в частности наночастиц серебра (Ag(0)НЧ), характеризующихся высокой величиной поверхности раздела фаз, а соответственно и избытком поверхностной энергии, следствием чего является проявление нанообъектами высокой физико-химической активности сочетающейся с их крайне низкой токсичностью. Совмещение антимикробных свойств Ag(0)НЧ с их антиоксидантными свойствами, а также водорастворимостью и биосовместимостью стабилизирующего их полисахарида арабиногалактана (Ар-Гал) позволит разработать современные наноматериалы для борьбы, как с инфекционными агентами, так и для нивелирования последствий избыточной генерации свободных радикалов в условиях естественного иммунного ответа организма. Тогда как выявление потенциальных механизмов антирадикального действия наночастиц, в том числе высоко-чувствительным хемиллюминесцентным методом позволит направленно варьировать его выраженность посредством изменения их характеристик [1].

Данная работа направлена на синтез и хемиллюминесцентную диагностику радикал-связывающей способности Ар-Гал-стабилизированных Ag(0)НЧ.

Синтез водорастворимых органо-неорганических нанокомпозитов представляющих собой Ар-Гал-стабилизированные Ag(0)НЧ осуществляли восстановлением нитрата серебра в водном растворе Ар-Гал, выполняющего одновременно функцию и восстановителя ионов серебра до Ag⁰ и стабилизатора образующихся наночастиц. Реакцию инициировали повышением pH реакционной среды до 10-11 и температуры до 60 °С. Время синтеза составляло от 10 до 50 минут в зависимости от количества вводимого серебра, варьирование которого осуществляли изменением соотношения катионы Ag/Ар-Гал от 0.005 до 0.05. Фазовый анализ нанокомпозитов выполнен на основании дифрактограмм характеризующихся наличием интенсивных рефлексов в области 38.1, 44.2 и 64.3 2θ ° соответствующих (111), (200) и (220) плоскостям кристаллической решетки Ag(0). Согласно данным просвечивающей электронной микроскопии и рентгенофазового анализа нанокомпозиты формируются в виде распределенных в полисахаридной матрице Ар-Гал частиц с формой приближенной к сферической и средним размером нанокристаллитов Ag(0) 3.0 нм, 3.5 нм, 4.0 нм и 5 нм для образцов содержащих 0.5 %, 1.0 %, 1.9 % и 3.6 % Ag соответственно.

С использованием известной радикал-генерирующей системы «пероксидаза хрена - H₂O₂» с люминолом в качестве активатора хемиллюминесценции, а также посредством обработки полученных кинетических кривых хемиллюминесценции методом TAR (Total Antioxidant Reactivity) нами охарактеризованы антиоксидантные свойства полученных серебро-содержащих нанокомпозитов. Установлено, что их введение в радикал-генерирующую систему «пероксидаза хрена - H₂O₂» сопровождается выраженным тушением хемиллюминесценции, сопоставимым по значению степени тушения (q) с q стандартного антиоксиданта – аскорбиновой кислоты. При этом, значение q находится в зависимости как от концентрации водных растворов нанокомпозитов, варьируя в диапазоне 0.19-0.98, так и от количественного содержания наночастиц серебра в составе композита. При этом изучение кинетики хемиллюминесценции в присутствии нанокомпозитов позволило установить, что в низких концентрациях (0.1-0.4 мг/мл) их водных растворов тушение хемиллюминесценции

идентифицируется исключительно снижением интенсивности плато, тогда как увеличение концентрации водных растворов нанокмпозитов до 2.5-5.0 мг/мл сопровождается частичным снижением интенсивности хемиллюминесценции на начальном этапе (0-6 мин) с последующим медленным нарастанием интенсивности свечения до уровня контроля [2]. Полученные данные свидетельствуют о концентрационно-обусловленной зависимости действия полисахарид-стабилизированных Ag(0)НЧ, в частности в низких концентрациях они проявляют себя как типичные слабые антиоксиданты, тогда как при высоких концентрациях как антиоксиданты средней силы.

Таким образом нами получен ряд водорастворимых нанокмпозитов представляющих собой полисахарид-стабилизированные Ag(0)НЧ со средним размером варьирующим в интервале 3.0-5.0 нм. С привлечением метода активированной хемиллюминесценции впервые выполнена количественная оценка антиоксидантных свойств полисахарид-стабилизированных Ag(0)НЧ, а также установлена выраженная зависимость значения q от концентрации их водных растворов и процентного содержания серебра в составе композита.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-26-00140).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Iu.A. Vladimirov, E.V. Proskurina, D.Iu. Izmailov. Biofizika. 56 (6): 1081 (2011)
2. S. Guo, Q. Deng, J. Xiao, B. Xie, Z. Sun, J. Agric. Food. Chem. 55 (8), 3134 (2007).

Эффекты вязкого микроокружения на биоллюминесцентную реакцию бактерий: роль диффузионного ограничения и межмолекулярных взаимодействий

Немцева Е.В.^{1,2*}, Лисица А.Е.¹, Суковатый Л.А.¹, Гульнов Д.В.¹, Кратасюк В.А.^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет;

²Институт биофизики СО РАН;

enemtseva@sfu-kras.ru

Раскрытие механизмов влияния сред с различными физико-химическими характеристиками на ферментативный катализ является ключевой задачей для понимания принципов регуляции биохимических процессов в живой клетке (= в динамичном микроокружении сложного состава). Активность ферментов в клетке определяется многими факторами, среди которых значительную роль играет вязкость среды. Добавление различных соразтворителей в традиционные буферные растворы помогает имитировать внутриклеточные условия *in vitro*, позволяя уменьшить число сочетающихся регуляторных эффектов. Биоллюминесцентная реакция, катализируемая бактериальной люциферазой, представляет собой многостадийный процесс, включающий образование и распад как минимум четырёх интермедиатов. Механизмы влияния вязкости среды на такой биохимический процесс всё ещё не установлены окончательно.

Целью данного исследования было определение диффузионно-контролируемых стадий реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*. Для этого были проанализированы константы скорости отдельных стадий реакции в средах с повышенной вязкостью (до 6 сП), созданных добавлением соразтворителей различной молекулярной массы (этиленгликоль, глицерин, глюкоза, сорбитол, сахароза, декстран с молекулярной массой около 70 кДа и полиэтиленгликоль с молекулярной массой около 4 кДа). Константы скорости вычисляли на основе нестационарной кинетики реакции, измеренной методом остановленного потока, с помощью математической модели, учитывающей последовательность стадий реакции. Модель была разработана в лаборатории теоретической биофизики Института биофизики СО РАН. Также было проведено вычисление молекулярной динамики бактериальной люциферазы в окружении воды и соразтворителей для обнаружения возможного изменения структуры белка в вязких средах. Кроме того, межмолекулярные взаимодействия люциферазы с соразтворителями исследовали методом флуоресцентной спектроскопии.

Было получено, что константы скорости связывание восстановленного флавиномононуклеотида и длинноцепочечного альдегида (образования интермедиатов I и II) зависят от вязкости среды по степенному закону, то есть проявляют свойства диффузионно-контролируемых процессов. В то же время скорость связывания кислорода (образования интермедиата II) не зависит от вязкости среды. Скорости «темновых» стадий реакции (окисления восстановленного флавина и распада интермедиата II) тоже испытывали диффузионные ограничения в вязких средах, но это не приводило к увеличению общего квантового выхода реакции. Каталитическая константа бактериальной люциферазы оказалась не зависящей от вязкости среды: наблюдалось её увеличение в средах с глюкозой, сорбитолом и сахарозой, и уменьшение – в средах с этиленгликолем и декстраном.

Молекулярная динамика бактериальной люциферазы в окружении низкомолекулярных соразтворителей показала, что в присутствии этиленгликоля увеличивается поверхность белка, доступная растворителю, в то

время как в остальных случаях она не изменяется. Кроме того, было установлено предпочтительное связывание люциферазы с глюкозой, сорбитолом и сахарозой, но не с этиленгликолем и глицерином.

Было получено, что спектры флуоресценции бактериальной люциферазы при возбуждении 295 нм проявляли гипсохромный сдвиг в присутствии глюкозы и сахарозы, что говорит о переходе триптофановых остатков в менее полярное окружение, чем в буфере. Этиленгликоль и полимерные соразтворители не влияли на спектр люминесценции белка.

Таким образом, на основе результатов экспериментов и молекулярного моделирования получена целостная картина влияния вязких сред на биолюминесцентную реакцию, катализируемую люциферазой *P. leiognathi*: (i) замедление диффузии компонентов реакции приводит к снижению скорости связывания флавинового и альдегидного субстрата, но также способствует замедлению конкурирующих «темновых» стадий реакции; (ii) наблюдается преферативное связывание с поверхностью люциферазы некоторых соразтворителей, что коррелирует с увеличением каталитической константы фермента в их присутствии; (iii) растворы биополимеров влияют в соответствии со своей низкой вязкостью и молярной концентрацией, дополнительных эффектов вследствие явления макромолекулярного краудинга не наблюдается.

Полное оглавление

Краткое оглавление.....	3
Пленарные доклады.....	4
Что такое сознание человека	4
Физические принципы организации 3D- структуры и динамики биополимеров.....	4
Фемтосекундная лазерная спектроскопия и фемтосекундный лазерный микромашининг в биофизике	5
Изучение белок-белковых взаимодействий методами молекулярного моделирования	6
Роль скоррелированных движений отдельных фрагментов белков в их функции: фотофизика цветных флуоресцентных белков	7
От ДНК-белковых взаимодействий к пониманию функционирования геномов эукариот. 7	
Конденсация ДНК в бактериях	8
Стратегия лечения заболеваний, ассоциированных с возрастом	8
Вычислительная структурная биофизика термочувствительных ионных каналов семейства TRPV	9
Доставка биологически активных веществ в компартменты живой клетки: достижения, проблемы и перспективы	10
Физико-химия монооксида азота и его соединений как детерминант их биологического действия	10
Перспективные ядерно-физические методы бинарной протонной терапии	11
Роль трипептида глутатиона в редокс-зависимой регуляции функционирования белков.....	12
Генетические механизмы, приводящие к атаксии	13
Информатика на основе нанобиоэлектроники	14
Биоинформатика и хемоинформатика в репозиционировании лекарств. Уроки пандемии COVID-19.....	14
Вода как сенсор слабых воздействий на биологические системы	16
Основа метаболизма – транспорт орто-пара спиновых изомеров H ₂ O по аквапориновым каналам сквозь мембраны	17
Терагерцовая динамика гидратных оболочек биомолекул	18
Использование биофизических технологий в сельскохозяйственных исследованиях	19
Мониторинг экосистем vs математическое моделирование. Конвергенция.....	20
Биофизические методы в океанологии.....	21
Водородный электрод на основе иммобилизованной гидрогеназы с высокой плотностью тока	21
Мультихромофорные фотоактивные белки для оптогенетических приложений.....	22
Искусственный фотосинтез – перспективное решение энергетики	22
Применение методов вычислительной гидродинамики в решении актуальных задач сердечно-сосудистой хирургии	23

Молекулярные машины как инструмент сопряженного нарушения симметрии и преобразования формы энергии в рабочем цикле	24
Лазерные пинцеты и их применение в биофизических исследованиях.....	25
Биоинформатика, нейробиология нового поколения и искусственный интеллект	26
Абсорбционные свойства и фотосенсибилизирующее действие молекулярного кислорода.....	26
Автоволновая природа гигантских импульсов деполяризации, предшествующих приступам эпилепсии	27
Молекулярная биофизика. Структура и динамика биополимеров и биомакромолекулярных систем.....	29
С-В-А тест для силовых полей ДНК	29
Д-энантиомерный пептид, разработанный для лечения болезни Альцгеймера, динамически взаимодействует с амилоидогенным участком предшественника β -амилоида ...	29
«Хвосты» гистонов и односторонние разрывы ДНК стабилизируют внутринуклеосомные петли ДНК при транскрипции нуклеосом	30
АСМ-исследование влияния солей хрома (III) на конформацию молекул коллагена	31
Адсорбция полиадениновых последовательностей двухнитевой ДНК на поверхность золотых наночастиц.....	32
Амилоидная агрегация SAA человека.....	33
Анализ транскрипции нуклеосом с использованием FRET-подходов позволяет выявить вариабельность пространственной структуры элонгационных комплексов с одинаковой длиной РНК	33
Белки как полимеры с локальной структурной детерминированностью	34
Белковая инженерия на основе гиперстабильных Sm-подобных белков. Первые результаты и перспективы	35
Взаимодействие наночастиц оксида железа, покрытых цитратом натрия, с лизоцимом белка куриного яйца	36
Взаимодействие серотрансферрина и ингибитора C1-эстеразы с β -амилоидным пептидом	36
Взаимосвязь равновесных параметров адсорбции лизоцима на поверхности живых клеток бактерий различных семейств и кинетики ферментативного лизиса (разрушения) бактериальных клеток на примере <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	37
Взаимосвязь энтропии, симметрии и информации супрамолекулярной структуры молекул ДНК	38
Влияние амфотерицина В на цитоархитектонику эритроцитов крови доноров	39
Влияние мультипликативного шума на выходной сигнал ДНК-биосенсора.....	40
Влияние пектина на процесс электроолимеризации метиленового синего и толуидинового синего	41
Влияние структурной организации нуклеиновых кислот на взаимодействие с гипохлоритом	42
Влияние сывороточного альбумина на связывание фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A165) с моноклональным антителом бевацизумаб	43

Влияние электростатического окружения на спектральные свойства каротиноидов	44
Возможный полиморфизм неканонических структур, образующихся при контактах ДНК, содержащих G-повторы и C-повторы: стратегия моделирования, классификация и наиболее вероятные формы	44
ДНК, синтезированная <i>ab initio</i> ДНК полимеразой Bst в присутствии никующих эндонуклеаз и особенности ее структуры - потенциальная платформа для получения новых биоматериалов	45
Дезоксигенация глобинов в присутствии митохондрий. Электростатическое взаимодействие глобинов с фосфолипидными мембранами	46
Димеризация трансмембранных доменов рецепторов подсемейства рецепторов инсулина	46
Динамические структурные особенности формирования аквакомплекса белка из рыбы <i>Muohocerphalus octodecemspinosus</i> , способного связываться со льдом, полученные на основе метода HDX-MS	47
Дисмутация гидропероксидов иммуноглобулинами класса G <i>in vitro</i>	47
Зависимость силы мутантных промоторов гена <i>gtnB</i> рибосомальной РНК <i>E.coli</i> от параметров электростатического <i>up</i> -элемента	49
Изучение влияния ионов серебра на стабильность дуплексов с различной длиной участка цитозин-цитозин	50
Изучение структуры вирусоподобных частиц SARS-CoV-2 и ротавируса А человека методами крио-электронной, просвечивающей и аналитической микроскопии	50
Изучение электростатической природы белок-лигандного взаимодействия в оранжевом каротиноидном белке	51
Ингибиторы динамической нестабильности микротрубочек на основе кумариновых лигандов колхицинового сайта тубулина	52
Исследование взаимодействия излучения Nd:YAG лазера с белковыми растворами	53
Исследование взаимодействия некоторых ДНК-специфических лигандов с сывороточным альбумином крови	54
Исследование влияния фосфатидной кислоты на температуру конформационного перехода комплексов [цитохром <i>c</i> ⁺ фосфолипиды]	55
Исследование воздействия кураксина CBL0137 на структуру нуклеосом методом spFRET-TIRF-микроскопии	55
Исследование конформационной подвижности белка тубулина в присутствии таксола методами молекулярного моделирования	57
Исследование крупномасштабной организации хроматина в ядрах HeLa с помощью методов малоуглового рассеяния (МУР)	57
Исследование механизма взаимодействия бромелина, папаина и фицина с графт-сополимерами на основе хитозана и карбоксиметилцеллюлозы	58
Исследование механизма взаимодействия фицина с N-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозаном	60
Исследование связывания метиленового фиолетового с сывороточным альбумином человека	61

Исследование структурно-функциональной организации фибриллярных белков дермальных покровов гидробионтов	62
Исследование структурных характеристик белка Е коронавируса SARS-COV-2 методом атомно-силовой микроскопии	63
Исследование структуры и реакционной способности дипептида карнозина методом теории функционала плотности	63
Исследования пространственной структуры амилоидных пептидов семени человека	65
Квантово-химическое моделирование межмолекулярного взаимодействия гиалуроновой кислоты с аминокислотами из состава наноконтейнеров адресной доставки и вещества-мишени	65
Колебательная структура в спектре люминесценции водных растворов тимина.....	66
Комплексы ДНК с координационными соединениями металлов, содержащими фенантролиновые лиганды	67
Конформационная подвижность противоракового пентапептида AAR-H , определенная методами молекулярного моделирования	68
Конформационные и редокс-изменения гемопорфиринов при протекании окислительно-восстановительной реакции между нейроглобином и цитохромом с	69
Конформационные особенности бета-амилоидного пептида 25-35.....	70
Кремниевые аналоги биомолекул в фокусе методов драг-дизайна	71
Математические модели, описывающие кооперативные взаимодействия при связывании кислорода гемоглобином	72
Математическое моделирование возникновения открытых состояний в молекуле ДНК в зависимости от концентрации дейтерия в окружающей жидкой среде	73
Математическое моделирование квантовых выходов активированной кумаринами с–314 и с–334 хемилюминесценции под действием комплекса цитохрома С с кардиолипином.....	74
Метод Фурье ИК-спектроскопии в исследовании аномерной чистоты α - и β -форм кристаллической D(+)-глюкопиранозы	75
Механизм ингибирования ДНК-связывающего домена белка PARP-1 солями урана: результаты эксперимента <i>in silico</i>	75
Механизмы ионной селективности в потенциал-чувствительных катионных каналах....	76
Многомасштабное моделирование реакций репарации ДНК фотоферментами	77
Многофункциональный ферритинподобный белок Dps может взаимодействовать с фосфолипидными везикулами и интегрироваться в мембраны E.coli	78
Модель броуновской динамики образования предварительного комплекса цитохрома С и димера III дыхательного комплекса в люменальном пространстве кристы митохондрий	79
Модель организации хроматина в ядре биологической клетки по данным малоуглового рассеяния (МУР)	80
Модификация аптамера AS1411 с целью модуляции его аффинности к белку нуклеолину в зависимости от pH среды	81
Молекулярная динамика α -спиральной поли-L-глутаминовой кислоты в водном растворе	82

Молекулярная динамика цитотоксинов кобр в высокоподвижной модельной мембране — эффективный инструмент изучения их структурно-функциональных свойств	83
Молекулярно-динамические характеристики взаимодействия гликопротеина Ib и фактора фон Виллебранда	84
Молекулярно-динамическое моделирование монослой-монослойного слияния мембран	85
Молекулярное моделирование как инструмент изучения молекулярных механизмов антибактериального и противовирусного действия катионных фотосенсибилизаторов	86
Молекулярные детерминанты цинк-зависимых взаимодействий бета-амилоида как инновационная платформа для создания лечебной технологии нейродегенеративных заболеваний	87
Молекулярные механизмы антибиотикорезистентности, связанные с гидролизом β -лактамных антибиотиков	88
Молекулярные механизмы инициации ферроптотических процессов при действии комплексов цитохрома c с фосфатидной кислотой	89
Молекулярный комплекс рутина с хедерасапонином C	90
Нанобиовзаимодействия сывороточного альбумина и шунгитового углерода	90
Некоторые любопытные особенности кинетики замерзания воды и новый взгляд на механизм биологической активности белка-антифриза	91
Новые биокатализаторы на основе цистеиновых протеаз в комплексе с микро- и наночастицами хитозана	92
Новые теоретические и экспериментальные данные о механизмах катастроф и спасений тубулиновых микротрубочек	93
О предпочтительности кодонов	94
Определение биоэквивалентности дикому типу рекомбинантного S-белка SARS-CoV-2, путем оценки гуморального иммунного ответа морских свинок и специфичности связывания человеческого ACE2	95
Паккерные состояния иононовых колец каротиноидов	95
Пейсмекерные токи участвуют в регуляции сократимости предсердного миокарда 3-х недельных крысят	96
Перекисное окисление липидов, индуцированное цитохромом c в присутствии фосфатидной кислоты. Перспективная роль в развитии апо- и ферроптотических процессов	97
Перестройка конформационной структуры биомакромолекул на поверхности сплюснутого металлического наносфероида в переменном электрическом поле	98
Применение метода броуновской динамики для описания чувствительности динамики тубулиновых микротрубочек к температуре	99
Применение понятий энтропии и информации для исследования биосистем: от молекул до организмов	100
Применение эндопептидаз IdeS и IdeZ в масс-спектрометрическом фингерпринтинге иммуноглобулинов, в медицине и ветеринарии	101
Природные IgG аутоантитела гидролизуют рекомбинантные внеклеточные фрагменты субъединиц NR1 и NR2 рецептора NMDA	102

Пространственная структура молекулы соймorfина-6	103
Разделение фаз N-белка SARS-CoV-2 и вирусной РНК: предполагаемый механизм и регуляция нуклеозидными производными.....	104
Разработка метода оптимизации получения микрокристаллических образцов для белковой серийной кристаллографии	105
Роль матричного белка М1 вируса гриппа А на начальных этапах инфекции: результаты молекулярного моделирования	106
Роль сетей водородных связей в фотосинтетических реакционных центрах 2-го типа..	106
Роль фазовых переходов биополимеров в образовании и функционировании ядерных стресс-гранул (А-телец)	107
Создание и изучение наноструктур на основе ДНК	108
Сравнительный анализ состава и структуры хрусталиков пресноводных рыб и моллюсков	109
Сравнительный анализ трехмерной структуры нонапептидной и октапептидной молекул	110
Стабилизация полноразмерного S-белка коронавируса SARS-Cov-2 в полимере SMA для исследования в электронном микроскопе	111
Стабильность и кинетические характеристики бактериальных люцифераз при воздействии различных температур.....	112
Степень сродства Бромистого этидия и Метиленового Синего к одноцепочечной полирибоадениловой кислоте.....	113
Структура и свойства полисахаридных гидрогелей для доставки терапевтических ферментов, витаминов и диагностических маркеров.....	114
Структура и функции ядерных белков HmgB1 и HmgB2	115
Структура лед-связывающего белка из рыбы длиннорогий бычок <i>Myoxocephalus octodecemspinosus</i> на основе спектров кругового дихроизма	116
Структура человеческого сывороточного альбумина при взаимодействии с двухвалентными ионами металлов	117
Структура, динамика и мембранотропные свойства антимикробных пептидов. Спектроскопия и компьютерное моделирование	118
Структурная организация белков хроматина HMGB1, H1 и их комплексов	119
Структурная организация молекулы рубисколина-6.....	119
Структурные изменения в хроматине отражаются на особенностях поверхности механически деформированных ядер, наблюдаемых атомно-силовой микроскопией	121
Структурные основы передачи сигнала посредством трансмембранного домена битопных рецепторов методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения	121
Структурный анализ фибриллообразующих пептидов SEM1(86-107) и SEM1(68-107), участвующих в увеличении инфекционной активности ВИЧ	122
Терагерцовые спектры молекул ДНК.....	123
Трансляционная диффузия белков как маркер белок-белковых взаимодействий.....	123
Физико-химические механизмы самоорганизации оболочечных вирусов	124

Физические основы связи структурной организации и молекулярной подвижности полимерных систем медицинского назначения с их химическим строением	125
Физические принципы укладки хроматина хромосом типа ламповых щёток	126
Фотодимеризация тиминовых хромофоров в водных растворах poly-T при комнатной температуре	127
Фотоэлектронные свойства пептидных нанотрубок на основе различных аминокислот	128
Характеристика комплекса Na,K-АТФазы и Src-киназы и его роль в патогенезе болезни Альцгеймера	129
Характеристика свойств гемоглобина при глутатионилировании и образовании нековалентного комплекса с глутатионом	130
Характеристики гидратных оболочек ДНК в растворах, полученные на основе анализа их комплексной диэлектрической проницаемости в терагерцовой области	132
Экспериментальное детектирование конформационных переходов между формами ДНК: проблемы и перспективы	133
Электрическая активность кардиомиоцитов крысы при стимуляции $\alpha 2$ -адренорецепторов на фоне блокады If токов	133
Биофизика клетки. Мембранные и транспортные процессы.....	135
Pulsing-активность митохондрий <i>Triticum aestivum</i> зависит от их подвижности: влияние холодовой акклимации	135
$\alpha 1$ -адренорецепторы играют роль в электрической активности сердца крыс	136
Анализ участия протонов, ионов кальция и пероксида водорода в изменении содержания фитогормонов при распространении электрических сигналов.....	136
Антиагрегационная и антиоксидантная эффективность наноконструкций с липоевой кислотой.....	137
Антиоксидантная активность экстрактов растительных материалов, используемых в традиционной китайской медицине.....	139
Астаксантин может принимать участие в процессах контроля качества митохондрий .	139
Атомно-силовая микроскопия эритроцитов при экспериментальном сахарном диабете и его коррекции 2,5-замещенными 6Н-1,3,4-тиадиазинами	141
Бактериолитическое и анти-адгезивное действие <i>Limosilactobacillus fermentum</i> 3872 на метициллин-резистентные штаммы <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	142
Введение метильных групп в фенильные кольца предшественников стабилизированных трифенилфосфониевых илидов увеличивает индуцированный ими протонный транспорт через плоские бислойные липидные мембраны.....	143
Взаимодействие глицирризиновой кислоты и Е-белка коронавируса с модельными мембранами	144
Взаимосвязь между структурно-механическими свойствами внеклеточного матрикса и его способностью к репопуляции опухолевыми клетками на примере децеллюляризованных органов	144
Влияние γ -излучения на биохимический состав ядерных фракций.....	145

Влияние белков острой фазы воспаления, С-реактивного белка, сывороточного амилоида А, альфа-1-кислого гликопротеина, фибриногена и церулоплазмينا, на активность нейтрофилов периферической крови.....	146
Влияние гипоксии на сократительную активность гладких мышц легочной артерии крысы	146
Влияние комбинированных магнитных полей на рост клеток линии NCTC clone L929	147
Влияние липидного состава липидных капель на эффективность их безбелкового слияния.....	148
Влияние метоксамина на потенциал действия кардиомиоцитов новорожденных крыс.	149
Влияние ресвератрола на структуру мембран митохондрий проростков гороха в присутствии ТНКЖ-тио.....	149
Влияние стимуляции $\alpha 1$ -адренорецепторов на частоту генерации ПД кардиомиоцитов крыс разного возраста	150
Влияние структурных особенностей децеллюляризированных органных матриксов на пролиферацию и морфологию клеток аденокарциномы яичника человека SKOV-3	150
Влияние хронического воздействия нано- и микродисперсного оксида кальция на морфологические физические и химические параметры эритроцитов	151
Восстановление работы ионных каналов в кардиомиоцитах человека после операций с кардиоплегическими растворами Нормакор и Кустодиол	152
Дейтерированные полиненасыщенные жирные кислоты защищают липидные мембраны от фотодинамического повреждения	153
Динамика I _{вр} изолированного сердца крыс при блокаде токов, активируемых гиперполяризацией в модели острого экспериментального инфаркта миокарда	154
Изменение активности митохондрий в присутствии перспективных лекарственных средств.....	155
Изменение параметров метаболизма в клетках с множественными мутациями мтДНК, ассоциированными с заболеваниями	155
Изменения процессов эндоцитоза синаптических везикул в разных типах скелетных мышц мышей после опорной разгрузки	157
Изменения электрических характеристик идентифицированных нейронов у виноградной улитки в результате выработки условного обстановочного рефлекса и реконсолидации памяти на этот рефлекс.....	157
Изучение влияния нового кардиопротекторного соединения нитроксисукцината 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридиния на ионные каналы кардиомиоцитов	158
Изучение механизма действия каспофунгина на модельные мембраны, имитирующие мембраны клеток-мишеней.....	159
Исследование ингибирования эндоцитоза как возможного терапевтического подхода для предотвращения развития реперфузионного повреждения.....	160
Исследование мембранной активности белка Е коронавируса SARS-CoV-2	161
Исследование роли VDAC в развитии митохондриальной дисфункции в культуре клеток в условиях гипергликемии	162

Исследование фотодинамических свойств окта-катионных комплексов фталоцианина с ионом магния или цинка на модельной липидной мембране.....	163
Исследования методом АСМ электрофизических свойств мембраны клеток буккального эпителия человека.....	164
Кальций-активируемая липидная пора и её роль в предотвращении перегрузки митохондрий кальцием.....	165
Кальций-зависимая активация продукции митохондриальных АФК в клетках первичной культуры головного мозга	166
Кинетика и механизмы оксидативного гемолиза под действием азо- и пероксидного инициатора.....	167
Латеральная диффузия липидов в одно- и двухкомпонентных модельных мембранах везикул по данным ¹ H ЯМР-спектроскопии с импульсным градиентом поля и контрастирующим агентом.....	168
Лиганд рецепторов сигма-1 галоперидол модулирует Ca ²⁺ -ответы в макрофагах	169
Масс-спектрометрическое исследование влияния нейропротекторного препарата NT-1505 на структуру и липидный профиль мембран микросом печени мышей	170
Математическая модель функционирования потенциал-зависимых ионных каналов со многими воротными частицами в виде уравнений Колмогорова.....	171
Медленные изменения электростатических потенциалов при фотоиндуцированном освобождении протонов на поверхности липидной мембраны	172
Молекулярно-динамический метод определения упругих параметров липидных мембран, основанный на измерении зависимости профилей латерального давления плоских липидных бислоев от латерального натяжения и окружающего давления	173
Моликсан модулирует транспорт Na ⁺ в коже лягушки	174
Наномеханические сигнатуры клеток культур глиом раннего пассажа зависят от экспрессии маркера CD44 в случае отсутствия мутации в гене IDH1, и не зависят в случае наличия мутации IDH1R132H	175
Наночастицы с липоевой кислотой и глутатионом.....	176
Нарушение принципа «один нейрон – один рецептор» в экспрессии генов хеморецепторов в нейронах обонятельного эпителия позвоночных – случайность или детерминированное явление.....	177
Нейроны моллюска как тестовая система для изучения токсичности митохондриальных разобщителей окислительного фосфорилирования.	178
Нелокально-электростатические аспекты электроосмотического сопряжения между водным потоком и электрическим током в плотных контактах между эпителиальными клетками.....	179
Нелокально-электростатический подход к катионной селективности моновалентных катионов в водной полости K ⁺ канала в биомембране и к зарядовой селективности в плотных контактах между эпителиальными клетками.....	180
Особенности реполяризации ПД кардиомиоцитов трехнедельных крыс при аппликации клонидина гидрохлорида	182
Отклонения в возрасте эритроцитов у больных атеросклерозом.....	182

Отличие ответов премоторных интернейронов на серотонин и предшественника его синтеза 5-НТР у интактных и сенситизированных улиток.....	183
Оценка влияния наноразмерных частиц диоксида кремния на морфометрические параметры мембран клеток крови методом лазерной интерференционной микроскопии	184
Параметры потенциала действия предсердных кардиомиоцитов новорожденных крысят на фоне блокады NPY1 рецепторов	186
Пероксиредоксин 6 снижает поражение нефронов в раннем реперфузионном периоде	187
Подавление кальций-индуцированного слияния липидных мембран растительными полифенолами	187
Поиск синергистов порообразующей активности полимиксина Б	188
Порообразующая активность низина и её перспективы в противоопухолевом действии	189
Причина синхронизации открывания-закрывания двух каналов грамицидина А при их близком расположении в липидной мембране	190
Проникновение молекул легкоплавкой агарозы в жидком состоянии через клеточные и ядерные мембраны - причина вариабельности в результатах Comet assay.....	191
Процессы перекисного окисления липидов с участием тиосемикарбозонов.....	192
Разработка более эффективных лекарственных форм полиеновых антибиотиков	193
Регистрации пароксизмального деполяризационного сдвига при помощи метода локальной фиксации потенциала в конфигурации outside-out.....	193
Регуляция НАДФН-оксидазы через рецепторы формилированных пептидов на гранулоцитах костного мозга у мышей, устойчивых к ожирению.....	194
Редокс-статус эритроцитов человека и глутатионилирование гемоглобина в условиях стресса.....	195
Рианодин и ингибитор SN-6 вызывают положительный хронотропный эффект у пейсмекерных клеток правого предсердия куриного эмбриона	196
Роль рецепторов свободных жирных кислот в эффектах бутирата натрия на сократительную активность толстой кишки мыши при моделировании синдрома раздраженного кишечника.....	197
Секреция нейромедиаторов во вкусовой почке	198
Сократительная активность легочной артерии в моделях изменения объема гладкомышечных клеток.....	199
Структурно-физиологические исследования калиевых каналопатий.....	200
Структурные изменения мембраны и цитоскелета эритроцита под воздействием гормонов	200
Тушение флуоресценции NBD-PC в DOPC, DOPA и TOCL содержащих мембранах при добавлении цитохрома с	202
Ультраструктурные изменения митохондрий сердца крыс при адаптации организма к гипоксии разной степени тяжести.....	203
Участие альфа2-адренорецепторов в регуляции биоэлектрических параметров кардиомиоцитов предсердий новорожденных крысят.....	204

Участие мембранных механизмов в регуляции электрокинетических свойств эритроцитарных популяций при стрессе	205
Фазовый переходы в системах химерных антиген рецепторов	206
Электрическая активность кардиомиоцитов предсердий при стимуляции NPY-рецепторов	207
Электрическая активность рабочих миокардиоцитов крысы при стимуляции альфа2-адренорецепторов	208
Электрические поля на межфазных границах липидных мембран	208
Электрофизиологические исследования влияния фотоконтролируемых производных азобензола и стильбена на клетки неонатальных кардиомиоцитов крыс	209
Механизмы трансформации энергии. Биоэнергетика. Молекулярные моторы	211
Вариабельность Н ⁺ /О стехиометрии комплексов электрон-транспортной цепи при различных функциональных состояниях митохондрий. Методы исследования, модифицирующие агенты и возможное физиологическое значение	211
Взаимодействие протонофорных разобщителей с митохондриальными ферментами ...	212
Влияние комплекса мутаций митохондриальной ДНК на содержание и продукцию АТФ в клетках	213
Влияние кратковременного белково-углеводного дефицита в питании на показатели памяти	214
Изменение уровня митохондриального мембранного потенциала при дисфункции дыхательной цепи, вызванной мутациями мтДНК.....	216
Изучение механизмов митохондриального разобщения аналогами бутил(трифенил)фосфония с заместителями в фенильных кольцах	217
Изучение молекулярного механизма перекачивания протонов в гем-медных дыхательных оксидазах в режиме реального времени.....	218
Исследование влияния хронического введения уридина на развитие митохондриальной дисфункции в ткани миокарда мышей линии C57BL/6 при экспериментальном сахарном диабете	218
Магнитно-изотопные эффекты и ядерный спиновый катализ в живых клетках и биомолекулярных моторах: экспериментальные факты и перспективы	219
Митохондриальная биоэнергетика, основанная на транспорте протонов и щелочноземельных металлов.....	220
О прямом участии ионов водорода в функционировании фактора F ₁ АТФ-синтазы.....	222
Спектральные изменения родопсина <i>S. paucimobilis</i> в присутствии и в отсутствие Zn ²⁺ в зависимости от pH	222
Структура протонных полуканалов FoF ₁ -АТФсинтазы в различных типах модельных мембран.....	223
Терминальная оксидаза цитохром bd-II <i>Escherichia coli</i> участвует в разложении перекиси водорода.....	224
Электрогенез в корнеобитаемой среде различных сортов салата	225
Биомеханика. Биологическая подвижность.....	227

Автономная активность постуральной мышцы при функциональной разгрузке: компенсация деструктивных процессов или их углубление?	227
Алгоритм построения метамодели для прогнозирования гемодинамики в аортах детей с врожденными пороками сердца	228
Анализ постурального баланса спортсменов-бадминтонистов при реализации познотонического рефлекса на повороты головы	229
Биомеханические аспекты оценки мощности мышц плечевого пояса у борцов	230
Влияние вязкости среды на возникновение открытых состояний в молекуле ДНК	231
Влияние изменения уровня эстрадиола на сократительную функцию кардиомиоцитов предсердий и желудочков	232
Изучение структуры агрегатов титина скелетных и гладких мышц <i>in vitro</i>	233
Комбинация разномасштабных методов для исследования биомеханических свойств трехмерных клеточных конструкторов	234
Математическая модель управления глазным яблоком, реализуемого глазодвигательными мышцами	235
Методика получения и анализа функциональных особенностей кардиомиоцитов миокарда легочных вен	237
Механические и сигнальные ответы функционально-разгруженной <i>m.soleus</i> крысы в ответ на хроническое повышение активности β -миозина	238
Модуляция активности AMPK влияет на экспрессию маркеров апоптоза в дифференцирующихся миоблестах, выделенных из атрофированных скелетных мышц.....	239
Морфофункциональные показатели бадминтонистов с учетом анаэробных возможностей	239
О топологической структуре многоклеточных животных	241
Особенности постурального баланса у юных бадминтонистов	242
Оценка постурального баланса спортсменов-бадминтонистов после функциональной нагрузки	243
Оценка постуральной устойчивости здоровых людей при чрескожной электрической стимуляции поясничного и шейного отдела спинного мозга с частотой 1 и 5Гц.....	244
Передаточная функция электромеханического сопряжения	245
Развитие мышечного утомления у теннисистов различной квалификации	246
Региональные особенности нарушения сократительной функции кардиомиоцитов предсердий крыс при пароксизмальной форме фибрилляции предсердий	248
Роль белков теплового шока HSP90 α и HSP90 β в миграции клеток фибросаркомы человека HT1080	249
Роль гигантских белков саркомерного цитоскелета в мышечной пластичности зимоспящих: факты и предположения.....	250
Роль отставленной тонической активности камбаловидной мышцы в перестройке ключевых молекулярных сигнальных процессов при развитии мышечной гипогравитационной атрофии.....	251
Роль саркоплазматических Ca/АТФ-азных каналов SERCA в регуляции сигнализации при трехсуточной функциональной разгрузке мышц крыс.....	252

Роль фосфорилирования сердечного миозин-связывающего белка С в кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия	253
Снижение активности АМРК способствует ускорению дифференцировки первичных миобластов, выделенных из атрофированной m. soleus крысы	254
Сравнение влияния тропомодулина ¹ на актин-миозиновое взаимодействие в сердечной и скелетных мышцах	255
Структурные и функциональные особенности тропомиозина с мутациями, ассоциированными с нарушением развития миокарда	256
Теоретическое исследование ориентационных, термодинамических и релаксационных свойств клетки эукариот	257
Участие PI3K и IP3R в регуляции атрофических процессов в скелетных мышцах при функциональной разгрузке	258
Цитоскелет камбаловидной мышцы в условиях миопатии критических состояний	259
Экспрессия белка теплового шока 90 на плазматической мембране клеток фибросаркомы человека HT1080, находящихся в разных физиологических условиях	260
Биофизика сложных многокомпонентных систем. Математическое моделирование. Биоинформатика.....	262
Кардиопротекторный эффект донора NO в модели сердечной недостаточности	262
BioGraph: компьютерная модель данных для стандартизации поиска и запросов разнородных биологических метаданных	262
Структурно-динамические модели и ИК спектры хроменопиридинкарбонитрильных и пиридо[1,2-а]пиримидиновых систем.....	264
Автоматизированная методика разметки полисомнографических записей на основе технологии параллельных вычислений	265
Агентная модель роста опухоли с учетом тканевого напряжения и поступления питательных веществ.....	266
Активное управление роботизированной жидкостью в конвективной петле с плавающими микрокиборгами	266
Анализ генов, ассоциированных с развитием рецидивирующей мочекаменной болезни	268
Анализ кривых дожития из Human Mortality Database с помощью мультифазной численной модели	269
Анализ палиндромных последовательностей в геноме SARS-CoV-2.....	270
База данных потенциальных промоторных последовательностей в геномах эукариот..	271
Бактериальные геномные молекулярные часы.....	272
Биоинформатический анализ распределения и некоторых функций самокомплементарных микроРНК у разных видов.....	273
Биоинформационный анализ данных сравнительного протеомного анализа белков сыворотки крови больных биполярным аффективным расстройством и здоровых лиц при помощи программного пакета Peptide Shaker.....	274
Вариабельность бактериального гена <i>grsA</i> в полифункциональном семействе рибосомных белков S1, содержащем структурные повторы.....	275

Вклад вариации копийности участков генома (CNVs) в видообразование и генетическое разнообразие штаммов лейшманий	276
Влияние динамики фотосинтезирующих клеточных структур фитопланктона на производство биомассы.....	277
Влияние замещений атомов Са на атомы Sr, Mg, Mn, Fe в структуре Гидроксиапатита и изменений электрического поля на его физические свойства, важные для биомедицины.....	278
Влияние пространственного полиморфизма биологического объекта на градиенты метаболитов при моделировании конвекционной реакции-диффузии	279
Влияние процедуры перекристаллизации на физико-химические характеристики глицина и янтарной кислоты: эксперимент и квантовохимическое моделирование.....	280
Влияние эффектов турбулентности при моделировании гемодинамики аортального клапана в норме и при патологии.....	281
Возможности дифференциальной сканирующей калориметрии для изучения белок-лигандных взаимодействий	282
Вычислительное моделирование стоковых течений в сложных каналах	283
Динамика кристаллов ДНК-Dps в условиях обезвоживания	283
Динамика связанности между полушариями мозга крыс при прохождении волны распространяющейся депрессии	284
Динамические модели начальных этапов дивергентной эволюции.....	285
Идентификация серотониновых нейронов у <i>Hymenolepis diminuta</i> и <i>Schmidtea mediterranea</i> с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (CLSM)	286
Изучение соотношения структура-активность ряда химических соединений с противовирусной активностью.....	288
Изучение соотношения структура-активность ряда химических соединений с противотуберкулезной активностью.....	288
Использование дробных производных для моделирования профиля пульсовой волны давления	289
Исследование биомолекулярной сольватации в рамках теории классического функционала атомной плотности.....	290
Исследование различных режимов питания с помощью математической модели углеводно-липидного обмена адипоцита	290
Как AlphaFold находит структуру белка: предсказывает он её на основе физики, или распознает по сходству последовательностей с помощью огромных баз данных?.....	291
Как изменение электрических зарядов белков способствует их переупаковке в оболочках вирусов Зика и Денге при созревании	292
Как повысить эффективность культивирования диатомовой водоросли <i>Skeletonema costatum</i> ?	293
Компьютерный анализ структуры генной сети глиобластомы и опухолей мозга.....	294
МД моделирование взаимодействия пептидного дендримера Lys2Leu с биоактивными пептидами	296
Математическая теория надежности и биофизика старения: краткая история и современное состояние.....	296

Математические подходы оценки длительности интервала QT электрокардиограммы	298
Математическое моделирование в задачах персонализированной оптимизации установки сосудистых шунтов	299
Математическое моделирование квантовых выходов активированной кумаринами с-314, с-334 и с-525 хемилюминесценции под действием комплекса цитохрома С с кардиолипином	300
Математическое моделирование основного генератора ритма лимбических приступов в гиппокампе	300
Математическое моделирование роста эпителиальной ткани в порах твёрдого скаффолда	301
Механизмы регуляции размеров агрегатов в дискретной модели агрегации <i>Dyctiostelium discoideum</i>	302
Механические модели ДНК	303
Моделирование аккумуляции заряженных фотосенсибилизаторов в клетках опухоли с переменными градиентами электрических полей на внутренних мембранах	304
Моделирование воздействия аналога аутоиндуктора анабиоза бактерий 4-гексилрезорцина на биополимеры клетки <i>Escherichia coli</i>	305
Моделирование работы глутамат-цистеин лигазы на основе стохастических методов	307
Моделирование распространяющейся деполяризации коры мозга, вызываемой эпилептической аппликацией калия	307
Моделирование саморганизации гибридных молекул, состоящих из лизинового дендрона с несколькими гидрофобными хвостами	308
Моделирование циклических процессов по экспериментальным данным в виде временных рядов посредством решений кусочно-линейных разностных уравнений с постоянными коэффициентами	309
Модель генерации и распространения потенциала действия, учитывающая зависимость ёмкости мембраны от напряжения	310
Молекулярное моделирование взаимодействия наночастицы золота с белком P2Y ₁₂	311
Мутационный анализ структуры транспортной молекулы аргинина	312
Некоторые термодинамические особенности процессинга самокомплементарных микроРНК (миРНК)	313
Нелинейные свойства сигналов пик-волновой активности	314
Новые методы анализа стохастической нелинейной динамики живых систем	316
Новый математический метод построения множественного выравнивания сильно дивергировавших нуклеотидных и аминокислотных последовательностей	317
Новый меганабор данных в сочетании с глубокой нейронной сетью позволил добиться прогресса в предсказании эффекта мутаций на стабильность белков	318
О времени возникновения познавательной способности в ходе биологической эволюции	319
Обезразмеренная модель неоднородной ДНК	320
Обзор маркеров хронических заболеваний и механизмов молекулярного исследования на основе высокопроизводительного секвенирования	321

Обработка данных морфологии клеток сердца для создания математической модели ткани предсердий	322
Оптимизация размера наносенсибилизаторов при противоопухолевой радиотерапии с помощью математического моделирования.....	323
Основные закономерности межклеточных взаимодействий через проницаемые контакты	324
Особенности морфологии и механизм структурного превращения оболочки флавивируса при созревании	325
Особенности поведения магнитомаркированных биологических клеток при фазовых переходах в пленке феррита-граната	326
Особенности топологии пролиферативных и непролиферативных эпителиальных монослоев	327
Особенности электрон-фононного взаимодействия у фотосинтетических пигментов, выявленные при моделировании оптического отклика	329
Оценка лингвистической сложности генетических последовательностей штаммов SARS-CoV-2.....	330
Оценка связности между полушариями мозга при эпилептиформной активности, вызванной введением пентилентетразола	330
Пандемия SARS-Cov-2 как система «хищник-жертва»: биофизические, социальные и гелиофизические факторы развития локальных эпидемий	331
Перколяционная модель ветвящейся сети активных сосудов	332
Построение множественных выравниваний аминокислотных последовательностей методом MANDS	333
Применение методов оценки сложности текста к анализу геномных кластеров сайтов связывания транскрипционных факторов	335
Применение модели артериальной системы мозга крысы для оценки интегрального распределения концентраций кислорода и глюкозы.....	336
Применение редуцированной математической модели реакционных центров фотосистемы II для определения гетерогенности ее антенны в условиях стресса	337
Промоторы РНК-полимеразы II: сходства и различия между областями базальных промоторов мРНК и некодирующих РНК.....	338
Радиотехническая модель связанных нейронов с синапсами	339
Разработка алгоритма анализа изображений, полученных методом время-разрешенной микроскопии FLIM	340
Разработка пациент-специфичной методики коррективки абляции	341
Разработка подходов к моделированию скольжения ДНК в нуклеосоме методом полноатомной МД.....	341
Распределение значений GC-состава фрагментов в пространственной структуре геномов хлоропластов, бактерий и митохондрий.....	342
Распределенная агентная модель фотосинтетического транспорта электронов.....	344
Реконструкция генных цепей, ассоциированных с сахарным диабетом второго типа с помощью онлайн инструментов биоинформатики.....	345

Решение задачи расчета показателей стрейна в эхокардиографии с использованием нейронных сетей глубокого обучения	345
Роль глутаматного переносчика в формировании эксайтотоксичности при избыточном содержании медиатора в конвекционной реакции-диффузии глутамата	346
Сетевая динамическая модель таламо-кортикальной активности мозга во сне, при бодрствовании и абсансных разрядах.....	347
Скрытые симметрии белковых вирусных оболочек	348
Сравнительное изучение структуры и таксономии на примере 5 S и 16 S РНК бактерий	349
Сравнительный анализ действия тяжелых металлов на фотосинтетический аппарат клеток <i>Chlorella vulgaris</i>	350
Статистические оценки кластеризации сайтов связывания транскрипционных факторов в геномах растений	351
Стохастическое моделирование белковых полей с немарковской динамикой.....	352
Тканеинженерные конструкции в биофизике, неврологии и медицине.....	353
Три типа моделей нейронов для моделирования эпилептиформной активности.....	354
Физическая модель механизма проницаемости ядерной мембраны.....	355
Филогенетический анализ и классификация коротких H2A-гистонов	355
Формирование системы статистически значимых предикторов для применения машинного обучения для предсказания вторичной структуры белка.....	356
Численное исследование влияния деформаций на распространение волн возбуждения-сокращения в образце миокарда в полной электромеханической модели сердечной мышцы	357
Численное моделирование сдвиговой активации тромбоцитов в катетерах для гемодиализа	359
Экспериментально-теоретическое исследование кворум-эффекта в накопительной культуре <i>Photobacterium phosphoreum</i> 1889	360
Биофотоника. Фотобиология. Фотосинтез. Биолюминесценция. Фоторецепция. Оптогенетика.....	361
Led-светильник для лабораторного культивирования микроводоросли хлореллы (<i>chlorella</i>).....	361
Активность фотосинтетического аппарата <i>Solanum tuberosum</i> в зависимости от структурного состояния тубулинового цитоскелета.....	362
Анализ спектров отражения здоровых и инфицированных листьев <i>Nicotiana Benthamiana</i>	362
Аналитическая система на основе канала mKate2-Kv1.3 и Atto488-хонготоксина для изучения пептидных блокаторов.....	363
Биоаналитические системы на основе люциферазы светляков <i>Luciola mingrelica</i>	365
Биологическая активность наночастиц: сравнение токсических, антиоксидантных и радиопротекторных с помощью биолюминесцентных биотестов.....	366
Биолюминесцентный анализ слюны для мониторинга утомления организма.....	366

Биолюминесценция гребневика <i>Pleurobrachia pileus</i> (O. F. Müller, 1776) в летний сезон	367
Биосенсоры и ферментативные биотесты на основе ферментов светящихся организмов	369
Влияние брожения на длительное фотообразование водорода клетками <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> при минеральном голодании	369
Влияние динамики микроокружения триптофана на параметры его флуоресценции в зависимости от температуры	370
Влияние длины волны, мощности и экспозиции лазерного излучения на генерацию синглетного кислорода	371
Влияние отсутствия α -карбоангидразы 2 на state transitions в растениях <i>Arabidopsis thaliana</i>	372
Влияние пероксида водорода на структурно-функциональную реорганизацию светособирающего комплекса антенны фотосистемы 2	373
Влияние структуры фотосенсибилизатора на его адсорбцию и фотодинамическую активность на бислойной липидной мембране	374
Влияние физических свойств тилакоидных мембран и морфологических особенностей хлоропластов на скорость state transitions в высших растениях	375
Выделение и характеристика каротиноид-белковых комплексов из тилакоидных мембран цианобактерии <i>Arthrospira platensis</i>	376
Высокая интенсивность автофлуоресценции ФАД как индикатор для выявления клеточной патологии	377
Дальний транспорт в регуляции фотосинтеза у харовых водорослей	378
Диагностика и зрительное излучение	379
Димеры хлорофилла в белках семейства WSCP - фотосенсибилизаторы редокс-реакций	380
Зависимость агрегации эритроцитов от эндогенных и экзогенных факторов: исследование с помощью лазерных методов в экспериментах in vitro	381
Защитное действие света на кислород-выделяющий комплекс фотосистемы 2 в тилакоидных мембранах шпината в условиях теплового стресса	382
Изучение в модели тилакоида редокс состояния пула пластохинонов и регуляции переходов 2–1 для водоросли <i>Scenedesmus obliquus</i> и цианобактерии <i>Synechocystis</i> PCC 6803 на основе анализа сигналов индукции флуоресценции и P700	383
Изучение возможностей лазерной предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур	384
Изучение изменения конформации моноклеосом в присутствии кверцетина методом флуоресцентной микроскопии одиночных частиц	385
Изучение цветовых предпочтений и реакций <i>Danio rerio</i> на свет	386
Использование показателей флуоресценции хлорофилла для предсказания накопления биомассы и засухоустойчивости пшеницы	387
Исследование возможности применения фосфоресцентных сенсоров в опухолевых клетках	388

Исследование прямого возбуждения растворенного молекулярного кислорода в области 800-1300 нм в связи с моделированием терапевтического действия лазеров	389
Исследование роли PI3-киназы в механизме Ca ²⁺ -сигналикации, индуцированной ацетилхолином	390
Исследование структуры сосудистого русла и уровня оксигенации опухолей различного морфогенеза.....	391
Исследование физико-химических характеристик флуоресцентных зондов класса азолотриазинов для идентификации микроорганизмов.....	392
Исследование флуоресценции EGFP при его де- и ренатурации, и при добавлении наночастиц	393
Конструирование экспериментального гроубокса для микроклонального размножения картофеля.....	394
Лазерная плазмонно-резонансная фототермическая терапия модельной перевитой опухоли почки у крыс.....	395
Механизм возрастного падения концентрации меланина в клетках ретинального пигментного эпителия глаза	396
Механизм ингибирования кислород-выделяющего комплекса фотосистемы 2 катионами лантаноидов.....	397
Механизмы образования и диффузии пероксида водорода в хлоропластах высших растений	398
Митогенетический эффект сверхслабого свечения: спящая красавица или алхимическое прошлое? (к столетию открытия А.Г. Гурвичем сверхслабого свечения биообъектов)	398
Модификация хромофорной группы как метод тонкой настройки оптических свойств микробных родопсинов.....	400
Обобщённый метод определения оптической спектральной плотности пигментных молекул; моделирование поглощения каротиноидов и порфириновых красителей	401
Обратимость окислительно-восстановительных реакций оммохромов сложного глаза насекомых	402
Особенности строения, функционирования и оптические свойства фотосинтетических реакционных центров	402
Оценка связывания цинковых фталоцианинов с наноалмазами для применения в фотодинамической терапии	403
Первичные фотореакции родопсина <i>Exiguobacterium sibiricum</i> (ESR) в зависимости от pH.....	404
Применение кремниевых наночастиц для нанотермометрии на наномасштабе	405
Разрушение метафазной пластинки в ооцитах мыши при помощи фемтосекундного лазерного излучения ближнего ИК диапазона.....	406
Регуляция синуклеинами и синглетным кислородом выработки инсулина у мышей	407
Регуляция фотосистемы 2 при выделении водорода микроводорослями	408
Роль оптогенетики в регуляции нейрон-глиальных взаимодействий в гиппокампе и в восстановлении когнитивных функций у мышей с моделью болезни Альцгеймера	408

Сравнение методов РАМ-флуориметрии и гиперспектрального имиджинга в досимптомной детекции вирусной инфекции в растениях <i>Nicotiana benthamiana</i>	409
Сравнительное исследование влияния железа и палладия на фотобиологические свойства циано(арил)порфиразинов, содержащих эти металлы в качестве центральных катионов	410
Тетра(арил)тетрацианопорфиразиновые свободные основания и их металлокомплексы для решения задач фотодинамической терапии злокачественных новообразований	411
УФ-индуцированные структурные модификации сывороточного альбумина и рибонуклеазы А	412
Фотоиндуцированные внеклеточные ловушки нейтрофилов	413
Фотохимия растений, растущих под стеклом с фотоконверсионными люминесцентными нанокompозитами Eu	413
Фотоцитотоксичность комплексов апконверсионных наночастиц с фотосенсибилизатором <i>in vitro</i>	414
Хемилюминесцентная диагностика радикал-связывающей способности арабиногалактан-стабилизированных наночастиц серебра	415
Эффекты вязкого микроокружения на биолюминесцентную реакцию бактерий: роль диффузионного ограничения и межмолекулярных взаимодействий	416
Полное оглавление	418
Авторский указатель	438

Авторский указатель

- Абакумов А. И. 277
Абатурова А. М. 79
Аббаслы Р. М. 110, 119
Абдинова А. А. 103
Абдрахимов Ф. А. 135
Абдрахимова Й. Р. 135
Абдрахманова А. Ш. 230
Абдуллаев Ф. Ф. 387
Абрамов А. Ю. 407
Абрамов В. М. 142
Абрамова М. А. 65
Абрамочкин Д. В. 200
Авакян Л. А. 278
Агаева Г. А. 68, 70
Агаева Л. Н. 103, 119
Агаева У. Т. 68
Агеева М. Н. 362, 409
Агладзе К. И. 152, 158, 209, 341
Адамович Б. В. 21
Аджубей А. А. 129
Аззаг К. 327
Айбуш А. В. 5, 376, 396, 402
Ал Ниссафи Л. 176
Александрова В. В. 93
Алексеев А. А. 269
Алехина А. Е. 345
Аллахвердиев С. И. 23
Алова А. В. 378
Алоян Л. 40
Алфимов А. Е. 268
Анашкина А. А. 34, 129, 195, 288, 338
Андреева Т. В. 385
Андрианов В. В. 157, 183
Андриянов В. С. 159
Аникина Т. А. 186, 207
Анисимов М. Н. 52, 93
Анисимов Р. А. 414
Антал Т. К. 369
Антипов С. С. 62, 78, 392
Антипова В. Н. 45
Антипова Л. В. 62
Антоненко Ю. Н. 143, 153, 178, 190, 212, 217
Антонец В. А. 241, 319, 332
Антонец М. А. 332
Антонов В. Г. 169, 174
Антонян А. П. 54, 61, 113
Аракелян В. Б. 40
Арзуманян Г. М. 413
Аристов В. В. 100
Армеев Г. А. 341
Арсеньев А. С. 46
Артюхов В. Г. 39, 58, 62, 92, 412, 583
Арутюнян А. Ф. 356
Арынбек Е. А. 413
Аскарова К. А. 304
Асланиди К. Б. 324
Асташев М. Е. 36
Ахмадишина Л. В. 276
Ахмеджанова К. Г. 391
Ахмедов Н. А. 103, 110, 119
Ахмедов Н. Ф. 103
Ахмедова С. Р. 103
Бабков Л. М. 264
Бабурина Ю. Л. 139
Багдигиян С. 327
Бадалов А. А. 71
Бадалян Г. Г. 355
Бадюлина В. И. 169, 174
Байжуманов А. А. 139
Баймлер И. В. 53
Байрамуков В. Ю. 57, 80, 121
Балабаев Н. К. 82
Балалаева И. В. 144, 150, 410, 411
Балашов Н. В. 373
Балобанов В. А. 35
Балтин М. Э. 229, 243
Балтина Т. В. 243, 244
Баранова О. А. 137, 176
Баранова С. В. 47, 116
Бартова Ю. Д. 246
Барцев С. И. 360
Барыкин Е. П. 129
Барышев А. В. 50
Барышев М. Г. 13
Батищев О. В. 63, 85, 106, 124, 161
Бахшалиева А. Я. 214
Башарина О. В. 412
Баяндин Ю. В. 257
Беженар М. В. 303
Безпрозванный И. Б. 408
Безус А. В. 326
Бекиш А. В. 153
Беликов Н. Е. 400
Белова Е. В. 128
Белова С. П. 252, 258
Белослудцев К. Н. 162, 211, 218
Белослудцева Н. В. 162, 165, 218
Белотелов А. О. 410
Бельдия Е. 255, 256
Бельдия Е. А. 253
Белянски М. Б. 270
Беляев А. В. 84
Беляева Н. Е. 383
Беляева Т. Н. 58, 60
Бендиткис А. С. 27
Бервицкий А. В. 299
Бережнов А. В. 375
Бережной А. К. 341
Березовский А. В. 152
Бершацкий Я. В. 46
Бершицкий С. 256
Бершицкий С. Ю. 253
Бикмуллин А. Г. 65, 122
Биктемирова Р. Г. 182
Бикчентаева Л. М. 244
Билалова Г. А. 150
Бинги В. Н. 36
Блохин Д. С. 65, 122
Бобров Н. В. 340
Бобылёв А. Г. 233
Бобылёва Л. Г. 233
Богачев А. В. 22
Богданова А. Ю. 129
Богданова Л. Г. 288
Богданова Л. Р. 114
Богодвид Т. Х. 157, 183
Бокша И. С. 101, 102
Большакова А. В. 408
Бондарев И. С. 326
Борзова В. А. 376
Борзунова Ю. Н. 52
Борисов В. Б. 224
Борисова М. М. 373
Борисова-Мубаракшина М. М. 375, 398
Бородин М. М. 62
Бороновский С. Е. 307, 336
Борщевский В. И. 22
Бочаров Э. В. 29, 46, 121, 673
Бочарова О. В. 46
Бочкова Ж. В. 69
Браже Н. А. 69
Бражников Е. В. 82
Брацун Д. А. 266, 301, 352

- Брилкина А. А. 362, 409
 Брыксин К. А. 65
 Брянская Е. О. 377
 Буглак А. А. 376
 Бугров Р. К. 154
 Бузмаков М. Д. 352
 Булавко Е. С. 75, 106
 Булина Н. В. 278
 Булычев А. А. 378, 383
 Бурдышева О. В. 361, 384, 394
 Бурмистров Д. Е. 36
 Бурмистрова О. С. 184
 Бутова К. А. 232, 237, 248
 Бучареб Д. 197
 Бучарская А. Б. 395
 Бучельников А. С. 100, 709
 Быстров В. С. 128, 278
 Быстрова А. В. 278
 Быстрова М. Ф. 177
 Вандышев Д. Ю. 392
 Ванин А. Ф. 10
 Вардеванян П. О. 40, 113, 528
 Варижук А. М. 104
 Варфоломеев С. Д. 400
 Варфоломеева Е. Ю. 57, 80, 121, 146
 Василевский А. А. 76
 Васильева Л. Г. 106
 Васин А. А. 396, 402
 Вахитов Л. И. 133
 Вашанов Г. А. 72
 Ведехина Т. С. 104
 Везо О. С. 75
 Велькович А. В. 262
 Верховский Р. А. 414
 Ветошкина Д. В. 372, 373, 375, 398
 Вечтомова Ю. Л. 376
 Вигонт В. А. 188
 Вильчинская Н. А. 239, 254
 Виноградов Д. С. 99
 Виноградова Л. В. 284, 330
 Винокуров А. Ю. 155, 166, 213, 216, 371, 377
 Вихлянцев И. М. 233, 250
 Владимиров Г. К. 300, 730
 Власова О. Л. 408
 Воденеев В. А. 409
 Воденеев В. А. 136, 362, 387
 Волгушева А. А. 369
 Волков В. В. 97, 202
 Волков И. А. 321
 Вологжанникова А. А. 36
 Володяев И. В. 300, 398, 728
 Волынский П. Е. 29
 Воробьев И. А. 52
 Воронина В. С. 47
 Врублевская В. В. 249, 260
 Габдрахманов А. И. 245
 Габрусёнок П. В. 81
 Гаврилова А. А. 107
 Гайдин С. Г. 193
 Гайнутдинов Х. Л. 157, 183
 Галанов Е. К. 123
 Галзитская О. 275
 Галиева А. М. 182, 204, 208
 Галимзянов Т. Р. 172, 173
 Галушка В. А. 357
 Галушко А. С. 225
 Гамаюнова Д. Ю. 283
 Гамилов Т. М. 289
 Гарбузинский С. Г. 91
 Гасиева З. А. 225
 Геворгиз Р. Г. 376
 Генерозова И. П. 149
 Генин В. Д. 395
 Генина Э. А. 395
 Герасимов Е. И. 408
 Герасимов Е. С. 276
 Герасимов Н. Ю. 149, 170
 Герасимова Е. Н. 405
 Герасимова Н. С. 30, 33, 55
 Гераськина О. В. 55
 Германова Э. Л. 203
 Гетте И. Ф. 141
 Гефтер С. Д. 144, 150
 Гиматдинов Р. С. 168
 Гисич А. В. 182
 Гифер П. К. 63
 Глухов А. С. 33
 Глухов Г. С. 111, 200
 Глушкова О. В. 8
 Глявина А. М. 391
 Глякина А. В. 275
 Гнездилов О. И. 168
 Годжаев Н. М. 68
 Голованов Е. А. 146
 Голощапов А. Н. 149, 170
 Голуб М. В. 228
 Голушко И. Ю. 292, 325, 348
 Гончарова С. С. 58, 60, 92
 Гордеева А. Е. 187
 Горовой Ю. М. 38
 Горох А. Д. 117
 Горохов В. В. 370
 Горшкова Ю. Е. 57, 125
 Горюнов А. С. 90
 Горячев С. Н. 370
 Гостев Ф. Е. 5, 404
 Гребенникова Т. В. 50
 Грехнёв Д. А. 188
 Гречаник В. И. 408
 Григорьев С. В. 57, 80, 121
 Гридина М. М. 126
 Гринберг М. А. 362, 409
 Гришин С. Н. 245
 Гришин С. Ю. 275
 Гришина А. И. 362, 409
 Грищенко А. А. 330
 Громова Е. Н. 387
 Губина М. В. 402
 Гудимчук Н. Б. 52, 57, 93, 99
 Гудков С. В. 36, 413
 Гудкова В. Р. 403
 Гудымо А. С. 95
 Гулин А. А. 396, 402
 Гульнов Д. В. 416
 Гурия Г. Т. 206, 359
 Гусакова В. С. 146, 199
 Гусакова С. В. 146, 199
 Гущин Е. И. 146
 Давыдова Л. А. 353
 Даниленко Е. И. 95
 Данилова И. Г. 141
 Данильченко Н. В. 95
 Дарнотук Е. С. 137
 Даутова А. З. 205
 Дегтерева Н. С. 337
 Деева А. А. 112
 Демина Е. М. 413
 Демина О. В. 400
 Демичев И. А. 345
 Демухамедова С. Д. 63
 Дениева З. Г. 124, 148, 161
 Дергилев А. И. 294, 335, 351
 Деркачева Н. И. 111
 Дерюшева Е. И. 36, 43, 275
 Дерябина И. Б. 157
 Джанибекова М. О. 52
 Джимаков С. С. 13, 73, 231, 310
 Дмитриев А. А. 192
 Дмитриева Е. М. 274
 Добрецов М. Г. 160
 Довидченко Н. В. 318
 Долгих А. И. 377
 Долгих Д. А. 69, 400
 Долинина А. Ю. 314, 347
 Долматов В. Ю. 403
 Доминова И. Н. 109
 Домрачева Т. М. 77
 Донцов А. Е. 396, 402
 Дорохова А. А. 73, 231
 Дорошенко О. В. 228

- Доррер М. Д. 345
 Дохоян А. Ю. 288
 Дрёмин В. В. 371, 407
 Дроботенко М. И. 13, 73, 231, 310
 Дубенская Н. А. 167
 Дубинин М. В. 162, 211, 218
 Дубова К. М. 105
 Дубовицкая А. Н. 58, 60
 Дубовой А. В. 299
 Дубовский П. В. 83
 Дубровин Е. В. 31
 Дунаев А. В. 377, 407
 Душанов Э. Б. 312
 Дымова Е. А. 390
 Дюкина А. Р. 194
 Евсеенко В. А. 95
 Евстратова А. Ю. 176
 Егоров В. В. 379
 Егоров Н. М. 339
 Егорова В. К. 229
 Егорова О. Н. 389
 Ельцов И. А. 99
 Емельянов В. В. 141
 Ератова Л. В. 371
 Еремин А. 378
 Ермаков Е. А. 102
 Ермаков Ю. А. 208
 Ермакова Е. А. 118
 Ермолинский П. Б. 381
 Ерофеев А. И. 408
 Ершова А. С. 330
 Ефимова Д. В. 245
 Ефимова С. С. 159, 187, 188, 189, 193
 Ефремов Р. Г. 29, 788, 819
 Ефремов Ю. М. 144, 234
 Жаворонкова А. С. 362, 409
 Жарких Е. В. 407
 Жданова О. Л. 285
 Жданова П. 47
 Жданова П. В. 116
 Желтухина А. Ф. 244
 Жигачева И. В. 149
 Жмурина М. А. 249, 260
 Жмурова А. В. 415
 Жуков В. В. 109
 Жукова Г. В. 366
 Жулидин П. А. 280
 Журавлев М. О. 265
 Журавлев С. Г. 389
 Журавлева Э. Р. 55
 Забродская Ю. М. 259
 Завестовская И. Н. 11
 Загрядская Ю. А. 155, 222
 Загубная О. А. 346
 Зайковская А. В. 95
 Зайцева Н. В. 151
 Зайцева Т. Н. 146, 199
 Заклязьминская Е. В. 200
 Закрытная Д. С. 413
 Залесский А. Д. 5, 406
 Зарипов П. И. 130, 195
 Зарипова К. А. 238, 252, 258, 259
 Зарьков С. В. 395
 Захаров А. А. 280
 Захаров А. В. 307
 Захаров Д. В. 345
 Захарова А. А. 159, 188
 Захарова Н. М. 250
 Зверев А. А. 150, 205, 207, 230, 239, 242, 246, 298
 Зверева М. В. 415
 Звягин А. В. 144
 Зеленихин П. В. 114
 Землянова М. А. 151
 Зефилов А. Л. 149, 204, 208
 Зефилов Т. Л. 96, 133, 136, 149, 150, 154, 182, 186, 204, 207, 208
 Зиганшин А. У. 245
 Зиганшин Р. Х. 69
 Зинченко В. П. 27, 193
 Зиятдинова Н. И. 133, 136, 149, 150, 154, 182, 204, 208, 949
 Злодеева П. Д. 187
 Зоров Д. Б. 220
 Зубова Е. А. 29, 133
 Зуев Ю. Ф. 114, 118, 123
 Зуева О. С. 114
 Зурина И. М. 234
 Зыкова Д. Д. 163, 172, 374
 Зырина Н. В. 45
 Зюбин А. Ю. 311
 Зюзин М. В. 405
 Иванисенко В. А. 351
 Иваницкий Г. Р. 4
 Иванков Д. Н. 75, 318
 Иванов Б. Н. 372, 375, 398
 Иванова С. 102
 Иванова С. А. 47, 274
 Ивонцин Л. А. 223
 Игнатова А. А. 69, 363
 Игнатова А. М. 151, 184
 Игнатова Л. К. 372
 Ильзоркина А. И. 162
 Ильинская О. Н. 114
 Ильичева И. А. 338
 Иматдинов А. Р. 95
 Иншакова А. М. 137, 176
 Исаев Д. Д. 278
 Исаева Е. Е. 205
 Исерович П. 179, 180
 Исаков Н. Г. 186, 204, 207, 298
 Исмаилова Л. И. 110, 119
 Ищенко А. В. 141
 Кабанова Н. В. 177
 Казаков А. С. 36
 Казаков М. С. 155, 213
 Казанцева Д. В. 47
 Казаринов К. Д. 137
 Калаева Е. А. 39
 Калашников В. Е. 227, 251
 Калинин А. И. 341
 Калущкий М. А. 106, 173
 Калюжный Д. Н. 130
 Камаева Д. А. 102, 453
 Камбеева Д. И. 168
 Капитунова А. И. 109, 311
 Капунац С. К. 270
 Капустников А. А. 354
 Капшуков Р. А. 326
 Карагяур М. Н. 162
 Каримова Р. Г. 262
 Карлова М. Г. 50, 200
 Карлышев А. К. 142
 Карнаухов А. В. 100
 Касьяненко Н. А. 50, 67, 108, 307
 Катина Н. С. 33
 Кезин В. А. 288, 288
 Кечко О. И. 52
 Киор Д. С. 387
 Кириллин М. Ю. 395
 Кириченко Я. Ю. 289
 Кирпичников М. П. 69, 363, 400, 404
 Кирсанов Р. С. 143, 178, 212
 Клапшина Л. Г. 410, 411
 Клементьев К. Е. 383
 Клинов А. П. 29
 Клочков В. В. 65, 122
 Клочкова Э. А. 65
 Книжник Е. К. 104
 Князева А. С. 341
 Ковалев Р. А. 57, 121, 788
 Ковалева Н. А. 29, 133
 Коваленко В. В. 283
 Коваленко И. Б. 6, 57, 86
 Коваленко Н. П. 177
 Коваленко С. Г. 152, 158, 209
 Ковалицкая Ю. А. 177

- Коваль В. В. 47, 116
 Козин С. А. 87
 Козлов А. С. 27, 389
 Козулева М. А. 375, 398
 Коленчукова О. А. 366
 Колесников С. С. 198
 Колманович Д. Д. 191
 Колобов А. В. 266, 323
 Колтаков И. А. 392
 Колтовая Н. А. 312
 Кольдибекова Ю. В. 151
 Кольтовер В. К. 219, 296
 Кольчугина И. Б. 404
 Комаров В. М. 94
 Комарова А. Д. 388
 Конарев П. В. 105
 Кондратьев С. А. 259
 Кондратьев М. С. 71, 94
 Коневцова О. В. 292, 325, 348
 Кононенко В. В. 326
 Кононова П. А. 144
 Константинова А. Н. 163, 374
 Константинова С. В. 101
 Коншина А. Г. 83
 Конюхова С. П. 202
 Копылова В. С. 307, 336
 Копылова Г. 255, 256
 Копылова Г. В. 232, 237, 248, 253
 Копылова Е. Е. 177
 Корватовский Б. Н. 370
 Корнеев К. Н. 381
 Корнилов М. В. 300
 Королева В. А. 58, 60, 92
 Коротков Е. В. 271, 317, 333
 Корчагина В. М. 49
 Коршунова Г. А. 178, 212, 217
 Косарев И. В. 142
 Косенко М. Н. 95
 Косенков М. А. 193
 Костенко Д. О. 333
 Котенева П. И. 234
 Котова Е. А. 143, 153, 178, 190, 212
 Котова П. Д. 390
 Кочубей В. И. 414
 Кочурова А. 256
 Кочурова А. М. 232, 248, 253, 255
 Кошелева Н. В. 234
 Кошкина А. А. 184
 Кошман В. Е. 192
 Кравацкий Ю. В. 356
 Кравченко С. В. 275
 Крамкова В. К. 158
 Красикова А. В. 126
 Красильникова А. А. 294
 Краснобаева Л. А. 320
 Краснов В. С. 178, 212
 Красновский А. А. 27, 389
 Красняков И. В. 301
 Кратасюк В. А. 369, 416
 Крестинин Р. Р. 139
 Крестинина О. В. 139
 Крещенко Н. Д. 286
 Кривицкая А. В. 88
 Критченков И. С. 388
 Крицкая К. А. 193
 Крицкий М. С. 376, 380
 Кротенко Н. М. 47
 Круглова Л. В. 379
 Кружаев А. 253
 Крупенина Н. А. 378
 Крупянский Ю. Ф. 8, 283, 305
 Крутецкая З. И. 169, 174
 Крутецкая Н. И. 169, 174
 Крутских А. С. 392
 Кручинин И. В. 302
 Кручинин Н. Ю. 98
 Кручинин С. Е. 290
 Кручинина А. П. 171, 235
 Крылов Н. А. 9
 Крылова А. В. 149, 208
 Крюкова Е. В. 363
 Крюкова Е. А. 400
 Кубасов И. В. 160
 Кубасова Н. 256
 Кудряшева Н. С. 366
 Кузекова А. А. 8
 Кузнецов А. В. 293, 386
 Кузнецов Г. В. 286
 Кузнецов М. Б. 266, 323
 Кузнецова А. В. 309
 Кузнецова Д. В. 136
 Кузнецова Д. С. 340
 Кузнецова Е. А. 155
 Кузьмичев С. А. 273, 313
 Кукарских Г. П. 369
 Кулаков М. П. 285
 Кулешова Т. Э. 225
 Кулешова Ю. Д. 130, 195
 Куликова Т. В. 126
 Куликовская Н. В. 171
 Кумейко В. В. 175, 294
 Кундалевич А. А. 109, 311
 Купцова А. М. 96, 133, 154
 Курбанов Р. Х. 118
 Курганова Э. А. 187
 Курков В. А. 401
 Курников А. А. 391
 Кусова А. М. 65, 123
 Кутова О. М. 144
 Кучеренко М. Г. 98
 Кучумов А. Г. 23, 228, 281
 Куянова Ю. О. 299
 Лавлинская М. С. 58, 92, 584
 Лавриненко И. А. 72
 Лагунов Т. А. 126
 Ладейнова М. М. 136
 Ланских Д. В. 294
 Лаптева Ю. С. 33
 Ларюшкин Д. П. 27, 193
 Лахно В. Д. 14
 Лачинова Д. А. 284
 Лебедева Е. А. 196
 Левашов П. А. 36, 37
 Левицкий Д. 256
 Левченко И. Н. 74, 300
 Леденёва О. Р. 128
 Леконцева Н. В. 35
 Леонова О. Г. 129
 Леонтьев Д. В. 141
 Лермонтова С. А. 410, 411
 Ли Б. 200
 Ли Х. 321
 Лисина Т. Н. 384, 394
 Лисица А. Е. 112, 416
 Литвинов Н. В. 39
 Литус Е. А. 36
 Лихачев И. В. 82
 Лиходзиевская М. В. 62
 Лобышев В. И. 16
 Ловягина Е. Р. 382, 397
 Лойко Н. Г. 283
 Локтионова Ю. И. 407
 Локтюшкин А. В. 382, 397
 Ломакина Г. Ю. 155, 365
 Ломова М. В. 414
 Луговцов А. Е. 381
 Лукашев А. Н. 276
 Лукашев Е. П. 22
 Лукин А. Ю. 400
 Лукьянова Л. Д. 203
 Лунин В. Г. 101
 Лунин С. М. 8
 Львова И. Д. 227, 251
 Львова М. Н. 184
 Любарец Е. И. 386
 Любителей А. В. 55, 385
 Любова Т. С. 410
 Лясота О. М. 73

- Мавлиев Ф. А. 230, 243
 Май Л. 200
 Майорова А. А. 294
 Макаров А. А. 129, 130, 195
 Макарова С. В. 278
 Макеева И. Ю. 362
 Маковик И. Н. 371
 Макринский К. И. 374
 Максимов Г. В. 69
 Максимов Е. Г. 22, 403
 Максимов М. К. 381
 Малеева Ю. В. 380
 Малкин В. М. 66, 127
 Малыхина Н. В. 58, 60
 Мальцев В. П. 182
 Малюченко Н. В. 55
 Мамаева Н. 111
 Маматкулов К. М. 413
 Мамчур А. А. 44, 51, 95
 Мансур Н. 136, 149, 150
 Маркелова Н. Ю. 78
 Марковский А. Н. 283
 Мартиросян Д. Ю. 5, 406
 Мартынюк В. А. 188
 Марченков В. В. 33, 35
 Маслякова Г. Н. 395
 Масулис И. С. 177
 Матвеева Т. А. 36, 53
 Матюшенко А. 256
 Мачулин А. В. 275
 Мачулин А. М. 142
 Машковцева Е. В. 223
 Машукова О. В. 367
 Медведков О. И. 389
 Медвинский А. Б. 21
 Мельник Б. М. 91
 Мельник Т. Н. 112
 Мельникова Е. В. 195
 Мельникова Д. Л. 168
 Мельникова М. С. 22
 Мельницкая А. В. 174
 Мещерякова А. А. 264
 Микаелян М. С. 61
 Миленина Л. С. 169
 Мильчевская В. Ю. 356
 Мильчевский Ю. В. 356
 Минаев И. С. 21
 Минаев Н. С. 21
 Минасбекян М. Л. 145, 355
 Минкевич М. М. 85, 148
 Миняйло Я. Ю. 235
 Мирзоев Т. М. 239, 254
 Миронова Г. Д. 165, 203, 218
 Митина А. В. 330, 335
 Митић Н. М. 262, 270
 Митькевич В. А. 52, 129, 195
 Митьковский Д. Е. 286
 Михайлина А. О. 35
 Михеева И. Б. 218
 Михрякова П. П. 248
 Михтанюк С. Е. 296, 308
 Мищенко А. 200
 Мищенко Д. В. 158
 Мовсесян З. О. 113
 Мовсесян С. О. 286
 Можаяева В. А. 393
 Можеров А. М. 340
 Моисеенко А. В. 50
 Молотков Т. П. 268
 Молотковский Р. Ю. 85, 148
 Моренков О. С. 249, 260
 Морозова Г. М. 304
 Морошкина Е. Б. 42
 Мосолов Л. Т. 136, 154
 Мосунов А. А. 164
 Мочалова Н. В. 286
 Мубаракшина Э. К. 8
 Муравьев А. В. 381
 Муранова Л. Н. 157, 183
 Мячина Т. А. 232, 237, 248
 Наволокин Н. А. 395, 414
 Нагаев Е. И. 36, 53
 Надеева Е. М. 372
 Надеждин К. Д. 46
 Наджафова Г. З. 70
 Надточенко В. А. 5, 396, 402, 404, 406
 Назаренко А. С. 239, 242, 298
 Найдов И. А. 375, 398
 Наймарк О. Б. 184, 257
 Наразина Д. А. 58, 60
 Нарциссов Я. Р. 223, 279, 307, 336, 346
 Насартдинова Р. Р. 186, 207
 Настаси М. Р. 224
 Наумов А. А. 65
 Наумова Е. В. 398
 Неверов К. В. 380
 Неврова О. В. 149, 170
 Неелов И. М. 296, 308
 Некрасов А. Н. 34
 Некрасов В. М. 182
 Некрасова А. А. 144
 Некрасова О. В. 363
 Некрасова Т. Н. 125
 Немашкалова Е. Л. 36, 43
 Немировская Т. Л. 252, 258
 Немцева Е. В. 112, 416
 Нестеров С. В. 222
 Нечипоренко А. П. 75
 Нечипуренко Ю. Д. 72, 100, 310
 Нешев Н. И. 167
 Никитина Л. В. 238
 Никитюк А. С. 184, 257
 Николаев Т. И. 186
 Никонов О. С. 35
 Нинкина Н. Н. 407
 Новаковская М. В. 41
 Новикова Е. В. 160
 Новодережкин В. И. 190
 Новожилова Т. С. 276
 Новоселецкий В. Н. 111, 200
 Новоселова Е. Г. 8
 Новоселова Т. В. 8
 Нокс П. П. 370
 Нуриева Н. И. 21
 Нурисламов А. Р. 126
 Обухов Ю. Н. 380
 Овчинникова Ю. И. 349
 Одиноква И. В. 139
 Озолинь О. Н. 78
 Олейник Г. А. 47, 116
 Олькин С. Е. 95
 Онхонова Г. С. 95
 Орлов Н. А. 363
 Орлов Ю. Л. 268, 294, 321, 330, 335, 345, 351
 Орлов Ю. О. 262
 Орлова А. Г. 391
 Орлова Н. Г. 335
 Осетрина Д. А. 65, 122
 Осинникова Д. Н. 42
 Осипов А. А. 26, 49
 Осипов А. Н. 55, 89, 97, 202
 Островский М. А. 396, 402, 404
 Остроумова О. С. 159, 180, 187, 188, 189, 193
 Осыченко А. А. 5, 406
 Охрименко И. С. 29, 155, 222
 Павлик Л. Л. 203
 Павлова К. И. 42
 Пайметьева Д. С. 60, 92, 562
 Пак М. А. 318
 Пак С. Я. 277
 Панкова С. М. 58, 60, 92
 Панова Г. Г. 225
 Пантина Р. А. 57, 80, 121
 Парамонова Е. В. 128, 278
 Парсаданян М. А. 40, 54, 113
 Парфенюк С. Б. 8
 Паршин Д. В. 299
 Паршина Е. Ю. 69, 139

- Пастон С. В. 117
 Пасхин М. О. 413
 Пашков А. 200
 Пащенко В. З. 370, 383
 Пеньков Н. В. 18, 132
 Перетокина (Ивлиева) И. В. 264
 Першин С. М. 17
 Пескова Н. Н. 411
 Пестов Н. А. 30
 Петерс Г. С. 105
 Петренко В. С. 249, 260
 Петрова А. Ф. 168
 Петрова Е. В. 369
 Петровская А. В. 129
 Петровская Л. Е. 22, 400, 404
 Петросян Н. Г. 54
 Петрушанко И. Ю. 12, 129, 130, 195
 Печёрина А. А. 136
 Пиль Н. Е. 281
 Пинигин К. В. 173
 Пищальников Р. Ю. 329, 401, 402
 Пластун И. Л. 65, 280
 Плеханов В. И. 411
 Плотникова Л. В. 75
 Плюснина Т. Ю. 290, 337, 344, 350
 Победоносцев Р. В. 413
 Погонялова М. Ю. 155, 216
 Погосян Г. А. 61
 Погосян С. И. 21
 Подгорник Р. 292, 325, 348
 Полуэктов Ю. М. 130, 195
 Поляков Н. Б. 101
 Поляков Н. Э. 144, 192
 Поляничко А. М. 42, 115, 119
 Пономаренко В. И. 339
 Попов Д. Ю. 155, 216
 Попова Л. Б. 178
 Попова М. М. 124
 Поройков В. В. 15
 Поспелов А. Д. 144, 150
 Постникова Г. Б. 46
 Потапов А. Ю. 392
 Преображенская Е. В. 78
 Преснякова В. П. 234
 Приезжев А. В. 25, 381
 Приходько И. В. 206
 Проскуряков И. И. 375
 Прудникова Е. Ю. 95
 Психа Б. Л. 167
 Пузина Т. И. 362
 Пушин Д. М. 359
 Пшемьский М. А. 199
 Пьянков С. А. 95
 Рагульская М. В. 331
 Разживин А. П. 401
 Ракишева И. О. 228
 Рамазанов Р. Р. 32
 Рапопорт В. Л. 127
 Растрига Н. В. 37
 Ратников В. Д. 90
 Рашкаускайте В. А. 199
 Реверук З. В. 45
 Редько Ю. А. 58, 60, 92
 Рейнах П. С. 179
 Реутов В. П. 353
 Ризниченко Г. Ю. 79, 337, 344, 383, 488
 Рогачевская О. А. 198, 390
 Рогов А. В. 289
 Родимова С. А. 340
 Рожков С. П. 90, 239
 Рожкова Н. Н. 90
 Рокицкая Т. И. 143, 190, 217
 Романов А. Н. 52
 Россомехин Р. А. 157
 Рошаль Д. С. 327
 Рошаль С. Б. 292, 325, 327, 348
 Рубашкин А. А. 179, 180
 Рубин А. Б. 6, 86, 337, 344, 370, 378, 383
 Руденко В. М. 271
 Руденко Н. Н. 372, 398
 Руннова А. Е. 265
 Русаков А. В. 21
 Рыжиков А. Б. 95
 Рябов Е. И. 41
 Рябова Н. А. 33
 Ряшко Л. Б. 316
 Савина Е. А. 338
 Савицкий А. П. 7
 Савочкина Т. Е. 50
 Садовский М. Г. 342, 345
 Сазонова Е. 255
 Сакович В. В. 345
 Салихова Т. 359
 Сальников В. В. 114
 Самарцев В. Н. 211
 Самусев И. Г. 109
 Самченко А. А. 94
 Самыгина В. Р. 105
 Сарангова А. Б. 360
 Саримов Р. М. 53, 344, 393
 Сафинова А. Я. 400
 Сафронова В. Г. 194
 Свекло Л. С. 39
 Светлова Ю. И. 104
 Свидлов А. А. 73, 114, 231
 Седов И. А. 282
 Секретарева У. С. 412
 Селютина О. Ю. 144, 192
 Семенов А. Ю. 5
 Семенова А. А. 211
 Семенова М. А. 69
 Семин Б. К. 382, 397
 Сёмин Ф. А. 357
 Сенашова М. Ю. 342
 Сенчихин И. Н. 148
 Сергеева И. А. 31
 Сергеева К. В. 227, 238, 251
 Сергеева Т. О. 322, 341
 Серегин А. А. 274
 Серов Д. А. 36, 162
 Сивожелезов В. С. 46
 Сидорова Л. П. 141
 Силаков М. И. 367
 Силецкий С. А. 218
 Симакин А. В. 36, 53
 Симонова Р. А. 232, 237, 248
 Симонян А. О. 169
 Сингх-Пальчевская Л. 355
 Сирота Н. П. 191
 Сирюк Ю. А. 326
 Ситдилов Ф. Г. 197
 Ситдилова Г. Ф. 197
 Ситникова В. Е. 75
 Ситницкий А. Э. 123
 Скарга Ю. Ю. 249, 260
 Скворцова П. В. 118
 Скитова Е. Н. 259
 Скоробогатов М. С. 78
 Скуратовская Е. Н. 386
 Слотвицкий М. М. 341
 Случанко Н. Н. 22
 Смаглий Л. В. 146, 199
 Смирнов В. Ю. 309
 Смирнов С. А. 37
 Смирнова Л. П. 47, 102, 274
 Смирнова О. М. 69
 Смитиенко О. А. 404
 Смыслов Р. Ю. 125
 Соболев А. С. 10
 Соколов А. В. 146
 Соколов В. С. 163, 172, 374
 Соколов П. А. 32, 50, 81
 Соколова Е. М. 167
 Соколова Л. О. 39
 Соколова О. С. 50, 111, 200
 Соловьева Э. Ю. 137, 176
 Сорокин А. В. 58, 60, 92

- Сорокин В. В. 264
 Сорокина Д. М. 197
 Сорокина Е. Г. 353
 Сотникова Л. Д. 139
 Старинец В. С. 162, 218
 Старкова Т. Ю. 115
 Стародубов А. С. 22
 Старостенко Д. А. 184
 Стельмашук О. А. 166
 Степанков М. С. 151
 Степанов А. В. 160
 Степанов Г. О. 55, 202, 881, 954
 Степанова Л. В. 366
 Страховская М. Г. 86
 Стрелкова М. А. 129
 Стрельников И. А. 29, 133
 Студитский В. М. 30, 33, 55, 385
 Ступникова А. В. 266
 Субочев П. В. 391
 Суглобов А. С. 293
 Суковатый Л. А. 112, 416
 Сулеймановна Е. М. 330
 Сумбатян Д. А. 146
 Сурин А. А. 275
 Сурков М. М. 95
 Сучков М. Ю. 89
 Сырчина М. С. 5
 Сысоев И. В. 284, 300, 314, 330, 339, 347, 354
 Сысоева М. В. 314, 339, 347, 354
 Тагильцев И. И. 299
 Таранов О. С. 95
 Тарасова Д. В. 62
 Тарасова Е. В. 246
 Ташкин В. Ю. 172
 Твердислов В. А. 24
 Тверской А. М. 129
 Тевонян Л. Л. 356
 Телегина Т. А. 376
 Темных А. В. 367
 Теплов А. Ю. 245
 Теплов И. Ю. 27
 Теренина М. С. 307
 Теренина Н. Б. 286
 Терентьев В. В. 375
 Терентюк Г. С. 395
 Терешкин Э. В. 283, 305
 Терешкина К. Б. 283, 305
 Тимашёв П. С. 144, 234
 Тимин А. С. 405
 Тимофеева Л. Б. 144
 Титов А. А. 5
 Титова К. 253
 Тихонов Д. А. 21
 Тихонова И. В. 194
 Тодоренко Д. А. 350
 Толстова А. П. 129
 Томилин А. Н. 115
 Торхов Н. А. 164
 Тотумачева Э. В. 146
 Точило У. А. 406
 Трашков А. П. 146
 Трифонова Т. С. 50
 Трофимов Ю. А. 9, 76
 Трубицына Т. А. 147
 Трунилина М. В. 33
 Трушина Д. Б. 144, 150
 Тулина Т. А. 66
 Туманян В. Г. 338
 Туркина В. А. 294
 Туртикова О. В. 227, 239, 251, 259
 Тучин В. В. 395
 Тыганов С. А. 227, 238, 251, 259
 Тюлин А. А. 189
 Тяпкина О. В. 157
 Угарова Н. Н. 365
 Уколов Р. В. 265
 Ульянов Е. В. 99
 Умеренков Д. А. 381
 Уродкова Е. К. 148, 374
 Урюпина Т. А. 233
 Устенко Е. В. 101
 Фазлеев Н. Ш. 246
 Файзуллин Д. А. 114
 Файзуллина Э. А. 268
 Фарниев В. М. 175
 Фасхутдинов Л. И. 96, 133
 Фатуллаев Э. И. 308
 Федин А. И. 137, 176
 Федоренко К. К. 327
 Федоров В. А. 6, 57, 86
 Федорова Н. Д. 57, 80, 121, 146
 Федотова Е. В. 117
 Федотова И. В. 84
 Федотова М. В. 290
 Федянин А. О. 229, 239, 243
 Фельдман Т. Б. 404
 Феофанов А. В. 33, 55, 363, 385
 Фефилова А. С. 107
 Филатов И. Е. 50
 Филатов М. В. 146
 Филин П. Д. 280
 Филиппов Ю. А. 160
 Финкельштейн А. В. 91, 291
 Фирсов А. М. 153, 212
 Фишман В. С. 126
 Фомич М. А. 153
 фон Рюлинг Ф. 378
 Фонин А. В. 107
 Форте Е. 224
 Фрисман Е. Я. 285
 Фролова Ш. Р. 152, 158, 209
 Фурсова П. В. 290
 Хавронюк И. С. 386
 Хазипов Р. Н. 307
 Хайбрахманова Д. Р. 282
 Хайлова Л. С. 178, 212, 217
 Хайретдинова А. Р. 35
 Хайруллин А. Е. 245
 Хайрутдинов Б. И. 118
 Халиуллина А. В. 168
 Харитоновна Ю. В. 172
 Хисамиева Л. И. 96
 Хитева Т. В. 415
 Хлебцов Б. Н. 395
 Хлебцов Н. Г. 395
 Хлопков А. Д. 409
 Хмелевская Т. Н. 392
 Хмиль Н. В. 203
 Ходонов А. А. 400
 Холина Е. Г. 57, 845
 Холявка М. Г. 58, 60, 92
 Хохлов А. А. 198
 Хохлова А. Д. 232, 237, 248
 Хоченков Д. А. 391
 Хоченкова Ю. А. 391
 Хренов М. О. 8
 Хренова М. Г. 7, 88
 Хрущев С. С. 6, 86, 290, 337, 344, 350
 Цай Г. 321
 Цатурян А. К. 256, 357
 Цвеляя В. А. 341
 Цветков В. Б. 44, 104
 Цейтлер Т. А. 141
 Цема Л. Г. 394
 Цимоха А. С. 115
 Цораев Г. В. 22
 Цыбров Ф. М. 222
 Цыганков А. А. 22, 408
 Чапров К. Д. 407
 Чеканов А. В. 137, 176
 Чен В. Л. 321
 Чен М. 351
 Червицов Р. Н. 350
 Черенков И. А. 41
 Черепанов Д. А. 5, 404
 Черепушкин С. А. 50

- Черкасова Е. И. 144
 Черкашин А. А. 378
 Черкашин А. П. 198
 Черноносков А. А. 47, 116
 Черткова Р. В. 69
 Чершинцева Н. Н. 239, 242, 246, 298
 Чесалин Д. Д. 329, 401
 Чжан Х. 200
 Чжао С. 321
 Чижов И. В. 222
 Чиргадзе Ю. Н. 82
 Чистяков Д. С. 276
 Чистякова Ю. А. 290
 Чихиржина Е. В. 115, 119
 Чугунов А. О. 76
 Чуев Г. Н. 290
 Чупахин А. П. 299
 Шавкунов К. С. 78
 Шавыкин О. В. 296, 308
 Шагинян М. А. 54, 61
 Шадрин И. А. 141
 Шайдуллов И. Ф. 197
 Шайтан А. К. 341, 355, 516
 Шайтан К. В. 4
 Шайхутдинова Э. Р. 194
 Шакиров Р. Р. 96, 182
 Шамратова В. Г. 205
 Шапигузов С. Ю. 378
 Шарапов М. Г. 8
 Шарко О. Л. 153
 Шарло К. А. 227, 238, 251
 Шастина Н. С. 137, 176
 Шатица М. П. 67
 Швед Н. А. 175
 Шевелёва М. П. 36, 43
 Шевелева О. Ю. 268
 Шейнман М. 272
 Шекунов Е. В. 187
 Шелаев И. В. 5, 404
 Шелепова Е. А. 192
 Шенкман Б. 239
 Шенкман Б. С. 227, 238, 251, 252, 258, 259
 Шенкман Б. Ш. 254
 Шерстнева О. Н. 387
 Шестакова Л. Н. 410, 411
 Шеховцова Е. А. 46
 Шилова Е. В. 78
 Шилягина Н. Ю. 410, 411
 Шипелова А. В. 137
 Ширманова М. В. 388
 Шитикова Е. Ю. 155, 213
 Шихаб А. В. 157
 Шихалиев Х. С. 392
 Шманай В. В. 153
 Шмелев М. Е. 175
 Шолгин Е. С. 361, 384, 394
 Штыкова Э. В. 124
 Шукуров Р. Р. 36
 Шутиков А. А. 413
 Шутов А. В. 299
 Щелконогов В. А. 137, 176
 Щепинов М. С. 153
 Щепкин Д. В. 232, 237, 248, 253, 255, 256
 Щербakov К. А. 76
 Щербань-Филимошкин В. А. 296
 Щеславский В. И. 388
 Щечкин И. Д. 340
 Эрнандес-Касерес Х. 72, 310
 Юльметов А. Р. 65, 122
 Юркова Д. О. 128
 Юрченко В. 276
 Юсипович А. И. 139
 Ягужинский Л. С. 222
 Якимов С. А. 363
 Яковенко Л. В. 302
 Яковишин Л. А. 90
 Яковлев Р. Ю. 280
 Яковлева М. А. 396, 402, 404
 Яковлева О. В. 157
 Якушевич Л. В. 320
 Ямпольская Д. 256
 Янина И. Ю. 414
 Яныкин Д. В. 413
 Ярошевич И. А. 22, 44, 51, 95
 Ястребова Е. С. 182
 Яфарова Г. Г. 229
 Яшина Е. Г. 57, 80, 121
 Hernandez-Caceres J. 13
 Rodríguez-Labrada R. 13
 Sharma S. M. 318
 Velazquez-Perez L. 13

Высокое качество стало доступным

OPTIKA
MICROSCOPES
I T A L Y



Микроскопы серии B-500, OPTIKA (Италия)

Характеристики оптической системы, цифровой камеры и сенсорного дисплея позволяют наблюдать за образцами с точностью 4К, которая до недавнего времени была невообразимой.

Stormoff®

МО, г. Красногорск, б-р Строителей, 4/1
+7 495 780 07 95, 495 956 05 57
lab@stormoff.ru, www.stormoff.ru