

Министерство образования Республики Беларусь  
Белорусский государственный университет  
Национальная академия наук Беларуси  
Институт биофизики и клеточной инженерии  
Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований

# **МОЛЕКУЛЯРНЫЕ, МЕМБРАННЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОСИСТЕМ**

**МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ**

**ДВЕНАДЦАТЫЙ СЪЕЗД  
БЕЛОРУССКОГО ОБЩЕСТВЕННОГО ОБЪЕДИНЕНИЯ  
ФОТОБИОЛОГОВ И БИОФИЗИКОВ  
Минск, 28—30 июня 2016 г.**

**СБОРНИК СТАТЕЙ**  
В двух частях

Часть 1

Минск  
Издательский центр БГУ  
2016

УДК 57(06)  
ББК 28я431  
М75

Редакционная коллегия:

академик НАН Беларуси доктор биологических наук *И. Д. Волотовский*;  
академик НАН Беларуси доктор биологических наук *С. Н. Черенкевич*;  
член-корреспондент НАН Беларуси доктор биологических наук  
*Е. И. Слобожанина*;  
член-корреспондент НАН Беларуси доктор биологических наук  
*Н. В. Шальго*;  
доктор биологических наук *В. Г. Вересов*;  
доктор биологических наук *Н. Г. Аверина*;  
кандидат биологических наук *В. П. Зорин*;  
кандидат биологических наук *Т. Е. Зорина*;  
кандидат физико-математических наук *А. И. Хмельницкий*;  
кандидат технических наук *А. И. Дранеза*

Организаторы:

Белорусский государственный университет;  
Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси;  
Белорусское общественное объединение фотобиологов и биофизиков

Финансовая поддержка:

Национальная академия наук Беларуси;  
Белорусский государственный университет;  
Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси;  
Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований

**Молекулярные**, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Междунар. науч. конф. ; Двенадцатый съезд Белорус. обществ. объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 28—30 июня 2016 г. : сб. ст. : в 2 ч. Ч. 1 / редкол. : И. Д. Волотовский [и др.]. — Минск : Изд. центр БГУ, 2016. — 415 с.  
ISBN 978-985-553-355-0.

В сборник включены материалы Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» и Двенадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков.

Издание представляет интерес для специалистов в области биофизики, фотобиологии, биоинженерии, биохимии, молекулярной и клеточной биофизики, медицины.

УДК 57(06)  
ББК 28я431

ISBN 978-985-553-355-0 (ч. 1)  
ISBN 978-985-553-354-3

© Оформление. РУП «Издательский центр БГУ», 2016

## СОДЕРЖАНИЕ

### ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

<b>Ванин А.Ф.</b> ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛ-СОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ КАК «РАБОЧАЯ ФОРМА» ОДНОГО ИЗ УНИВЕРСАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ – МОНООКСИДА АЗОТА.....	16
<b>Вересов В.Г.</b> МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ АПОПТОЗ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i> : VDAS2 И КОМПЛЕКС ТОМ ВМЕСТО КАРДИОЛИПИНА .....	20
<b>Зенькевич Э.И., Старухин А.С., фон Борцисковски К.</b> СПЕКТРОСКОПИЯ ОДИНОЧНЫХ НАНООБЪЕКТОВ: ОТ МОЛЕКУЛ К БИОСТРУКТУРАМ .....	24
<b>Твердислов В.А.</b> МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КАК ПЕРИОДИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ЗНАКОПЕРЕМЕННЫХ ХИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР .....	28

### МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

<b>Dudko A.V., Davidovskii A.I., Veresov V.G.</b> ATOMIC-LEVEL MODELING OF THE HUMAN TOM COMPLEX 3D-STRUCTURE .....	31
<b>Dudko A.V., Davidovskii A.I., Veresov V.G.</b> INTEGRATIVE MODEL OF THE YEAST TOM COMPLEX ATOMIC-LEVEL 3D-STRUCTURE .....	34
<b>Ihnatsyey-Kachan A., Ionov M., Majoral J.-P., Bryszewska M.</b> ZETA SIZE AND CHARGE EVALUATION OF COMPLEXES BASED ON PHOSPHORUS DENDRIMERS AND PLASMA REGULATORY PROTEINS.....	37
<b>Veresov V.G.</b> CORRELATING ROSETTADOCK BINDING SCORE WITH PROTEIN-PROTEIN BINDING AFFINITY.....	38
<b>Yakavets I.V., Yankovsky I.V., Tihonov K.D., Bolotina L.N., Zorin V.P.,</b> DETERMINATION OF ARYL-PORPHYRINS BINDING CONSTANTS TO BIOLOGICAL STRUCTURES BY INDIRECT SPECTRAL APPROACH .....	41
<b>Абашкин В. М., Щербин Д. Г., Ионов М., Брышевская М.</b> ВЛИЯНИЕ ПАМАМ–ДЕНДРИМЕРОВ НА ТЕМПЕРАТУРО-ИНДУЦИРОВАННУЮ ДЕНАТУРАЦИЮ БЕЛКОВ.....	44
<b>Андрианов В.М., Анищенко И.В., Королевич М.В.</b> УСТАНОВЛЕНИЕ СВЯЗИ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ БОКОВОЙ ЦЕПИ БРАССИНОСТЕРОИДОВ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ МЕТОДАМИ КВАНТОВОЙ ХИМИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ .....	46

<b>Арабей С.М., Павич Т.А. КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ СОСТОЯНИЯ (-)-СПАРТЕИНА.....</b>	<b>49</b>
<b>Вардеванян П.О., Антонян А.П., Саакян В.Г. СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКСОВ НЕКОТОРЫХ ИНТЕРКАЛЯТОРОВ С ДНК.....</b>	<b>52</b>
<b>Вардеванян П.О., Парсаданян М.А., Шагинян М.А., Микаелян М.С. ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МИЛЛИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА НА КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА .....</b>	<b>55</b>
<b>Васильева А.Д., Бычкова А.В., Чикунова А.П., Данилова Т.А., Щеголихин А.Н., Леонова В.Б., Костанова Е.А., Бирюкова М.И., Кононихин А.С., Бугрова А.Е., Николаев Е.Н., Розенфельд М.А. ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ПЛАЗМЕННЫХ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ.....</b>	<b>58</b>
<b>Власова И.И., Смолина Н.В., Федоркова М.В., Мацкевич В.А., Михальчик Е.В. ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕМ-СОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ.....</b>	<b>61</b>
<b>Галюк Е.Н., Чанг Ч.-Л., Ринейская О.Н., Ландо Д.Ю. СРАВНЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ДНК ПРОМЕЖУТОЧНЫХ И КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ МОДИФИКАЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ПРЕПАРАТОМ ЦИСПЛАТИН И ЕГО НЕАКТИВНЫМ АНАЛОГОМ ТРАНСПЛАТИНОМ.....</b>	<b>64</b>
<b>Горобец М.Г., Бычкова А.В., Сульимова Н.Б., Константинова М.Л., Леонова В.Б., Розенфельд М.А. СИСТЕМА ФЕНТОНА И ОЗОН В ИНДУЦИРОВАННОМ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОМ ОКИСЛЕНИИ АЛЬБУМИНА И ФИБРИНОГЕНА .....</b>	<b>67</b>
<b>Горюнов А.С., Рожков С.П., Суханова Г.А. ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКА С ШУНГИТОВЫМ УГЛЕРОДОМ В ВОДНЫХ НАНОДИСПЕРСИЯХ.....</b>	<b>70</b>
<b>Гуринович В.В., Воробей А.В. УСИЛЕНИЕ ГАЛОГЕНМЕТАНАМИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЕМЫХ ТРИПТОФАНОМ ПОВРЕЖДЕНИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ .....</b>	<b>73</b>
<b>Дорошкевич А.С., Сотникова В.В., Беридзе Р.М., Поддубный А.А., Игнатенко В.А., Лысенкова А.В., Кузнецов Б.К. ОБРАЗОВАНИЕ ТБК-АКТИВНЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ СПИРТОВ, САХАРОВ И РАСТВОРА Na-СОЛИ ГЕПАРИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА .....</b>	<b>76</b>

<b>Жарникова Е.С., Пархоц М.В., Джагаров Б.М.</b> СПОНТАННОЕ ИСПУСКАНИЕ СВЕТА МОЛЕКУЛЯРНЫМ СИНГЛЕТНЫМ КИСЛОРОДОМ В КОНДЕНСИРОВАННЫХ СРЕДАХ .....	79
<b>Жулябина О.А., Твердислов В.А.</b> ХИРАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ.....	83
<b>Заикин А.В., Попцова М.С.</b> РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ И ВТОРИЧНЫЕ СТРУКТУРЫ ДНК.....	86
<b>Зенькевич Э.И., Кнюкшто В.Н., Ступак А.П., Ларкина Е.А.</b> МЕХАНИЗМЫ РЕЛАКСАЦИИ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ В КОВАЛЕНТНО-СВЯЗАННОЙ ТРИАДЕ «ТРИПТОФАН-ПОРФИРИН-ХИНОН» .....	89
<b>Зенькевич Э.И., Сакевич Л.А., Степанов М.А., Килин Д.С.</b> КОНКУРЕНЦИЯ ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ И ЭЛЕКТРОНА В САМОСОБИРАЮЩИХСЯ ТРИАДАХ ПОРФИРИНОВ (ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ).....	92
<b>Капустин М.А., Чубарова А.С.</b> ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КУРКУМИНОИДОВ С НАТИВНЫМ И МОДИФИЦИРОВАННЫМ БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ .....	95
<b>Капустин М.А., Чубарова А.С.</b> ХЕЛАТИРОВАНИЕ ФЛАВОЛИГНАМАМИ ИЗ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ ДВУХВАЛЕНТНЫХ ИОНОВ КОБАЛЬТА И СВИНЦА .....	98
<b>Кашин И.А., Тузиков А.В., Андрианов А.М.</b> КОМПЬЮТЕРНЫЙ СКРИНИНГ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОНИКНОВЕНИЯ ВИЧ-1 – ПЕПТИДОМИМЕТИКОВ НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА 10E8.....	101
<b>Корноушенко Ю.В., Кисель М.А., Тузиков А.В., Андрианов А.М.</b> КОНСТРУИРОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ВИЧ-1 НА ОСНОВЕ ГЛИКОСФИНГОЛИПИДОВ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И ХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА.....	104
<b>Лабор С.А., Степура И.И., Смирнов В.Ю., Степура В.И.</b> ОКИСЛЕНИЕ ТИАМИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА.....	107
<b>Лабор С.А., Степура И.И., Смирнов В.Ю., Степура В.И., Янцевич А.В.</b> ОКИСЛЕНИЕ ТИАМИНА, КАТАЛИЗИРУЕМОЕ МЕТМИОГЛОБИНОМ И ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА, В ПРИСУТСТВИИ ПАРАЦЕТАМОЛА.....	110

<b>Лавыш А.В., Маскевич А.А., Луговский А.А., Воропай Е.С.</b> СТЕХИОМЕТРИЯ И СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТИОФЛАВИНА Т, ВСТРОЕННЫХ В АМИЛОИДНЫЕ ФИБРИЛЛЫ .....	114
<b>Лапина В.А., Бушук С.Б., Воробей А.В., Павич Т.А., Кальвинковская Ю.А., Бушук Б.А.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НАНОПЛАТФОРМЫ НАНОАЛМАЗ-ХЛ Е6-ФОЛИЕВАЯ КИСЛОТА .....	117
<b>Лепешкевич С.В., Гилевич С.Н., Пархоц М.В., Джагаров Б.М.</b> МИГРАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА И ОКСИДА УГЛЕРОДА ЧЕРЕЗ КСЕНОНОВЫЕ САЙТЫ В ИЗОЛИРОВАННЫХ ЦЕПЯХ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА .....	120
<b>Лепешкевич С.В., Пархоц М.В., Жарникова Е.С., Джагаров Б.М.</b> ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННАЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА ВНУТРИ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАНООБЪЕКТОВ .....	123
<b>Лозникова С.Ж., Суходола А.А., Тихомиров С.А., Milowska K., Majoral J.-P.</b> ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ДЕНДРИМЕРОВ НА СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВ .....	126
<b>Луговский А.А., Самцов М.П., Луговский А.П., Лавыш А.В., Маскевич А.А., Кузнецова И.М., Туроверов К.К.</b> СВОЙСТВА МОЛЕКУЛЯРНЫХ РОТОРОВ НА ОСНОВЕ НОВЫХ СТИРИЛОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ .....	129
<b>Малышко Е.В., Твердислов В.А.</b> СИММЕТРИИ В ИЕРАРХИЯХ ХИРАЛЬНЫХ БЛОКОВ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ .....	132
<b>Маскевич А.А., Лавыш А.В., Степура В.И., Кивач Л.Н., Маскевич С.А.</b> СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА «ТtТ – АМИЛОИДНЫЕ ФИБРИЛЛЫ». ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ГКР .....	135
<b>Михаловский И.С. , Бабодей В.Н., Пчельникова А.В.</b> ГЛИЦЕРИДНЫЕ ДИСПЕРСИИ С ПИРИДОКСИНОМ И ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТОЙ ДЛЯ ПРОДУКТОВ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО НАПРАВЛЕНИЯ .....	138
<b>Михаловский И.С., Матвейко Н.П., Самойлов М.В., Тарасевич В.А., Беясова Н.А., Мельникова Г.Б.</b> НАНОСТРУКТУРНЫЕ ДИСПЕРСНЫЕ СИСТЕМЫ ИЗ ТРИГЛИЦЕРИДОВ И АМИНОВ И ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ .....	141

<b>Небольсина А.А., Путинцева О.В., Артюхов В.Г. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ (254 НМ) НА РАЗМЕРЫ МОЛЕКУЛ ОКСИГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА.....</b>	<b>144</b>
<b>Некрасов А.Н., Анашкина А.А. НОВАЯ ПАРАДИГМА СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ. I. КАК ОРГАНИЗОВАНЫ БЕЛКОВЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАШИНЫ .....</b>	<b>146</b>
<b>Некрасов А.Н., Зинченко А.А. НОВАЯ ПАРАДИГМА СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ. II. ДИЗАЙН БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАШИН – ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА.....</b>	<b>150</b>
<b>Николаев Г.И., Кашин И.А., Тузиков А.В., Андрианов А.М. КОМПЬЮТЕРНЫЙ ДИЗАЙН ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ANTI-BИЧ АГЕНТОВ, БЛОКИРУЮЩИХ CD4-СВЯЗЫВАЮЩИЙ УЧАСТОК БЕЛКА GP120 ОБОЛОЧКИ ВИРУСА.....</b>	<b>154</b>
<b>Проценко К.О., Товстоган Ю.О., Бислюк Н.С., Лисовская А.Г., Шадыро О.И. ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ СФИНГОЛИПИДОВ И ИХ АНАЛОГОВ.....</b>	<b>157</b>
<b>Рожков С.П., Горюнов А.С. КОНКУРЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ СПИ-МЕЧЕНОЙ ЖИРНОЙ КИСЛОТЫ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ И КЛАСТЕРАМИ НАНОЧАСТИЦ ШУНГИТОВОГО УГЛЕРОДА.....</b>	<b>160</b>
<b>Сагун Е.И., Ивашин Н.В., Панарин А.Ю. ДИНАМИКА РЕЛАКСАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В МОЛЕКУЛАХ ПОРФИРИНОВ С ПРОСТРАНСТВЕННО ИСКАЖЕННЫМ И ЧАСТИЧНО ЭКРАНИРОВАННЫМ МАКРОЦИКЛОМ .....</b>	<b>163</b>
<b>Самович С.Н., Коваленко В.Н., Шадыро О.И. РАДИКАЛРЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА КУРКУМИНА И РОДСТВЕННЫХ ЕМУ СОЕДИНЕНИЙ .....</b>	<b>166</b>
<b>Самович С.Н., Куриленко А.А., Едимчева И.П., Шадыро О.И. ВЛИЯНИЕ БЕНЗОХИНОНОВ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ОКИСЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ.....</b>	<b>169</b>
<b>Свердлов Р.Л., Бараев В.А., Демидчик Т.А., Шадыро О.И. РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ УРАЦИЛА И ТИМИНА С <math>\alpha</math>-ГИДРОКСИЭТИЛЬНЫМИ РАДИКАЛАМИ .....</b>	<b>172</b>
<b>Свердлов Р.Л., Скребкова А.С., Лишик О.И., Кузовков П.В., Шадыро О.И. ВЛИЯНИЕ ИМИДАЗОЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ <math>\alpha</math>-ГИДРОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ УГЛЕРОДЦЕНТРИРОВАННЫХ РАДИКАЛОВ ЭТАНОЛА И ГЛИЦЕРО-1-ФОСФАТА .....</b>	<b>175</b>

<b>Серченя Т.С., Золотарь Н.Ф., Куприенко О.С., Свиридов О.В.</b> АНТИТЕЛА, МЕЧЕННЫЕ КОМПЛЕКСОНАТОМ ЕВРОПИЯ, И ФЛУОРИМЕТРИЯ С РАЗРЕШЕНИЕМ ВО ВРЕМЕНИ В ИММУНОАНАЛИЗЕ АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА .....	179
<b>Сладкова А.А., Лисовская А.Г., Едимечева И.П., Семенкова Г.Н., Шадыро О.И.</b> СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫХ МОЛЕКУЛ, СОДЕРЖАЩИХ $\alpha,\beta$ - АМИНОСПИРТОВЫЕ ГРУППИРОВКИ, ПРИ ДЕЙСТВИИ АКТИВНЫХ ФОРМ ХЛОРА.....	182
<b>Сладкова А.А., Лойко В.О., Трушко В.А., Шадыро О.И.</b> ВЛИЯНИЕ РЯДА ПРОИЗВОДНЫХ КУМАРИНА, БЕНЗОЙНОЙ И КОРИЧНОЙ КИСЛОТ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНУЮ ДЕСТРУКЦИЮ 1-АМИНО-2-ПРОПАНОЛА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ.....	185
<b>Толсторожев Г.Б., Бельков М.В., Шадыро О.И., Майер Г.В., Артюхов В.Я., Базыль О.К.</b> СПЕКТРОСКОПИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГИДРОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ БИОМОЛЕКУЛ.....	188
<b>Фалетров Я.В., Панада Я.В., Завадская О.А., Хорецкий М.С., Фролова Н.С., Рудая Е.В., Шкуматов В.М.</b> СИНТЕЗ И <i>IN SILICO</i> МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПРЕГНЕНОЛОНА С ЦИТОХРОМАМИ P450 CYP17A1 И CYP11A1.....	191
<b>Фалетров Я.В., Рудая Е.В., Клыковская Д.Г., Пирогова В.В., Завадская О.А., Хорецкий М.С., Фролова Н.С., Шкуматов В.М.</b> СИНТЕЗ И <i>IN SILICO</i> ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИПТОФАНА И ПРОЛИНА .....	194
<b>Юркова И.Л., Шендикова Е.Н.</b> ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ГИСТИДИН-СОДЕРЖАЩИХ ДИПЕПТИДОВ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ .....	197
<b>Юркова И.Л., Шендикова Е.Н.</b> ЦИСТЕИН- И ГИСТИДИН- СОДЕРЖАЩИЕ ДИПЕПТИДЫ В РЕГУЛИРОВАНИИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ФОСФОПРОИЗВОДНЫХ ГЛИЦЕРИНА.....	201
<b>МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА</b>	
<b>Apartsin E., Buyanova M., Gutiérrez C., Venyaminova A., F.J. de la Mata, R. Gómez.</b> siRNA COMPLEXATION BY CARBOSILANE DENDRON MICELLES.....	204

<b>Apartsin E., Gutiérrez C., Buyanova M., Venyaminova A, F.J. de la Mata, R. Gómez.</b> CARBON NANOTUBES DECORATED WITH CATIONIC CARBOSILANE DENDRONS AND THEIR HYBRIDS WITH siRNA.....	207
<b>Dzmitruk V., Ionov M., Gomez-Ramirez R., F.J. de la Mata, Bryszewska M.</b> COMBINATION OF ANTICANCER SHORT RNA COCKTAILS WITH NANOMATERIALS AS A NOVEL TOOL TO TREAT CANCER CELLS .....	210
<b>Marta Maroto-Díaz, Benelita T. Elie, Pilar Gymez-Sal, Jorge Pérez-Serrano, Rafael Gymez, Maria Contel, F. Javier de la Mata.</b> STUDY OF THE REACTIVITY OF CARBOSILANE METALLODENDRIMERS CONTAINING N-DONOR MONODENTATE OR N,N-CHELATING RUTHENIUM (II) ARENE COMPLEXES WITH DIFFERENTS BIOMOLECULES .....	213
<b>María Sánchez-Milla, Elena Fuentes Paniagua, Javier Sánchez-Nieves, Marek Maly, José Luis Copa Patiño, Juan Soliveri de Carranza, F. Javier de la Mata.</b> CATIONIC CARBOSILANE DENDRIERS: INFLUENCE OF DENDRIMER FRAMEWORK AND CATIONIC CHARGE ON BIOMEDICAL APPLICATIONS .....	215
<b>Michlewska S., Gapińska M., Szwed A., Pedziwiatr-Werbicka E., Maroto-Díaz M., Ionov M., Gomez-Ramirez R., F.J. de la Mata, Shcharbin D., Bryszewska M.</b> THE IMPACT OF RUTHENIUM TERMINATED CARBOSILANE DENDRIMERS ON CELL MEMBRANES.....	217
<b>Michlewska S., Szwed A., Gapińska M., Maroto-Díaz M., Ionov M., Gomez-Ramirez R., F.J. de la Mata, Shcharbin D., Gabryelak T., Bryszewska M.</b> CYTOTOXICITY OF ANTICANCER CARBOSILANE METALLODENDRIMERS IN HUMAN LEUKEMIA (HL-60) CELLS ...	220
<b>Pedziwiatr-Werbicka E., Peña-González C.E., Stasiak K., Ionov M., Abashkin V., Loznikova S., Gómez R., Sánchez-Nieves J., F.J. de la Mata, Bryszewska M.</b> TOXICITY OF GOLD NANOPARTICLES STABILIZED BY CATIONIC CARBOSILANE DENDRONS .....	223
<b>Tamashevski A.V., Harmaza Y.M., Viter R., Dubovskaya L.V., Slobozhanina E.I., Volotovskii I.D., Ubelis A.</b> RESEARCH OF ZINC OXIDE NANORODS APPLICATION AS A PLATFORM FOR IMMUNE BIOSENSORS DEVELOPMENT .....	226
<b>Yakovets I.V., Yankovsky I.V., Zorin V.P., Bolotine L.N.</b> DEVELOPMENT OF MODEL FOR AN INTRATUMORAL DISTRIBUTION OF mTHPC/CYCLODEXTRIN COMPLEXES.....	229

<b>Асимов М.М., Асимов Р.М., Батьян А.Н., Шиченко Н.А. ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ФОТОРЕДУКЦИЮ МЕТГЕМОГЛОБИНА КРОВИ .....</b>	<b>232</b>
<b>Базык-Новикова О.М., Ажгирей М.Д., Людчик Т.Б., Гольцев М.В. АНАЛИЗ И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТЕЙ ЭЛЕКТРО- И ЛАЗЕРОКОАГУЛЯЦИИ ПРИ ОПЕРАТИВНЫХ ВМЕШАТЕЛЬСТВАХ НА ОКОЛОУШНОЙ СЛЮННОЙ ЖЕЛЕЗЕ .....</b>	<b>235</b>
<b>Бакакина Ю.С., Тамкович С.Н., Тутанов О.С., Лактионов П.П., Дубовская Л.В., Вологовский И.Д. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОМА ЭКЗОСОМ, СВЯЗАННЫХ С ПОВЕРХНОСТЬЮ КЛЕТОК КРОВИ, ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....</b>	<b>238</b>
<b>Банний В.А., Игнатенко В.А. ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГОИНФОРМАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СВЧ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ И СПОСОБЫ ИХ ЗАЩИТЫ .....</b>	<b>241</b>
<b>Батай Л.Е., Ходасевич И.А. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРОВ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ КРОВИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ СПЕКТРАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ 2 МКМ .....</b>	<b>244</b>
<b>Башарина О.В., Коробкина И.А., Спахова Я.Г., Зеленецкая М.Г., Артюхов В.Г. ВЛИЯНИЕ УФ-СВЕТА НА АКТИВНОСТЬ ГЕКСОКИНАЗЫ И ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЛИМФОЦИТОВ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ.....</b>	<b>247</b>
<b>Белевич Е.И., Костин Д.Г., Рачкова Т.А., Костин Г.М., Слобожанина Е.И. АКТИВНОСТЬ КАСПАЗЫ-3 И ЭКСПОНИРОВАНИЕ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА В ЭРИТРОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ С АНЕМИЧЕСКИМИ СОСТОЯНИЯМИ .....</b>	<b>250</b>
<b>Венская Е.И., Скоробогатова А.С., Лукьяненко Л.М. ВЛИЯНИЕ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ ИЗ ЛИЗОЦИМА НА ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА. 253</b>	<b>253</b>
<b>Войченко Н.В., Улащик В.С., Вологовская А.В. ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ МАГНИТНОГО ПОЛЯ И ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АРТРИТЕ .....</b>	<b>256</b>
<b>Вчерашняя А.В., Мартинович И.В., Мартинович Г.Г., Шадыро О.И., Черенкевич С.Н. МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ДЕЙСТВИИ ХИНОНОВ .....</b>	<b>259</b>

<b>Головач Т.Н., Тарун Е.И., Кравцова О.И., Курченко В.П.</b> ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДОВ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ И ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДАМИ .....	263
<b>Дудылина А.Л., Иванова М.В., Шумаев К.Б., Рууге Э.К.</b> ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА И ГЕНЕРАЦИЯ ИМИ СУПЕРОКСИДНЫХ РАДИКАЛОВ: ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ КОЭНЗИМА Q <sub>10</sub> -H <sub>2</sub> .....	266
<b>Залеская Г.А., Ласкина О.В.</b> СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДЛИН ВОЛН .....	269
<b>Зорина Т.Е., Кравченко И.Е., Яковец И.В., Белевцев М.В., Балахар Гош, Свати Бисвоз, Зорин В.П.</b> ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ .....	273
<b>Зорина Т.Е., Яковец И.В., Янковский И.В., Кравченко И.Е., Шман Т.В., Белевцев М.В.</b> ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМОВ ФОТОПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ВВЕДЕНИЯ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ .....	276
<b>Зубрицкая Г.П., Гармаза Ю.М., Болодон В.Н., Кутько А.Г., Слобожанина Е.И.</b> ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ «АМИЛОИДНЫЕ СТРУКТУРЫ– БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ» .....	281
<b>Иванова С.В., Голенова И.А., Семенов Д.И.</b> АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ПСОРИАТИЧЕСКОМ, РЕВМАТОИДНОМ И РЕАКТИВНОМ АРТРИТАХ .....	284
<b>Каленчик С.И., Пархач Л.П., Талабаев М.В., Босякова Е.В., Титовец Э.П.</b> ФАЗОКОНТРАСТНАЯ МРТ В ДИАГНОСТИКЕ НАРУШЕНИЙ ВОДНОГО ОБМЕНА ПРИ ГИДРОЦЕФАЛИИ У ДЕТЕЙ .....	287
<b>Капустин М.А., Чубарова А.С., Якимович Е.А.</b> ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДОВ НА КАЧЕСТВО ПОЛУЧАЕМОГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО СЫРЬЯ .....	290
<b>Качалова Н.М., Завадская Т.С., Качалова Е.А., Свириденко Л.Ю.</b> ВЛИЯНИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОЛОНА И ЕГО НАНОКОМПОЗИТА НА ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ .....	293

<b>Книгавко В.Г., Батюк Л.В., Пономаренко Н.С., Човпан А.А. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ВЫЖИВАЕМОСТИ ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТОК ОПУХОЛЕЙ ОТ СТЕПЕНИ ИХ ОКСИГЕНАЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ФОТОННЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ .....</b>	<b>296</b>
<b>Козловский В.И., Зинчук В.В., Хлопицкий С. ХРОНИЧЕСКИЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС СПОСОБСТВУЕТ ПОВЫШЕННОЙ ПРОДУКЦИИ АДЕНОЗИНА ИЗ АДФ В КОРОНАРНОМ РУСЛЕ .....</b>	<b>300</b>
<b>Константинова Е.Э., Цапаева Н.Л., Мельникова Г.Б., Чирик С.А., Кужель Н.С., Миронова Е.В., Толстая Т.Н. ИЗМЕНЕНИЯ ВЯЗКО-УПРУГИХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ЭНДОВАСКУЛЯРНОЙ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ .....</b>	<b>303</b>
<b>Королик Е.В., Иванов А.А., Инсарова Н.И., Лещенко В.Г., Морозова О.М., Миланович Н.Ф., Усс А.Л. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОСНОВНЫХ ТРАНСПОРТНЫХ СИСТЕМ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ЛЕЙКЕМИИ .....</b>	<b>306</b>
<b>Костевич В.А., Соколов А.В., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. АПО-ФОРМА ЛАКТОФЕРРИНА ВЫЗЫВАЕТ СТАБИЛИЗАЦИЮ ГИПОКСИЯ-ИНДУЦИБЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ-1/2 АЛЬФА И NRF2 .....</b>	<b>309</b>
<b>Криволап А.А., Бакунович А.В., Бичан О.Д., Сидоренко В.Н., Лобанок Л.М., Буланова К.Я. КАЛЬЦИЕВЫЙ ГОМЕОСТАЗ В ТРОМБОЦИТАХ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ, ОСЛОЖНЕННОЙ ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ .....</b>	<b>311</b>
<b>Курченко В.П., Сушинская Н.В., Азарко И.И., Чудновская Е.В., Багманян И.А. ПОЛУЧЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕЛАНИНОВ ИЗ ТРУТОВЫХ ГРИБОВ .....</b>	<b>314</b>
<b>Ланкин В.З., Тихазе А.К. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КАРБЕНИЛОВ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЕ МОДИФИКАТОРЫ БИОАМИНОВ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И ДИАБЕТЕ .....</b>	<b>317</b>
<b>Лялина Е.М. БИОСОВМЕСТИМЫЕ КОМПОЗИТНЫЕ МАТРИЦЫ НА БАЗЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ .....</b>	<b>320</b>
<b>Максименко А.В., Ваваева А.В., Звягинцева М.А., Абрамов А.А., Лакомкин В.Л. ПОВЫШЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ОРГАНИЗМА КРЫС ПРИ ПРЕВЕНТИВНОМ И ЛЕЧЕБНОМ РЕЖИМЕ ВВЕДЕНИЯ БИФЕРМЕНТНОГО КОНЬЮГАТА СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА-ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТ-КАТАЛАЗА.....</b>	<b>323</b>

<b>Мансуров В.А., Казушик В.Л., Кубарко А.И., Лещенко В.Г., Шотт А.В. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭДЕМОМЕТРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОРОЭЛАСТИЧНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЖИВОЙ ТКАНИ .....</b>	<b>327</b>
<b>Мартинovich И.В., Дударков А.Н., Мартинovich Г.Г., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФЕНОЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ ГЕМОЛИЗЕ ЭРИТРОЦИТОВ .....</b>	<b>330</b>
<b>Мартинovich Г.Г., Мартинovich И.В., Вчерашняя А.В., Дударков А.Н., Черенкевич С.Н. РЕГУЛЯЦИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНЫХ ПРОЦЕССОВ КАК ОСНОВА РЕДОКС-БИОТЕХНОЛОГИЙ.....</b>	<b>333</b>
<b>Мартынова М.А., Бушмакина И.М., Карпович А.И., Красочко П.А., Шуканова Н.А., Борисовец Д.С., Князева Е.В. АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ИММУНОСТИМУЛЯТОРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ «ИММУНОВИР».....</b>	<b>336</b>
<b>Мурина М.А., Рошупкин Д.И., Серова Т.М., Сергиенко В.И. РЕАКЦИОННЫЕ СВОЙСТВА И АНТИАГРЕГАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ХЛОРАМИНА ТАУРИНА И ЕГО АНАЛОГОВ .....</b>	<b>339</b>
<b>Плавский В.Ю., Микулич А.В., Леусенко И.А., Третьякова А.И., Плавская Л.Г., Gao Jing, Xiong Daxi, Wu Xiaodong. ИННОВАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОТЕРАПИИ ГИПЕРБИЛИРУБИНЕМИИ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ.....</b>	<b>342</b>
<b>Рошупкин Д.И., Мурина М.А., Кондрашова К.В., Сергиенко В.И. ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА БЫКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ХЛОРАМИНА ТАУРИНА И ЕГО АНАЛОГОВ ...</b>	<b>346</b>
<b>Рууге Э.К. ЭЛЕКТРОННЫЙ ПАРАМАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС И СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ: ШЕСТЬДЕСЯТ ЛЕТ СПУСТЯ .....</b>	<b>349</b>
<b>Самцов М.П., Тарасов С.Д., Каплевский К.Н., Жердева В.В., Месерович И.Г., Ляшенко Л.С., Луговский А.П., Луговский А.А., Воропай Е.С., Савицкий А.П., Насек В.М., Петров П.Т. СВОЙСТВА НОВОГО НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ ДЛЯ ОПТИЧЕСКОЙ ТОМОГРАФИИ.....</b>	<b>351</b>
<b>Семенович Д.С., Лукиенко Е.П., Солонец К.В., Збирухович А.О., Смирнов А.А., Ястремская Н.С., Канунникова Н.П. ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ С НАКОПЛЕНИЕМ ЖЕЛЕЗА .....</b>	<b>354</b>

<b>Семенович Д.С., Омельянчик С.Н., Бородина Т.А., Шляхтун А.Г., Сатановская В.И., Кондыба Н.И., Гуринович В.А., Пронько П.С., Мойсеёнок А.Г. ВОЗМОЖНОСТИ МОДУЛИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА И ЕЕ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛА В ЦНС В УСЛОВИЯХ СЕКВЕСТИРОВАНИЯ УНИВЕРСАЛЬНОГО КОФАКТОРА МЕТАБОЛИЗМА .....</b>	<b>357</b>
<b>Скоробогатова А.С., Зубрицкая Г.П., Лукьяненко Л.М., Слобожанина Е.И. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ АМИЛОИДНЫХ СТРУКТУР И ИОНОВ СВИНЦА .....</b>	<b>360</b>
<b>Соколов А.В., Власенко А.Ю., Костевич В.А., Луценко В.Е., Старикова Э.А., Васильев В.Б. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСА ЛАКТОФЕРРИНА И ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ С ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ.....</b>	<b>363</b>
<b>Соколов А.В., Костевич В.А., Григорьева Д.В., Горудко И.В., Черенкевич С.Н., Васильев В.Б., Панасенко О.М. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГАЛОГЕНИРУЮЩЕГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА .....</b>	<b>365</b>
<b>Соколов А.В., Костевич В.А., Козлов С.О., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. КОМПЛЕКСЫ БЕЛКОВ НЕЙТРОФИЛОВ И МЕДИАТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ С ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ.....</b>	<b>368</b>
<b>Стародубцева М.Н., Константинова Е.Э., Стародубцев И.Е., Кужель Н.С., Петренёв Д.Р., Егоренков Н.И. ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЙ ОБРАЗ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ .....</b>	<b>370</b>
<b>Тарасов Д.С., Красненкова Т.П., Луговский А.П., Каплевский К.Н., Самцов М.П. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА.....</b>	<b>373</b>
<b>Терехова М., Брышевская М. ИЗМЕНЕНИЯ КОНФОРМАЦИИ ТРОМБИНА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПОЛИАМИДОАМИННЫХ ДЕНДРИМЕРОВ .....</b>	<b>376</b>
<b>Тимошин А.А., Лакомкин В.Л., Абрамов А.А., Рууге Э.К., Ванин А.Ф. ГИПОТЕНЗИВНОЕ И ЦИТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ГЛУТАТИОНОМ ПРИ ИХ ВВЕДЕНИИ В ОРГАНИЗМ КРЫС РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ .....</b>	<b>379</b>
<b>Титов В.Ю., Кондратов Г.В., Борхунова Е.Н., Осипов А.Н. ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ МЕХАНИЗМ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ОКСИДА АЗОТА В МИОГЕНЕЗЕ .....</b>	<b>382</b>

<b>Титовец Э.П. МЕХАНИЗМ ОСЦИЛЛИРУЮЩЕГО ДВИЖЕНИЯ ЖИДКОСТИ В ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОМ ПРОСТРАНСТВЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА.....</b>	<b>385</b>
<b>Трифанов П.В., Молчанов М.Д., Яшкин М.Н., Захаркина О.Л., Игнатьева Н.Ю. ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ ЛАЗЕРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭНДОВЕНОЗНОЙ ЛАЗЕРНОЙ АБЛЯЦИИ.....</b>	<b>388</b>
<b>Федоркова М.В., Смолина Н.В., Балабушевич Н.Г., Ибрагимова Г.А., Михальчик Е.В. ФОТОИНДУЦИРОВАННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ ТИОЛОВ В КЕРАТИНАХ ВОЛОС.....</b>	<b>391</b>
<b>Хлудеев И.И., Самцов М.П. ПРОЦЕССЫ СВЯЗЫВАНИЯ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО ПОЛИМЕТИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ С КОМПОНЕНТАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ .....</b>	<b>394</b>
<b>Шишкина Л.Н., Бабкин А.Ю., Козлов М.В., Хватов А.В. ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ.....</b>	<b>397</b>
<b>Шуканова Н.А., Мартынова М.А., Бушмакина И.М., Молчан М.М., Козловская Н.А., Шаповал Е.В. АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ РАКОВОЙ ТКАНИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПАЦИЕНТКИ – ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ПОКАЗАТЕЛЬ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА НА ПОЛИХИМИОТЕРАПИЮ .....</b>	<b>400</b>
<b>Шумаев К.Б., Дудылина А.Л., Пугаченко И.С., Гречникова М.А., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. АНТИОКСИДАНТНОЕ И АНТИРАДИКАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА.....</b>	<b>403</b>
<b>Яковец И.В., Кравченко И.Е., Самцов М.П., Луговский А.А., Воропай Е.С., Зорин В.П. ПРОЦЕССЫ ЛОКАЛИЗАЦИИ В КЛЕТКАХ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ .....</b>	<b>406</b>

## ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

### ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛ-СОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ КАК «РАБОЧАЯ ФОРМА» ОДНОГО ИЗ УНИВЕРСАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ – МОНООКСИДА АЗОТА

**Ванин А.Ф.**

*Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской Академии  
Наук, Москва, Россия, e-mail: [vanin.dnic@gmail.com](mailto:vanin.dnic@gmail.com)*

В последние 25-30 лет было установлено, что практически во всех представителях живого мира – человеке и животных, растениях и бактериях непрерывно ферментативным путём из L-аргинина или нитрита вырабатывается простейшее соединение – монооксид азота (NO), функционирующее в живых системах в качестве одного из универсальных регуляторов разнообразных биологических процессов. В организме человека и животных NO участвует в качестве агента, вызывающего вазодилатацию, в работе сердечно-сосудистой системы. NO необходим также для функционирования центральной и вегетативной нервной системы, для работы желудочно-кишечного тракта, мочеполовой и эндокринной систем. Характерное для всех этих систем регуляторное действие NO обеспечивается функционированием конститутивных ферментов, катализирующих синтез NO – эндотелиальной и нейрональной NO синтаз (соответственно, e- и n-NOS). Стационарный уровень NO в тканях не превышает нескольких микромолей.

При повышении стационарного уровня NO до 100 микромолей и выше, достигаемом при работе индуцибельной NOS (iNOS) позитивное, регуляторное действие NO сменяется на его цитотоксическое действие, обеспечивающее функционирование NO в качестве одного из эффекторов системы клеточного иммунитета (и аутоиммунитета). Губительное действие NO на клетки-мишени в этом случае достигается разрушительным действием избытка этого агента на ряд ферментов (например, на железо-серные белки), а также образованием в клетках и тканях значительного количества пероксинитрита, возникающего при взаимодействии NO с анионами супероксида. Протонированная форма пероксинитрита распадается на двуокись азота и гидроксильные радикалы. Оба этих продукта, особенно гидроксильные радикалы, повреждающим обра-

зом действуют на внутриклеточные компоненты, что и приводит к гибели клеток и тканей.

Среди многих исследователей биологического действия NO до сих пор сохраняется предвзятое представление о том, что этот агент, продуцируемый NO-синтазами, перемещаясь внутри клеток и между ними, остаётся в свободной молекулярной форме. Между тем уже первые исследования на изолированных клетках и тканях показали, что в этих условиях NO, продуцируемый этими биосистемами, быстро ( в течение нескольких секунд) погибает, превращаясь в упомянутой выше реакции с супероксидом в пероксинитрит. Выходом из этой ситуации может быть включение NO в эндогенно образующиеся S-нитрозотиолы или динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами, приводящее к резкому снижению скорости реакции NO в составе этих соединений с супероксидом. Тем самым достигается стабилизация этого агента и возможность его переноса к мишеням биологического действия, как ауто- так и паракринного характера.

ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами существуют в биосистемах в двух формах – в парамагнитной, ЭПР-активной моноядерной форме (М-ДНКЖ, формула  $[(RS)_2Fe(NO)_2]$ ) и диамагнитной, ЭПР-неактивной биядерной форме (Б-ДНКЖ, формула  $[(RS)_2Fe_2(NO)_4]$ ). Первая форма впервые была обнаружена методом ЭПР мною совместно с Р.М. Налбандяном в дрожжевых клетках в 1963-64 гг по характерному для М-ДНКЖ сигналу ЭПР с  $g_{ср.}=2,03$  (сигналу 2,03). В 1967 году аналогичный сигнал был зарегистрирован нами и в тканях животных. Этот результат явился первым свидетельством того, что в живых организмах может продуцироваться монооксида азота, необходимый для образования указанных выше ДНКЖ. В 90-е годы, когда было установлено, что в биосистемах, действительно, может ферментативным путём продуцироваться NO, М-ДНКЖ были зарегистрированы в культурах различных клеток человека и животных. Однако, несмотря на усиленную генерацию NO в тканях животных, например, при активации у них синтеза iNOS, М-ДНКЖ в этих тканях методом ЭПР не обнаруживались.

Причина этого несоответствия была понята нами только в последнее время. Оказалось, что в тканях животных, в отличие от клеточных культур, продуцируемый в них NO, по непонятным пока причинам *in vivo* предпочитает включаться не в ЭПР-активные М-ДНКЖ, а в их биядерные, ЭПР-неактивные аналоги – Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами. Эти комплексы легко превращаются в парамагнитные, ЭПР-активные мононитрозильные комплексы железа (МНКЖ) с производными дитиокарбамата при введении последних в изолированные ткани жи-

вотных. В ходе этого превращения производные дитиокарбамата перехватывают железо и один нитрильный лиганд из железо-динитрозильных фрагментов в составе Б-ДНКЖ, что и приводит к формированию парамагнитных МНКЖ с производными дитиокарбамата (например, диэтилдитиокарбаматом), характеризующихся сигналом ЭПР с триплетной сверхтонкой структурой и средним значением g-фактора, равным 2,04. Поскольку на образование одного железо-динитрозильного фрагмента в Б-ДНКЖ уходит 3 молекулы NO, подсчёт количества МНКЖ, возникающих при взаимодействии дитиокарбаматов с Б-ДНКЖ, показывает, что в тканях животных в образовании последних участвует до 70% монооксида азота, генерируемого в этих тканях. Другими словами, основная часть этого агента в тканях животных идёт на образование Б-ДНКЖ (а не на образование других стабильных эндогенных производных монооксида азота – S-нитрозотиолов).

Этот результат перекликается с результатами экспериментов группы Д. Томаса в США, показавших, что в клеточных культурах животных и человека эндогенный и экзогенный монооксид азота в подавляющей своей части включается не в S-нитрозотиолы, а в парамагнитную форму ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами – М-ДНКЖ.

Таким образом есть основание полагать, что монооксид азота, появляющийся в клетках и тканях животных и человека функционирует как один из универсальных регуляторов разнообразных метаболических процессов, включаясь первоначально в состав ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами – их М- и Б-форм. В живых системах эти формы ДНКЖ могут быть представленными как белок-связанными М- и Б-ДНКЖ (депо ДНКЖ), так и их низкомолекулярными аналогами, способными переносить высвобождающиеся из них молекулы NO и ионы нитрозония (NO<sup>+</sup>) на мишени их биологического действия, соответственно гем-содержащие и тиол-содержащие белки, чем и достигается биологическое действие ДНКЖ.

О высокой биологической активности низкомолекулярных ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, имитирующей аналогичную активность системы эндогенного NO, свидетельствуют многочисленные результаты исследований нашей и других групп учёных. Показано, что М- и Б-ДНКЖ с глутатионом или цистеином характеризуются мощной вазодилаторной активностью, обеспечивающей их эффективное гипотензивное действие на животных и человека. Низкомолекулярные ДНКЖ подавляют агрегацию тромбоцитов и эритроцитов, соответственно ослабляя тем самым образование тромбов и улучшая микроциркуляцию. Эти комплексы способны резко ускорять заживление ран и эффективно вы-

зывать эрекцию пениса у животных. Наконец, показано, что ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами модулируют активность многих генов, например, ответственных за выработку антиоксидантной защиты. Во всех этих случаях ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами выступают в качестве агентов, оказывающих на организм животных и человека позитивное, регуляторное действие. Вместе с тем, как и система эндогенного NO, эти комплексы способны оказывать на быстро пролиферирующие ткани животных избирательное негативное, токсическое действие. Предполагается, что оно определяется разрушительным действием на ДНКЖ эндогенных хелаторов железа, продуцируемых быстро растущими тканями для обеспечения их железом. Быстрое разрушение ДНКЖ этими хелаторами приводит к появлению вблизи и внутри клеток этих тканей значительного количества свободного NO, превращение которого в реакции с супероксидом в цитотоксический пероксинитрит и приводит к гибели этих клеток. Не исключено, что именно этим путём ДНКЖ с глутатионом полностью подавляли развитие незлокачественных эндометриоидных опухолей у крыс с экспериментальным эндометриозом – эффект, наблюдавшийся нашей группой в последние годы. Интересно, что аналогичные эксперименты, проведённые нами на злокачественных опухолях показали, что ДНКЖ с глутатионом ослабляли развитие этих опухолей лишь на первых стадиях их роста: далее у опухолей вырабатывалась (как и у многих бактерий) защита от NO, обеспечивавшая быструю пролиферацию злокачественных опухолей в присутствии ДНКЖ.

Таким образом, ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами способны, как и система эндогенного NO, оказывать на организм животных и человека как позитивное, регуляторное, так и негативное, цитотоксическое действие. Учитывая тот факт, что обе эти активности обнаруживаются при низких, микромолярных дозах этих комплексов, а также принимая во внимание широкую распространённость этих комплексов в клетках и тканях животных (в форме М- или Б-ДНКЖ), есть основание рассматривать эти комплексы как «рабочую форму» системы эндогенного NO.

С более детальным изложением приведённого здесь материала можно ознакомиться в последних моих публикациях:

1. Anatoly F. Vanin “ Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working form” of endogenous nitric oxide” (review) Nitric Oxide Biol Chem. – 2016. – Vol. 54. – P. 15-29.

2. Ванин А.Ф. « Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами: физико-химия, биология, медицина» (монография) АНО «Ижевский институт компьютерных исследований» Ижевск (2015).

# МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ АПОПТОЗ *IN VITRO* И *IN VIVO*: VDAC2 И КОМПЛЕКС ТОМ ВМЕСТО КАРДИОЛИПИНА

Вересов В.Г.

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,  
Минск, Беларусь, veresov@ibp.org.by*

Митохондриальный апоптоз происходит в ответ на действие разнообразных факторов, однако во всех случаях его общим критическим звеном является пермеабиллизация наружной мембраны митохондрий (НММ) с последующим освобождением из межмембранного пространства митохондрий (МПМ) в цитозоль апоптогенных факторов, таких как цитохром *c*, что в конечном итоге приводит к активации каспаз и разрушению клетки. У многоклеточных организмов пермеабиллизации наружной мембраны митохондрий (ПНММ) контролируется проапоптотическими и антиапоптотическими белками семейства Bcl-2 [1, 2]. Исследования с использованием нокаут-моделей показали центральную роль проапоптотических белков Bax и Bak в осуществлении апоптоза. В неапоптотических клетках Bax находится в динамическом равновесии между цитозолем и митохондриями, со значительным сдвигом равновесия в сторону митохондриальной фракции при апоптозе, в то время как Bak конститутивно локализован на НММ [1, 2]. Несмотря на то, что молекулярные механизмы ПНММ являлись областью интенсивного изучения в течение продолжительного времени, они все еще остаются недостаточно ясными, а результаты часто являются противоречивыми. В настоящее время господствующим является представление, согласно которому при апоптозе белки Bax и Bak подвергаются активации BH3-only белками (такими, как Bim, Bid/tBid), что в результате приводит к самоассоциации Bax и/или Bak с образованием пор в НММ, через которые происходит выход апоптогенных белков из МПМ в цитозоль, что сопровождается активацией каспаз и гибелью клеток [1, 2]. В нескольких экспериментах *in vitro* в безклеточных системах оказалось возможным воспроизвести многие характерные свойства Bax/Bak-опосредованной ПНММ, происходящей *in vivo*, используя лишь небольшое количество компонент: мембрану, содержащую кардиолипин, Bax (или Bak) и tBid [3-6]. Так как в течение продолжительного времени считалось, что пермеабиллизация кардиолипин-содержащих липосом в значительной степени реконструирует события, происходящие *in vivo*, концепция, согласно которой проапоптотическая активация Bak и Bax *in vivo* происходит в ре-

зультате совместного действия VNS-only белков и кардиолипина являлась до недавнего времени преобладающей концепцией для ПНММ *in vivo*. Однако участие кардиолипина в ПНММ до сих пор остается под вопросом. В ряде публикаций показано, что кардиолипин не нужен для ПНММ [10, 11]. Более того, в исследованиях с использованием липосом было установлено, что лишь незначительная доля Вах олигомеризуется с образованием пор, даже при использовании высоких концентраций tBid [3, 12]. Кроме того, было показано, что для пермеабиллизации НММ требуется по меньшей мере 7 % кардиолипина [3, 5, 6], в то время как в НММ его содержится существенно меньше. В работе Шафера и Куваны с сотр. было показано, что инкорпорация изолированных белков из НММ в липосомы, лишенные кардиолипина, приводила к такой же пермеабиллизации липосом в ответ на действие Вах и tBid, как и в случае большого содержания в них кардиолипина [12]. Исходя из этого было предположено, что какие-то белки НММ могут играть в пермеабиллизации НММ *in vivo* ту же роль, какую кардиолипин играет в пермеабиллизации липосом *in vitro*, и что среди этих белков, по крайней мере, один является рецептором для tBid. Если предположить, что НММ содержит мало кардиолипина, тогда как Вах конститутивно локализован на НММ, а не на других эндомембранах, то можно предположить существование в НММ некоторых нелипидных компонент, ответственных за специфичность Вах и Вах именно к этой эндомембране. Были предприняты попытки найти такие белки и после нескольких неудач VDAC2 (“voltage-dependent anion channel 2”) был идентифицирован как рецептор для Вах [13]. Также были получены экспериментальные данные, согласно которым, tBid, связанный с НММ, а также комплекс TOM22/TOM40 являются рецепторами для Вах в условиях апоптоза [14-16]. Недавно было установлено, что Вах, также как и Вах, взаимодействует с VDAC2 [17]. Эти исследования, показавшие, что проапоптотическая активация Вах и Вах регулируется митохондриальными белками, добавили еще один уровень сложности в общепринятую картину апоптоза. Недавно, механизмы регуляции активации Вах и Вах митохондриальными рецепторами были рассмотрены средствами структурного моделирования [18]. Полученные результаты показали существование иерархии tBid>Вах>Вах между средствами связывания этих белков с рецептором VDAC2. В соответствии с сегодняшним пониманием конкурентно-индуцированной диссоциации транзитных белковых комплексов (ТБК), последние постоянно образуются и распадаются, и если белок-конкурент находится вблизи сайта связывания рецептора, то этот белок-конкурент может занять место первоначального лиганда, временно препятствуя повторному связыванию последнего с

рецептором. В конечном итоге устанавливается равновесие с преобладанием в связанном состоянии белков, обладающих более высоким сродством. В соответствии с этой концепцией, tBid, образующийся при апоптотических условиях, способен смещать как Bax так и Bak из комплексов VDAC2/Bax и VDAC2/Bak. Также было установлено, что комплекс  $(\text{TOM40})_2/\text{TOM22}/\text{tBid}$  обладает свойством связываться с высоким сродством Bax. Позже мы установили, что комплекс VDAC2/tBid обладает высоким сродством по отношению к Bax. Это позволило предположить, что при апоптозе образуются оба рецептора, обуславливая интенсивное митохондриальное рекрутирование Bax при апоптозе. Полученные результаты, позволяют предположить центральную роль порина VDAC2 и комплекса TOM в осуществлении митохондриального апоптоза *in vivo*. Предполагаемая концепция VDAC2-опосредованной (A) и  $(\text{TOM40})_2/\text{TOM22}$ -опосредованной (B) активации Bak и Bax при апоптозе представлена на Рисунке 1.

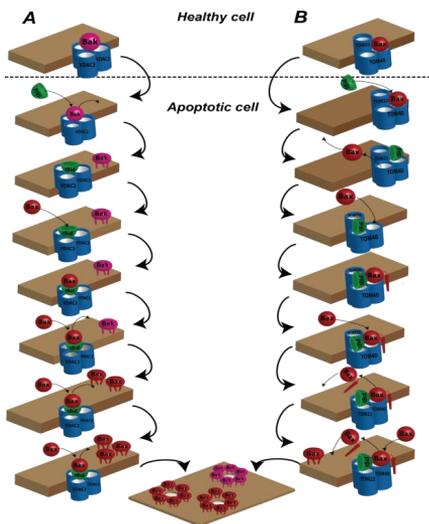


Рисунок 1 – Схематическое изображение VDAC2-опосредованной (A) и  $(\text{TOM40})_2/\text{TOM22}$ -опосредованной (B) активации Bak и Bax при апоптозе.

## Літэратура

1. Shamas-Din A., Kale J., Leber B., Andrews D.W. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. //Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2013. – Vol. 5. – a008714.
2. Czabotar P.E., Lessene G., Strasser A., Adams J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. //Nat. Rev. Mol. Cell Biol.- 2014. – Vol. 15. – P. 49-63
3. Kuwana T., Mackey M. R., Perkins G., et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. //Cell. – 2002. – Vol. 111. – P. 331-342
4. Roucou X., Rostovtseva T., Montessuit S., Martinou J. C., Antonsson B. Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes. //Biochem. J. – 2002. – Vol. 363. – P. 547-552
5. Yethon J. A., Epand R. F., Leber B., Epand R. M., Andrews D. W. Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. //J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. – P. 48935-48941
6. Terrones O., Antonsson B., Yamaguchi H., et al. Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. //J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 30081-30091
7. Lovell J. F., Billen L. P., Bindner S., et al. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. //Cell. – 2008. – Vol. 135. – P. 1074-1084
8. Lucken-Ardjomande S., Montessuit S., Martinou J. C. Contributions to Bax insertion and oligomerization of lipids of the mitochondrial outer membrane. //Cell Death Differ. – 2008. – Vol. 15. – P. 929-937
9. Landeta O., Landajuena A., Gil D., et al. Reconstitution of proapoptotic BAK function in liposomes reveals a dual role for mitochondrial lipids in the BAK-driven membrane permeabilization process. //J. Biol. Chem. – 2011. – Vol. 286. – P. 8213-8230
10. Iverson S. L., Enoksson M., Gogvadze V., Ott M., Orrenius S., Cardiolipin is not required for Bax-mediated cytochrome c release from yeast mitochondria. //J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 1100-1107
11. Polcic P., Su X., Fowlkes J., et al. Cardiolipin and phosphatidylglycerol are not required for the in vivo action of Bcl-2 family proteins. // Cell Death Differ. – 2005. – Vol. 12. – P. 310-312
12. Schafer B., Quispe J., Choudhary V., et al. Mitochondrial outer membrane proteins assist Bid in Bax-mediated lipidic pore formation. //Mol. Biol. Cell. – 2009. - Vol. 20. – P. 2276-2285

13. Roy S. S., Ehrlich A. M., Craigen W. J., Hajnoczky G., VDAC2 is required for truncated BID-induced mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria. //EMBO Rep. – 2009. – Vol. 10. – P. 1341-1347
14. Bellot G., Cartron P. F., Er E., et al. TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein Bax. //Cell Death Differ. – 2007. – Vol. 14. – P. 785-794
15. Ott M., Norberg E., Walter K. M., et al. The mitochondrial TOM complex is required for tBid/Bax-induced cytochrome c release. //J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 27633-27639
16. Billen L. P., Kokoski C. L., Lovell J. F., Leber B., Andrews D. W. Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. //PLoS Biol. – 2008. – Vol. 6. – P. e147
17. Ma S. B., Nguyen T. N., Tan I., et al. Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function. //Cell Death Differ. – 2014. – Vol. 21. – P. 1925-1935
18. Veresov V. G., Davidovskii A. I. Structural insights into proapoptotic signaling mediated by MTCH2, VDAC2, TOM40 and TOM22. //Cell. Signal. – 2014. – Vol. 26. – P. 370-382

## **СПЕКТРОСКОПИЯ ОДИНОЧНЫХ НАНООБЪЕКТОВ: ОТ МОЛЕКУЛ К БИОСТРУКТУРАМ**

**Зенькевич Э.И.<sup>1</sup>, Старухин А.С.<sup>2</sup>, фон Борцисковски К.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский национальный технический университет, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт физики им. Б.И. Степанова, Минск, Беларусь*

<sup>3</sup>*Институт физики Технического университета Хемнитца, Германия*

История развития и использования методов спектроскопии высоко-спектрального и пространственного разрешения при исследовании свойств одиночных органических молекул, нанобъектов (квантовые точки) и биоструктур составляет немногим более 25 лет. Высокая значимость и актуальность данного направления фундаментальной науки была отмечена в 2014 г. Нобелевской премией по химии за развитие методов флуоресцентной микроскопии сверхвысокого пространственного разрешения (Eric Betzig, Stefan W. Hell and William E. Moerner). Возмож-

ности современных методов многоканальной спектроскопии с супервысоким пространственным разрешением (превышающим дифракционный предел) в сочетании с лазерным возбуждением широко продемонстрированы при исследовании оптических свойств и динамики релаксационных процессов для одиночных объектов различной природы и морфологии (органические молекулы-флуорофоры, гетерогенные наноансамбли на основе квантовых точек, нативные биоструктуры и природные комплексы) [1].

В докладе приводится история вопроса, отмечается вклад советской школы в развитии данного направления и рассматриваются основные физические и оптические принципы современных методов пространственно-разрешенной спектроскопии. Обсуждается ряд результатов, полученных как авторами доклада [2, 3], так и другими исследователями в этом направлении, показывающих возможности субдифракционного детектирования одиночных центров для исследования специфики мерцаний интенсивности свечения (“blinking”, рис. 1) одиночных нанобъектов, их структуры и свойств, а также взаимодействия между ними в реальном масштабе времени (“colocalization”, рис. 2). Представлены результаты по спектральной визуализации и кинетике затухания свечения одиночных квантовых точек и наноансамблей «квантовая точка-порфирин» и «квантовая перилен-бисимид» с использованием конфокального микроскопа, сопряженного с детектирующей системой на основе лавинного фотодиода.

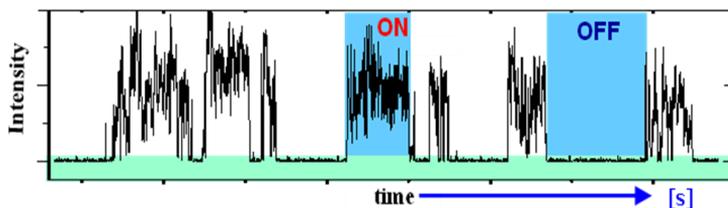


Рисунок 1. Временное мерцание интенсивности свечения одиночной молекулы перилен-бисимида при 295 К, фиксированной на кварцевой подложке при постоянном лазерном возбуждении.

Лазерная спектроскопия одиночных нанобъектов является сверхчувствительным методом изучения физико-химической природы органических молекул (в том числе и тетрапиррольных соединений [2]) при минимальных модификациях структуры и малых концентрациях, когда

другие методы (например, ЯМР-, ИК-спектроскопия) оказываются малоинформативными (рис. 3).

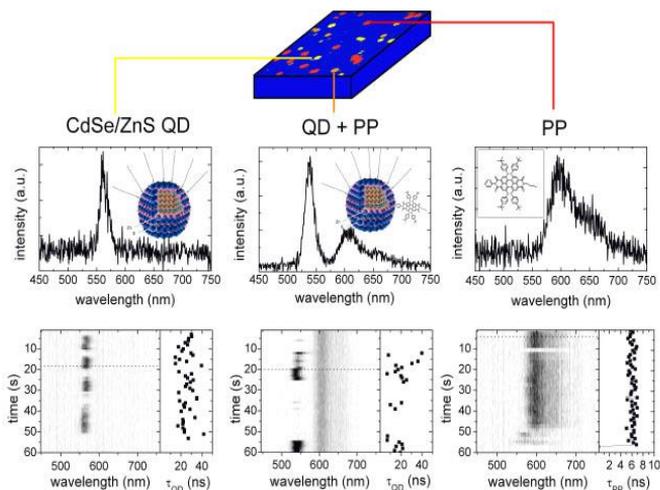


Рисунок 2. Спектрально-временная динамика полос свечения и кинетики затухания одиночных наносамблей «квантовая точка CdSe/ZnS-периленибисимид», фиксированных на поверхности Si/SiO<sub>2</sub>.

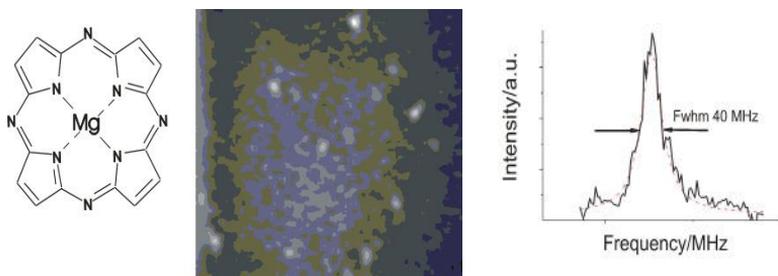


Рисунок 3. Структура, флуоресценция (image) и спектр свечения одиночной молекулы Mg-ГАП в матрице твердого ксенона при 1.2 К

В качестве примеров приводятся результаты исследований NH-таутомерии в одиночных молекулах свободных оснований порфиринов (рис. 4), а также экспериментальные данные по спектроскопии одиноч-

ных фотосинтетических светособирающих антенных комплексов зеленых растений и фотосинтезирующих бактерий

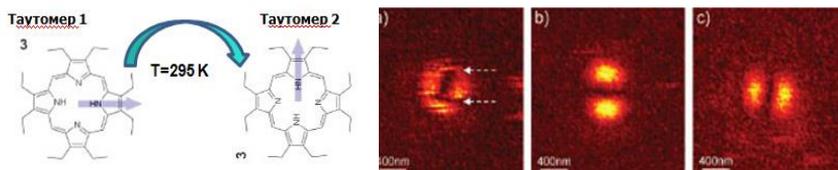


Рисунок 4. Схема NH-таутомерии и спектральная визуализация (image) ориентации дипольных моментов переходов в реальном масштабе времени для молекулы ОЕР в матрице РММА при 295 К.

Отметим, что разработанные методы и подходы в спектроскопии одиночных нанообъектов различной морфологии и природы позволяют решать широкий круг междисциплинарных задач в физике, физической химии, оптике и спектроскопии, биофизике, медицинской физике, квантовой информатике, а также осуществлять оперативную диагностику и высокочувствительный спектральный анализ сложных молекулярных систем и нанообъектов. С другой стороны, разработки в этой области характеризуются высокой практической значимостью, поскольку открывают широкие возможности при решении диагностических и других смежных задач материаловедения, биомедицины, нанотехнологий и др.

Финансовая поддержка работы: ГПНИ «Конвергенция - 2020 3.0.3 и 3.04» (Беларусь) и DFG Priority Unit FOR 877 (Германия).

### Литература

1. Moerner W.E. A Dozen years of single-molecule spectroscopy in physics, chemistry, and biophysics // J. Phys. Chem. B. -2002. - Vol. 106. - P. 910-927.
2. Starukhin A., Shulga A., Sepiol J., Knyukshto V., Renn A., Wild U. Single molecule spectroscopy of Mg-tetrazaporphyrin in xenon matrix. Heavy atom effect // Chem. Phys. - 2002. - Vol. 285. - P.121-125.
3. Zenkevich E.I., Blaudeck T., Kowerko D., Stupak A.P., Cichos F., von Borczyskowski C. Ligand dynamics and temperature effects upon formation of nanocomposites based on semiconductor CdSe/ZnS quantum dots and porphyrins: ensemble and single object measurements // Macromolecules. -2012. - Vol. 45. - P. 98-114.

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КАК ПЕРИОДИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ЗНАКОПЕРЕМЕННЫХ ХИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР

Твердислов В.А.

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
физический факультет, кафедра биофизики,  
ул. Ленинские горы, д.1, кор.2, г. Москва, Россия, 119991*

Явление хиральности рассмотрено как фундаментальный физический фактор (мотив) иерархического структурообразования в физико-химических и молекулярно-биологических системах. Некоторое время назад нами было сформулировано синергетическое правило, имеющее общий физико-химический характер и касающееся механизмов структурообразования и эволюции хиральных систем в неживой и живой природе [1, 2]. Эволюционирующая нелинейная система, обладающая запасом свободной энергии и хиральной асимметрией, находясь в пределах одного иерархического уровня и проходя точки бифуркации, способна в процессе самоорганизации изменять соотношение имеющихся типов симметрии, повышая свою «сложность», но сохраняя знак преобладающей хиральности («правой» - D или «левой» - L закрученности). Та же система в точках бифуркации проявляет тенденцию к спонтанному формированию последовательности иерархических уровней с чередующимся знаком хиральности заново образующихся структур. Оба случая связаны с нарушением симметрии, но во втором случае в системе происходит стратификация – появляется более высокий уровень структурной организации. В живых системах это может быть и более высокий функциональный уровень.

Приведем пример из наших работ, касающихся образования хиральных струн и суперспиралей и выполненных совместно со С.В.Стобуном и коллегами [3]. Экспериментально установлено, что в гомохиральных растворах трифторацетилованных аминок спиртов в циклогексане, бензоле и других растворителях, а также в водном растворе фенилаланина наблюдается образование струн - анизометрических (отношение длины к диаметру  $\sim 10^2 - 10^5$ ) спиральных структур, обладающих характерной жесткостью. D-изомер одного из аминок спиртов за счет диполь-дипольных взаимодействий формирует левую супрамолекулярную хиральную струну, свивающуюся в правую суперспираль.

Гомохиральность первичных структур биологических макромолекул определяет исходный запас свободной энергии, который используется в

процессе формирования внутримолекулярных и межмолекулярных структур. В иерархию макромолекулярных структур (первичную, вторичную, третичную, четвертичную) вмонтирован принцип разделения уровней, или стратификации, базирующийся на тенденции смены знака хиральности. После асимметричного углерода в аминокислотах и дезоксирибозе, начиная с вторичной структуры, хиральность связана с образами спиральности. Для ДНК в качестве первичной структуры мы рассматриваем цепочку молекул дезоксирибозы, а не нуклеотидов, как общепринято.

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. Эта система хиральностей зацикливается в супрамолекулярную машину, включающую ахиральный ДНК-белковый инвариант. Смещение знака хиральных структур ДНК и белков на половину периода имеет принципиальное значение для формирования регулярной системы межмолекулярных взаимодействий.

Система транспортных, информационных РНК, рибосомы предназначены играть роль активного фильтра – хирального насоса, отбирающего из цитоплазмы исключительно L-аминокислоты, соединяя их в полипептидную цепь, обладающую в силу гомохиральности запасом свободной энергии. Отбор необходим по причине того, что в цитоплазме присутствует определенное количество D-аминокислот. Возможно, и сам «мир ДНК» первично сформирован эволюцией как физический хиральный фильтр, а затем как химически специфический транспортёр аминокислот в рибосомы.

При межмолекулярных взаимодействиях в каждой из молекул существенен знак хиральности внутримолекулярной структуры высшего уровня, непосредственно участвующей во взаимодействиях. Для однотипных молекул (белок-белок, ДНК-РНК, тРНК-мРНК, рибозимы) взаимодействие реализуется в случае одного знака хиральности L-L или D-D, а для разнотипных молекул (ДНК-белок, тРНК-аминокислоты, фермент-субстрат) – в случае разного знака D-L или L-D.

В целом рассмотренная система чередующихся вертикальных и горизонтальных D и L структур макромолекул составляет регулярную сеть, которую в определенной степени можно уподобить периодической системе элементов, а аналогом спина, участвующего в формировании дискретности электронных орбиталей, может служить хиральный дуализм структур. Знакопеременная хиральная иерархичность сопряженных уровней макромолекулярных структур в белках и нуклеиновых кислотах

обуславливает их дискретность, служит структурной основой «выделенных механических» степеней свободы в конструкциях макромолекулярных машин, а также инструментом фолдинга.

Запас свободной энергии, связанный с гомохиральностью первичных структур, используется в фолдинге белковых макромолекул для построения знакопеременной хиральной иерархии структур. Термодинамическое обоснование состоит в следующем. Известно, что гомохиральная молекулярная субстанция, будь то раствор аминокислот или углеводов, подвергается рацемизации, стремясь уравнять концентрации энантиомеров, повышая до максимума энтропию системы и понижая уровень её свободной энергии. Вместе с тем, для линейного гомохирального полимера имеется принципиальная возможность понизить свою свободную энергию не только за счет рацемизации мономеров (назовём это «горизонтальной» рацемизацией), но и за счет «вертикальной» рацемизации: за счет создания структур высшего уровня с другим знаком хиральности. Таким образом, система «размазывает» свою гомохиральность, понижая свободную энергию, и это сопровождается появлением у части или всех макромолекул более устойчивого (стабильного, долгоживущего, жесткого) каркаса, нежели в исходном состоянии.

Способность атома углерода образовывать хиральные соединения является существенным фактором, определившим углеродную основу живых систем на Земле, а также их развитие через череду хиральных бифуркаций. Разграниченная знаком хиральности иерархичность макромолекулярных структур предопределила возможность «блочного», солтаторного характера молекулярно-биологической эволюции.

### **Литература**

1. Твердислов В.А. Биофизика. 2013. 58, № 1. С. 159.
2. Твердислов В.А., Малышко Е.В., Ильченко С.А. Известия РАН. Серия физическая, том 79, № 3, с. 1728-1732
3. Стовбун С.В., Занин А.М., Скоблин А.А., Михалева М.Г., Зленко Д.В., Твердислов В.А. Вестник Московского университета. Серия 3. Физика, астрономия. 2015. №1, с. 51–56.

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

### ATOMIC-LEVEL MODELING OF THE HUMAN TOM COMPLEX 3D-STRUCTURE

Dudko A.V.<sup>1</sup>, Davidovskii A.I.<sup>2</sup>, Veresov V.G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Department of Molecular Biology, Belarusian State University,  
Minsk, Belarus, dav\_bel@mail.ru*

<sup>2</sup> *Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus,  
Minsk, Belarus, veresov@ibp.org.by*

Mitochondria contain about 1000–1500 different proteins, most of which are synthesized as precursor proteins in the cytosol and imported into mitochondria via the outer-membrane translocator, the TOM complex. The TOM complex consists of the channel-forming  $\beta$ -barrel protein Tom40 and six other subunits, each containing single  $\alpha$ -helical transmembrane (TM) segments: the receptor protein TOM22, the regulatory small Tom proteins, Tom5, Tom6, and Tom7, and peripherally associated receptors, Tom20 and Tom70 [1]. It has been established that the assembly of the mature multipore TOM complex depends on the presence of Tom22 [2-4]. This central Tom receptor spans the outer membrane with a single  $\alpha$ -helix and exposes soluble domains to the cytosol and the intermembrane space that both interact with incoming precursor proteins. In the absence of Tom22, Tom40 and small Tom proteins are found in small, double-pore complexes [5]. Despite a significant progress in structural characterization of the TOM complex, the molecular architecture of the complex still remains contradictory. Also the 3D atomic-level structural models of the complex are absent. Here, to obtain atomic-resolution structural model of the human TOM complex, we use computational structural biology tools, the most recent experimental data on the structure of TOM complex components, the structure of the whole TOM complex obtained by electron microscopy and the data of cross-linking experiments in yeast. Here, computational structural biology tools, the most recent experimental data on the structure of TOM complex components, the structure of the whole TOM complex obtained by electron microscopy and the data of cross-linking experiments in yeast were used together to obtain the atomic-level structural model of the human TOM40/TOM22 complex. The modeling of human TOM40 and TOM22 3D-structures was performed using the I-TASSER protocol [6]. The prediction of the 3D-structures of the protein-protein complexes was performed in a stepwise fashion with an initial rigid-body global search and sub-

sequent steps to improve these initial predictions. To do this four - stage computational molecular docking protocol PIPER [7]–ROSETTADOCK<sub>1</sub> [8] – HADDOCK [9] -ROSETTADOCK<sub>2</sub> (abbreviated by PRHR) was used. Clustering of structures and energy funnels were used to improve the ability of finding the correct structure of the complex. In the present work, the ranking by binding affinities among different complexes was based on the ROSETTADOCK<sub>2</sub> interface energy score ( $I_{sc}$ ) instead of on ROSETTADOCK binding score (RDBS). In several cases we modeled the interaction of a certain protein with a short peptide <30 residues. In these cases the program of flexible docking FLEXPEPDOCK [11] was applied. At first we performed the modeling of interactions between the hTOM40 and hTOM22<sub>TM</sub> (residues 82-105). Among five structures provided by I-TASSER for each protein the highest-scored structure for TOM40 and an  $\alpha$ -helical structure for TOM22<sub>TM</sub> were chosen to be used in subsequent simulations. Next, these two structures were subjected to computational docking using the program PIPER [8]. Among 100 structures provided by PIPER(ClusPro server) we found one structure corresponding to the interaction type between TOM40 and TOM22<sub>TM</sub> in yeast [4]. Then this structure was refined using the FlexPepDock program [11]. As a result, we obtained the structure with a good shape complementarity ( $BSA=1254 \text{ \AA}^2$  for 24 TOM22<sub>TM</sub> residues). This resulted in a very low FlexPepDock  $I_{sc}$  value (-17.3). Next we performed successively the modeling the 3D-structures of hexamers (Tom40/TM22)<sub>3</sub>, TOM40 dimers ((TOM40)<sub>2</sub>) and trimers ((TOM40)<sub>3</sub>). Whereas no stable TOM40 trimers were observed (the highest-ranked trimer structure had the ROSETTADOCK(2)  $I_{sc}$  value of -2.0), a rather stable TOM40 dimers and (TOM40/TOM22) hexamers were identified with the lowest ROSETTADOCK(2)  $I_{sc}$  values of -8.3 and -11.5, respectively. These low  $I_{sc}$  values were caused by good shape complementarities ( $BSA=2392 \text{ \AA}^2$  and  $3235 \text{ \AA}^2$ , respectively) and three and seven hydrogen bonds, respectively, between interacting components. The structures of (TOM40/TM22)<sub>3</sub> and (TOM40)<sub>2</sub> are shown in Figure 1. The basic data of the simulations are summarized in Table 1.

Table 1. The ROSETTADOCK interface energy scores ( $I_{sc}$ ), Burried Surface Area (BSA), number of intermolecular salt bridges ( $N_{sb}$ ) and intermolecular hydrogen bonds ( $N_{HB}$ ) for different highest- rank complexes

Protein complexes	$I_{sc}$	$BSA, \text{ \AA}^2$	$N_{sb}$	$N_{hb}$
hTOM40 with hTOM22 <sub>TM</sub>	-8.3	1254 (24)	1	2
hTOM40 with hTOM40	-8.3	2392	0	2
h(TOM40) <sub>2</sub> with hTOM40	-2.3	1725	0	0
h(TOM40/TOM22) with h(TOM40/TOM22)	-10.9	3970	0	3
h(TOM40/TOM22) <sub>2</sub> with h(TOM40/TOM22)	-11.5	3235	0	10

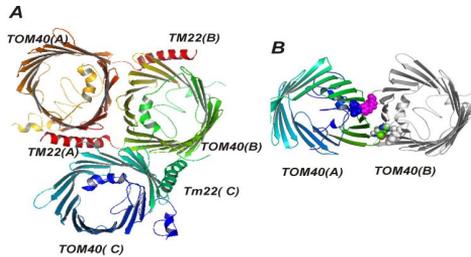


Fig 1. Structural models of the human hexamer (TOM40/TM22)<sub>3</sub> (A) and dimer (TOM40)<sub>2</sub> (B).

### References

1. Bohnert M., Pfanner N., van der Laan M. Mitochondrial machineries for insertion of membrane proteins. // *Curr Opin Struct Biol.* - 2015.- Vol. 33. – P. 92-102
2. van Wilpe S., et al. Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. // *Nature*, - 1999.- Vol. 401. – P. 485-489
3. Shiota T., Mabuchi H., Tanaka-Yamano S., Yamano K., Endo T. In vivo protein-interaction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* - 2011.- Vol. 108. – P. 15179-15183
4. Shiota T., Imai K., Qiu J., et al., Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. // *Science*. – 2015. – 349. – P. 1544-1548.
5. Model K., Meisinger C., Kühlbrandt W. Cryo-electron microscopy structure of a yeast mitochondrial preprotein translocase. // *J. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 383. – P. 1049–1057
6. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. // *Nat. Protoc.* -2010. – Vol. 5. – P. 725-738
7. Kozakov D., et al. PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials. // *Proteins*. – 2006. – Vol. 65. – P. 392-406.
8. Gray J.J., Moughon S., Wang C., Schueler-Furman O., Kuhlman B., Rohl C.A., Baker D. Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations. // *J. Mol. Biol.* - 2003. – Vol. 331. – P. 281-299
9. de Vries S.J., van Dijk M., Bonvin A.M.J.J. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. // *Nature Protocols*. – 2010. – Vol. 5. – P. 883-897

# INTEGRATIVE MODEL OF THE YEAST TOM COMPLEX ATOMIC-LEVEL 3D-STRUCTURE

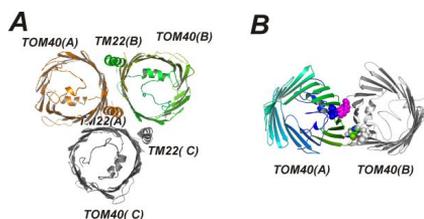
**Dudko A.V.<sup>1</sup>, Davidovskii A.I.<sup>2</sup>, Veresov V.G.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Molecular Biology, Belarusian State University,  
Minsk, Belarus, dav\_bel@mail.ru

<sup>2</sup> Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus,  
Minsk, Belarus, veresov@ibp.org.by

Most mitochondrial proteins are imported into mitochondria from the cytosolic compartment by the outer membrane translocator complex (the TOM complex). The TOM complex consists of the channel-forming  $\beta$ -barrel protein Tom40 and six other subunits, each containing single  $\alpha$ -helical transmembrane (TM) segments: the receptor protein TOM22, the regulatory small Tom proteins, Tom5, Tom6, and Tom7, and peripherally associated receptors, Tom20 and Tom70. In the last decade, information on the structural aspects of the TOM complex has been significantly accumulated [1]. It has been established that the assembly of the mature multipore TOM complex depends on the presence of Tom22 [2- 4]: in the absence of Tom22, Tom40 and small Tom proteins are found in small, double-pore complexes [4, 5]. Recently, experiments in yeast using cross-linking between TOM40 and TOM22 have been performed [3, 4] drawing conclusions about the relative positions of both proteins. Although there has been considerable progress in gaining structural insights into the TOM machinery, high-resolution structures for most of TOM components and for full TOM-complex are absent. Here, computational structural biology tools, the most recent experimental data on the structure of TOM complex components, the structure of the whole TOM complex obtained by electron microscopy and the data of cross-linking experiments were used together to obtain the integrative atomic-level structural model of the TOM complex. The 3D-structures of yeast TOM40, TOM22, TOM5, TOM6, TOM7 were predicted using the I-TASSER protocol [6]. The modelling of the 3D-structures of the protein-protein complexes was performed in a stepwise fashion with an initial rigid-body global search and subsequent steps of refinements to improve these initial predictions. To do this four - stage computational molecular docking protocol PIPER [7]-ROSETTADOCK<sub>1</sub> [8] - HADDOCK [9] -ROSETTADOCK<sub>2</sub> (PRHR) was used. Clustering of structures and energy funnels were used to improve the ability of finding the correct structure of the complex. In the present work, the ranking by binding affinities among different complexes was based on the ROSETTADOCK<sub>2</sub> interface energy score (I\_sc) instead of on ROSETTADOCK binding score (RDBS). In several

cases we modeled the interaction of a certain protein with a short peptide <30 residues. In these cases the program of flexible docking FLEXPEPDOCK [11] was applied. At first we performed the modeling of interactions between the TOM40 and TOM22<sub>TM</sub> (residues 92-121) proteins. Among five structures provided by I-TASSER for each protein the highest-scored structure for TOM40 and an  $\alpha$ -helical structure for TOM22<sub>TM</sub> were chosen for the use in subsequent simulations. Next, these two structures were subjected to computational docking using the program PIPER [8]. Among 100 structures provided by Piper (ClusPro server) we found one structure corresponding to the interaction type between TOM40 and TOM22<sub>TM</sub> with Lys94 and Glu120 of TOM22 being in close proximity to Arg310 and Asp350 of TOM40 in accordance with the cross-linking data of Shiota et al [4]. Then this structure was refined using the FlexPepDock program [11]. As a result, we obtained the structure with a good shape complementarity ( $BSA=2117 \text{ \AA}^2$ ) that formed three intermolecular hydrogen bonds and one salt bridge. This resulted in a very low FlexPepDock  $I_{sc}$  value (-18.9).



**Fig 1.** Structural models of the yeast  $(TOM40/TOM22)_3$  hexamer (A) and the  $(TOM40)_2$  dimer.

Next we performed successively the modeling the 3D-structures of hexamers  $(Tom40/TM22)_3$ , TOM40 dimers  $((TOM40)_2)$  and trimers  $((TOM40)_3)$ . Whereas no stable TOM40 trimers were observed (the highest-ranked trimer structure had the ROSETTADOCK(2)  $I_{sc}$  value of -4.0), a rather stable TOM40 dimers and  $(TOM40/TOM22)$  hexamers were identified with the lowest ROSETTADOCK(2)  $I_{sc}$  values of -6.7 and -8.1, respectively. These low  $I_{sc}$  values were caused by good shape complementarities ( $BSA=2286 \text{ \AA}^2$  and  $2970 \text{ \AA}^2$ , respectively) and three and seven hydrogen bonds, respectively, between interacting components. The structures of  $(TOM40/TM22)_3$  and  $(TOM40)_2$  are shown in Figure 1. The basic data of the simulations are summarized in Table 1.

**Table 1.** The ROSETTADOCK interface energy scores ( $I_{sc}$ ), Buried Surface Area (BSA), number of intermolecular salt bridges ( $N_{sb}$ ) and intermolecular hydrogen bonds ( $N_{HB}$ ) for different highest- rank complexes

Protein complexes	Isc	BSA $\text{\AA}^2$	$N_{sb}$	$N_{nb}$
TOM40 with TOM22 <sub>TM</sub>	-8.3	2117	1	3
TOM40 with TOM40	-6.7	2286	0	3
(TOM40) <sub>2</sub> with TOM40	-4.0	2323	0	1
(TOM40/TOM22) with (TOM40/TOM22)	-9.0	4217	0	1
(TOM40/TOM22) <sub>2</sub> with (TOM40/TOM22)	-8.1	2970	0	7

### References

1. Bohnert M., Pfanner N., van der Laan M. Mitochondrial machineries for insertion of membrane proteins. //Curr Opin Struct Biol.- 2015.- Vol. 33. – P. 92-102
2. van Wilpe S., Ryan M. T., Hill K., et al. Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. //Nature, - 1999.- Vol. 401. – P. 485-489
3. Shiota T., Mabuchi H., Tanaka-Yamano S., Yamano K., Endo T. In vivo protein-interaction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work. //Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.- 2011.- Vol. 108. – P. 15179-15183
4. Shiota T., Imai K., Qiu J., et al., Pfanner N., Lithgow T., Endo T. Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. //Science. – 2015. – 349. – P. 1544-1548.
5. Model K., Meisinger C., Kühlbrandt W. Cryo-electron microscopy structure of a yeast mitochondrial preprotein translocase.// J. Mol. Biol. – 2008. – Vol. 383. – P. 1049–1057
6. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. //Nat. Protoc. -2010. – Vol. 5. – P. 725-738
7. Kozakov D., Brenke R., Comeau S.R., Vajda S. PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials. //Proteins. – 2006. – Vol. 65. – P. 392-406.
8. Gray J.J., Moughon S., Wang C., Schueler-Furman O., Kuhlman B., Rohl C.A., Baker D. Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations. //J. Mol. Biol.- 2003. – Vol. 331. – P. 281-299
9. de Vries S.J., van Dijk M., Bonvin A.M.J.J. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. //Nature Protocols. – 2010. – Vol. 5. – P. 883-897

# ZETA SIZE AND CHARGE EVALUATION OF COMPLEXES BASED ON PHOSPHORUS DENDRIMERS AND PLASMA REGULATORY PROTEINS

Ihnatsyeu-Kachan A.<sup>1</sup>, Ionov M.<sup>2</sup>, Majoral J.-P.<sup>3</sup>, Bryszewska M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Biophysics and Cell Engineering of NASB,  
Minsk, Belarus, alexei.ihn.k@gmail.com*

<sup>2</sup> *Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental  
Protection, University of Lodz, Lodz, Poland*

<sup>3</sup> *Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS, Toulouse, France*

Dendrimers, which are considered as one of the most promising tools in the field of nanobiotechnology due to their structural organization, showed a great potential in gene therapy, drug delivery, medical imaging, as antimicrobial and antiviral agents [1]. Considering numerous applications of dendrimers in the biomedical field, knowledge of their possible interactions with biological components at a molecular level is required.

This paper presents a study of the interaction of cationic phosphorus dendrimers, a class of dendrimers with potential medical relevance [2, 3], with regulatory plasma proteins: aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (AP) and Lactic dehydrogenase (LDH) by dynamic and phase analysis light scattering.

The results show that water-soluble cationic phosphorus dendrimers of generation 3 and generation 4 interact with regulatory plasma proteins to form positively charged (+14 – +17 mV) dendrimer/protein complexes of different sizes (from 200 to 1800 nm) at a molar ratio of 10–15:1. This information could be useful in designing new drug delivery systems using dendrimers as potential carriers of biomolecules and in other fields of nanobiotechnology.

Research was supported by the National Science Centre of Poland, project no. DEC-2012/04/M/NZ1/00059, by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, project no. B15MS-001.

The results of this work are published in International Journal of Pharmaceutics, Vol. 499, № 1-2, M. Ionov et al., Effect of dendrimers on selected enzymes – Evaluation of nano carriers, P. 247–254 (2016).

## Literature

1. Svenson, S. Dendrimers in biomedical applications – reflections on the field / S. Svenson, D. Tomalia // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2012. – V. 64. – P. 102–115.

2. Cytotoxicity and genotoxicity of cationic phosphorus-containing dendrimers / P. Gomulak [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2012. – V. 19. – №. 36. – P. 6233–6240.
3. Caminade, A.M. Biological properties of phosphorus dendrimers / A. M. Caminade, C. O. Turrin, J. P. Majoral // *New J. Chem.* – 2010. – V. 34. – №. 8. – P. 1512–1524.

## **CORRELATING ROSETTADOCK BINDING SCORE WITH PROTEIN-PROTEIN BINDING AFFINITY**

**Veresov V.G.**

*Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus,  
Minsk, Belarus, veresov@ibp.org.by*

Many protein-protein docking algorithms are divided into two steps: the initial global search and subsequent steps of refinements to improve these initial predictions [1]. The global search is a full search of the orientations of the two proteins, typically keeping the larger protein (referred to as the receptor) fixed, while moving the smaller protein (the ligand). This is often a rigid-body search in six dimensions, utilizing a fast Fourier transform (FFT) for efficiency and softness for small overlaps [1]. Subsequently, one or more refinement and scoring steps of a set of preselected rigid docking solutions are added to achieve closer agreement with the native geometry and to recognize near-native docking solutions preferentially either as the best or among the best scoring complexes. The accuracy and speed of flexible refinement and rescoring of preselected docked protein structures are important for the success of the multistage docking protocol. Recently, it has been shown using Principal Component Analysis that the energy landscape of 42 interacting proteins, at least within the 10 Å IRMSD neighborhood of the native state, always includes a permissive subspace ('tunnel') along which the conformation of the complex can substantially change without crossing significant energy barriers and that the energy landscape is smooth funnel in a two dimensional permissive subspace [2]. This suggests that methods such as molecular dynamics (MD) or Monte Carlo (MC) simulations that start from productive encounter complexes should fairly quickly converge to native structure (or near-native one because of some inaccuracy of scoring functions) making these strategies as promising tools of the efficient refinement. The Monte Carlo approach is especially attractive as being much less computationally expensive as compared with MD. Several docking protocols including rigid-body

moves and Monte Carlo refinement have been proposed and those including RosettaDock [3] refinements at the second stage have been found to be among the most efficient [4]. In principle, a fairly accurate structure of the complex contains information about binding energy/affinity and a number of structural features have been shown to correlate with affinity [5]. However, precise evaluation of the binding free energy requires highly time-consuming exploration of all the details of the interaction at atomic precision and accurate information on binding affinities is therefore one of the most principal challenges of all current docking methods. We asked whether it is possible to predict affinity by rigid-body approaches followed by one or several RosettaDock refinements if productive encounter complex structure is known. The Version 1 structure-affinity Protein Docking Benchmark of four laboratories [6], which is a nonredundant set of 144 protein-protein complexes that have high-resolution structures available for both the complexes and their unbound components and for which dissociation constants have been measured by biophysical methods, was used to assess the performance of RosettaDock refinements. With the aim of assessment the performance of RosettaDock refinements the unbound structures were superimposed over the bound complex and the resulting superposed structure was used as the starting one for local docking. We first prepared each docking partner in isolation, optimizing their side-chain conformations prior to docking using ‘docking\_local\_refine’ option. The same procedure was applied to the structures of complexes. We tested the correlation between the ROSETTADOCK binding score (RDBS), which is the total score difference between the components together and the components pulled far apart from each other after their relaxation (repacking). The convergence of the starting structures to the structure of the bound complex was taken as a measure of RosettaDock refinement performance. To do that we calculated the number of refinement runs resulting in convergence (NRDcny).

We judged the RosettaDock refinements as convergent if I\_rms deviation from the bound state was  $<0.5\text{\AA}$ , and the distinct funnel took place. If such convergence was not reached during 10 refinement runs and the deviation from the bound state remained stable during last five steps the refinement process was judged as nonconvergent. The results of simulations are shown in Table 1. The results show a very good correlation between experimental binding affinity and RDBS with Pearson’s coefficients of 0.84/0.81. This suggests that two-step approach including rigid-body global search and local RosettaDock refinements as efficient tool to predict protein-protein binding affinity

**Table 1.** Performance of RosettaDock refinements on 15 Version 1 Structure-affinity Benchmark [6] complexes.

ref <sup>(a)</sup>	Complex PDB	Unbound component_1 PDB	Unbound component_1 PDB	Kd (M)	L_rmsd	RDBS bound and funnel (f) presence	nRDenv (b)	RDBS unbound superimposed on bound after Ncnvb refinement runs and funnel (f) presence
7	1AVX_A:B	1QQU_A	1BA7_B	4.8E-10	0.47	-120.8 (f)	3	-63.4 (f)
8	1AVZ_B:C	1AVV_A	1FYN_A	1.6E-05	0.73	-49.4 (f)	3	-40.1(f)
13	1BUH_A:B	1HCL_A	1DKS_A	7.7E-08	0.75	-92.0(mf)	6	-76.1(f)
15	1BVN_P:T	1PIG_A	1HOE_A	9.2E-12	0.87	-199.6(f)	2	-100.7(f)
26	1EFN_B:A	1AVV_A	1FYN_A	3.8E-08	0.90	-50.3(mf)	5	-39.6(f)
28	1EWY_A:C	1GJR_A	1CZP_A	3.6E-06	0.80	-87.5(mf)	5	-75.2(mf)
30	1F34_A:B	4PEP_A	1F32_A	1.0E-10	0.93	-96.8(f)	3	-79.9(f)
37	1GCQ_B:C	1GRI_B	1GCP_B	1.7E-05	0.92	-26.3(f)	7	-100.4(f)
54	1J2J_A:B	1O3Y_A	1OXZ_A	1.1E-6	0.63	-36.5(f)	7	-74.3(bf)
58	1JTG_B:A	3GMU_B	1ZG4_A	4.0E-10	0.49	-74.5(f)	4	-69.0(f)
64	1KTZ_A:B	1TGK_A	1M9Z_A	2.0E-07	0.39	-30.6(f)	3	-60.7(bf)
66	1KXQ_H:A	1KXQ_H	1PPI_A	3.5E-09	0.72	-124.0(f)	4	-104.1(f)
100	1Z0K_A:B	2BME_A	1YZM_A	7.7E-06	0.53	-42.3(mf)	7	32.8(f)
101	1ZHI_A:B	1M4Z_A	1Z1A_A	2.0E-07	0.68	-63.8(f)	5	-61.9(f)
132	2TGP_Z:I	1TGB_A	9PTI_A	2.4E-06	0.57	-50.4(f)	5	47.4 (f)

## References

1. Vajda S., Kozakov D. Convergence and combination of methods in protein-protein docking. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2009. – Vol. 74. – P. 164–170.
2. Kozakov D., Li K., Vajda S. 2014. Encounter complexes and dimensionality reduction in protein-protein association. // *eLife*. – 2014. – Vol. 3. – P. e01.
3. Gray J.J., Moughon S., Wang C., Schueler-Furman O., Kuhlman B., Rohl C.A., Baker D. Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations. // *J. Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 331. – P. 281-299.
4. Lensink M. F., Wodak S. J. Docking, scoring, and affinity prediction in CAPRI. // *Proteins*. – 2013. – Vol. 81. – P. 2082–2095.
5. Vangone A, Bonvin AMJJ: Contacts-based prediction of binding affinity in protein–protein complexes *eLife*. 2015; 4: e07454.
6. Kastiris P.L., Moal I. H., Hwang H., Weng Z., Bates P. A., Bonvin A. M., Janin J. A structure-based benchmark for protein –protein binding affinity. // *Protein Sci.* – 2011. – Vol. 20. – P. 482 – 491.

# DETERMINATION OF ARYL-PORPHYRINS BINDING CONSTANTS TO BIOLOGICAL STRUCTURES BY INDIRECT SPECTRAL APPROACH

**Yakavets I.V.<sup>1</sup>, Yankovsky I.V.<sup>1,2,3</sup>, Tihonov K.D.<sup>1</sup>,  
Bolotina L.N.<sup>2,3</sup>, Zorin V.P.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Belarussian State University, Minsk, Belarus*

<sup>2</sup> *CRAN, CNRS, Université de Lorraine, Nancy, France*

<sup>3</sup> *Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

The evaluation of drugs affinity to different biological structures (serum proteins, membranes and others) is very important to understand their pharmacokinetics features. In spite of the fact, there are a large number of physical-chemical methods for direct determination of the characteristics of affinity; most of them meet with difficulties, when dealing with non-polar compounds. In the current work we present a new indirect spectral fluorescent method, which allows to quantify relative affinity of aryl-porphyrins to biomolecules and biomembranes.

Aryl-porphyrins (APs) are widely used in photodynamic diagnostic and therapy of oncological diseases [1]. Most of them are hydrophobic molecules and form aggregates in aqueous surroundings. The formation of aggregates complicates APs biodistribution in organism after injection in blood. The aggregation leads also to the loss of APs fluorescent ability and affects on their affinity to biological structures, such as plasma proteins and cell membranes.

In our study we used cyclic oligosaccharides (cyclodextrins, CDs) to prevent the APs aggregation and to estimate the binding constants of aryl-porphyrins to biological membranes and serum proteins. It is widely known that CDs readily form inclusion complexes with many drugs by incorporating a drug molecule or more commonly a lipophilic moiety of the molecule into the central cavity. It has been shown, that CDs efficiently form an inclusion complexes with AP and can be photosensitizer vehicles via complexation [2].

As object to study we used following APs: 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC), 5,10,15,20-Tetra(o-sulfophenyl)porphyrin (TSPP) and 5,10,15,20-Tetra(o-carboxyphenyl)porphyrin (TCPP). The complex formation processes between listed above APs and methyl- $\beta$ -cyclodextrin (Me- $\beta$ -CD) have been studied (Figure 1) and the spectral techniques for determination of complexation stoichiometry and quantitative parameters have

been developed [3]. According to the data obtained, the complexes between APs and Me- $\beta$ -CD have a stoichiometry 1:2 and can be characterized by the binding constants values over  $10^{12} \text{ M}^{-2}$ .

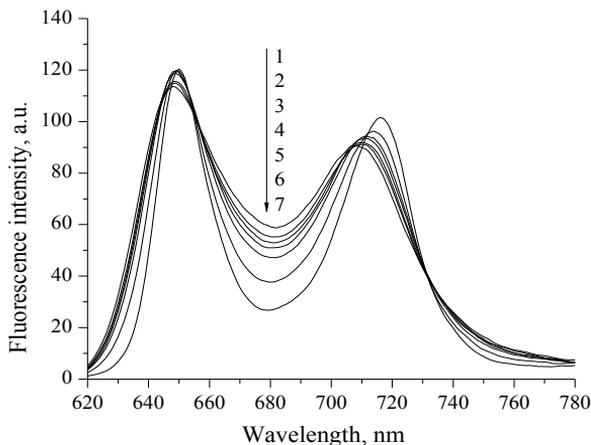


Figure 1 – TSPF fluorescence spectra in water solutions in presence of various Me- $\beta$ -CD concentration: 1 – 0; 2 – 0.4  $\mu\text{M}$ ; 3 – 0.6  $\mu\text{M}$ ; 4 – 0.8  $\mu\text{M}$ ; 5 – 1  $\mu\text{M}$ ; 6 – 2  $\mu\text{M}$ ; 7 – 6  $\mu\text{M}$ .

To determine the APs affinity to biological structures we have analyzed the processes of APs binding to Me- $\beta$ -CD in the serum proteins solutions (human serum albumin, low and high density lipoproteins) and in the lipid vesicles suspensions (Figure 2). The obtained titration curves and previously determined binding constants values for the APs association with Me- $\beta$ -CD process were used to estimate relative affinity of porphyrins to biological structures. In the case of mTHPC, the following values of the distribution coefficient were obtained:  $2.6 (\text{mg/ml})^{-1}$  for human serum albumin,  $4.8 \times 10^2 (\text{mg/ml})^{-1}$  for low density lipoproteins and  $1.0 \times 10^3 (\text{mg/ml})^{-1}$  for high density lipoproteins. The ratios of mTHPC distribution coefficients in plasma compounds were in a good accordance to the data obtained by means of the gel-chromatography [4].

The data obtained confirm the interest of CDs in mTHPC-PDT.

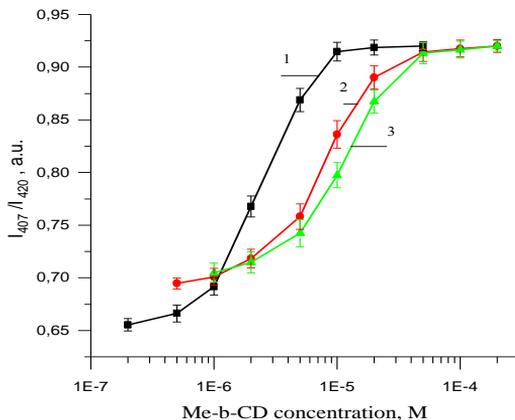


Figure 2 – The titration curves of mTHPC by Me- $\beta$ -CD in solutions of serum albumin (1), low density lipoproteins (2), high density lipoproteins (3)

### Acknowledgements

This study was supported by Belarussian Republican Foundation for Fundamental Research (M16M-049,  $\Phi$ 16MB-006), the Ministry of Education of the Republic of Belarus and French “Ligue National contre le Cancer”. We thank Biolitec Research GmbH (Jena, Germany) for providing us with mTHPC.

### References

1. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers / R. Bonett [et al.] // *Biochem. J.* – 1989. – Vol. 261. – P. 277-280
2. Cyclodextrin carriers of positively charged porphyrin sensitizers / J. Mosinger [et al.] // *Org. Biomol. Chem.* – 2009. – Vol. 7. - P. 3797–3804.
3. Spectral characteristics of meta-tetra(hydroxyl-phenyl)chlorin in biological systems / I. Yakavets [et al.] // *J. BSU Herald Series 1 Physics.* – 2015. – Vol. 2. – P. 39-45.
4. Interaction of liposomal formulations of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (temoporfin) with serum proteins: protein binding and liposome destruction / V. Reshetov [et al.] // *Photochem. Photobiol.* - 2012. - Vol. 88, No. 5. - P. 1256-1264.

## ВЛИЯНИЕ ПАМАМ–ДЕНДРИМЕРОВ НА ТЕМПЕРАТУРО-ИНДУЦИРОВАННУЮ ДЕНАТУРАЦИЮ БЕЛКОВ

**Абашкин В. М.<sup>1</sup>, Щербин Д. Г.<sup>1</sup>, Ионов М.<sup>2</sup>, Брышевска М.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,  
Минск, Беларусь,*

<sup>2</sup>*Кафедра общей биофизики, Лодзьский университет, Лодзь, Польша.*

**Введение.** Стремительное развитие нанотехнологий и использование их в биологии и медицине требует тщательного изучения их влияния на организм человека в целом и различные биологические структуры в частности. Условно наноматериалы можно разделить на «жесткие» и «мягкие» ('hard' vs 'soft' - предложено Д. Томаля [1]). К «жестким» относятся наночастицы металлов, фуллерены, углеводные нанотрубки и квантовые точки. «Мягкие» наночастицы включают липосомы, дендримеры, полимерные мицеллы и полимерные нанокapsулы. «Мягкие» наночастицы проявляют значительно большую биосовместимость, нежели «жесткие», потому представляют большой интерес для медицины [2].

Дендримеры – класс макромолекул, обладающих симметричной древообразной с регулярными ветвлениями структурой. Этот класс соединений интересен тем, что с увеличением их молекулярной массы изменяются форма и жесткость молекул, что сопровождается изменением физико-химических свойств, таких как характеристическая вязкость, растворимость, плотность и др. Ключевые свойства дендримеров, как правило, задаются поверхностными функциональными группами, однако существует ряд дендримеров, обладающих внутренней функциональностью [1]. Дендримеры в настоящее время нашли применение в генетической терапии в качестве носителей генетического материала в клетки и органы. Данный класс полимеров имеет структурные преимущества перед вирусными системами и векторами доставки генетического материала в больные органы и ткани. При внутривенном способе введения дендримеров и дендриплексов возможно их неспецифическое взаимодействие с белками и клетками крови, тканями стенок сосудов. В настоящее время остается недостаточно изученным характер взаимодействия дендримеров с белками. Понимание механизмов их взаимодействия является необходимым условием использования новых наноматериалов в медицине.

**Материалы и методы.** В данной работе представлен анализ влияния катионных полиамидаминных (ПАМАМ) дендримеров 3-й и 4-й генераций на температурно-индуцированные изменения вторичной структу-

ры белков. Для анализа были выбраны белки щелочная фосфатаза *E. Coli*, лактатдегидрогеназы из мышц кролика и аспартатаминотрансфераза человека.

Изменения вторичной структуры белков оценивались с помощью измерения спектров их кругового дихроизма (КД) и последующего анализа посредством программного обеспечения «CDSpectraDeconvolution».

**Результаты и обсуждение.** Как показали результаты исследований, при повышении температуры наблюдалась частичная денатурация щелочной фосфатазы с последующим возвращением белка к практически нативной структуре после охлаждения образца. В отличие от щелочной фосфатазы, наблюдались температурно-индуцированные изменения вторичной структуры аспартатаминотрансферазы и лактатдегидрогеназы.

Обнаружено, что ПАМAM–дендримеры не оказывают влияния на температурно-индуцированную денатурацию белка лактатдегидрогеназы. Однако, оба дендримера влияли на денатурацию термически более устойчивых аспартатаминотрансферазы и щелочной фосфатазы. При этом в случае аспартатаминотрансферазы наблюдалось влияние дендримеров на рефолдинг после охлаждения образца.

Известно, что изменения во вторичной структуре белков под внешним воздействием, такие как переходы от  $\alpha$ -спиралей к  $\beta$ -структурам, наблюдаются в целом ряде белковых систем и являются универсальным механизмом денатурации белков [3, 4]. Изменения в поведении данного механизма может говорить о специфическом взаимодействии различных факторов с глобулой белка. Для детального анализа вторичной структуры был выбран белок аспартатаминотрансфераза. Результаты показали, что глобула белка равномерно разворачивается в клубок, при этом  $\alpha$ -спираль перестраиваются в менее плотные структуры  $\beta$ -складок. ПАМAM–дендримеры увеличивали скорость перехода  $\alpha$ -спиралей в  $\beta$ -складки, но не изменяли характер процесса.

**Выводы.** Полученные данные говорят о том, что ПАМAM–дендримеры могут выступать в качестве факторов, способствующих денатурации белков, а также влиять на процесс фолдинга-рефолдинга белка.

Результаты исследований поддержаны Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований, грант Б15МС-001.

### Литература

1. Tomalia D.A. Dendrimer research // Science. – 1991. – Vol. 252, N 5010. – P. 1231.

2. Kunzmann A., Andersson B., Thurnherr T., Krug H., Scheynius A., Fadeel B. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1810. – P. 361 – 373.
3. Takahashi Y. Mutational analysis of designed peptides that undergo structural transition from  $\alpha$  helix to  $\beta$  sheet and amyloid fibril formation // *Structure.* – 2000. – Vol. 8, №. 9. – P. 915–925.
4. Sethuraman A. Protein unfolding at interfaces: Slow dynamics of  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -sheet transition // *Proteins.* – 2004. – Vol. 56, №. 4. – P. 669–678.

## УСТАНОВЛЕНИЕ СВЯЗИ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ БОКОВОЙ ЦЕПИ БРАССИНОСТЕРОИДОВ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ МЕТОДАМИ КВАНТОВОЙ ХИМИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

**Андрианов В.М.<sup>1,2</sup>, Анищенко И.В.<sup>3</sup>, Королевич М.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт физики им. Б.И.Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: [v.andrianov@dragon.bas-net.by](mailto:v.andrianov@dragon.bas-net.by)*

<sup>2</sup>*Белорусский государственный аграрный технический университет, Минск, Беларусь, e-mail: [korolevich@dragon.bas-net.by](mailto:korolevich@dragon.bas-net.by)*

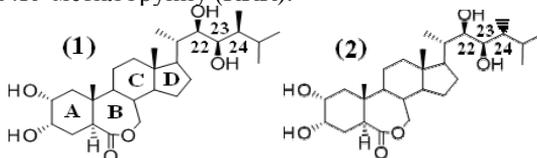
<sup>3</sup>*Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: [anishchenko.ivan@gmail.com](mailto:anishchenko.ivan@gmail.com)*

Браassinостероиды (БС) – класс растительных фитогормонов, проявляющих высокую биологическую активность. Эти соединения, известные своей ростостимулирующей способностью, обратили на себя внимание и как потенциальные антиканцерогенные фармакологические средства. Однако антиканцерогенная и цитотоксическая активность БС недостаточно изучена на молекулярном уровне. Известно, что взаимное пространственное расположение заместителей углеродного остова боковой цепи является важным фактором биологической активности БС.

Цель работы – установление влияния стереохимической конфигурации заместителя у атома С<sub>24</sub> в природных БС, имеющих 22R,23R-диольную структуру в боковой цепи, на конформацию боковой цепи БС и связи биоактивности со структурой боковой цепи.

Согласно различным биотестам самым биологически активным БС является брасинолид, боковая цепь которого содержит 22R,23R-гидроксилы и 24S- метил группу (RRS). В связи с этим представляется

целесообразным для исследования связи между структурой боковой цепи и брассинолидной активностью проведение сопоставительного конформационного анализа брассинолида (1) и менее активного БС – природного 24-эпibrассинолида (2), боковая цепь которого содержит 22R,23R-гидроксилы и 24R- метил группу (RRR).



Локальные минимумы (устойчивые конформеры) в исследуемых молекулах определялись методом молекулярной механики (ММ), а затем уточнялись методом DFT с B3LYP-функционалом и расширенным базисным набором 6-311+G(d,p). Эти расчеты позволили определить семейства низкоэнергетических конформеров и доминирующую конформацию в вакууме для каждой исследуемой молекулы (рис.1). Однако весьма важным является изучение структуры молекул в естественной среде их взаимодействия с белками, то есть учет растворителя. Такую возможность предоставляет метод молекулярной динамики (МД) с явным заданием свойств растворителя (воды).

Результаты расчетов методом молекулярной динамики и квантово-химических расчетов представлены на рис. 2, из которого видно, что квантово-химические (B3LYP) и молекулярно-динамические (в воде) (МД) расчеты приводят к наличию одних и тех же низкоэнергетических конформеров в равновесной смеси в пределах каждой молекулы, однако наблюдается перераспределение населенностей конформеров этих молекул при использовании двух методов. Молекулярно-динамические расчеты показали, что в равновесной смеси наиболее биоактивной молекулы брассинолида доминируют два конформера, в которых в пределах диольной системы боковой цепи образуется внутримолекулярная водородная связь Об...Н(О5), а гидроксил ОбН свободен для образования межмолекулярной водородной связи в комплексе БС – рецептор. В менее биоактивной молекуле 24-эпibrассинолида в равновесной смеси присутствуют шесть практически равновероятных конформеров, из которых только в одном образуется внутримолекулярная водородная связь Об...Н(О5) и свободный для образования межмолекулярной водородной связи гидроксил ОбН. Отсюда следует, что конфигурация 22R,23R,24S двух гидроксильных групп и метильной группы боковой цепи брассинолида приводит к таким структурам боковой цепи, в которых гидроксильные груп-

пы могут беспрепятственно участвовать в биохимических процессах в растениях.

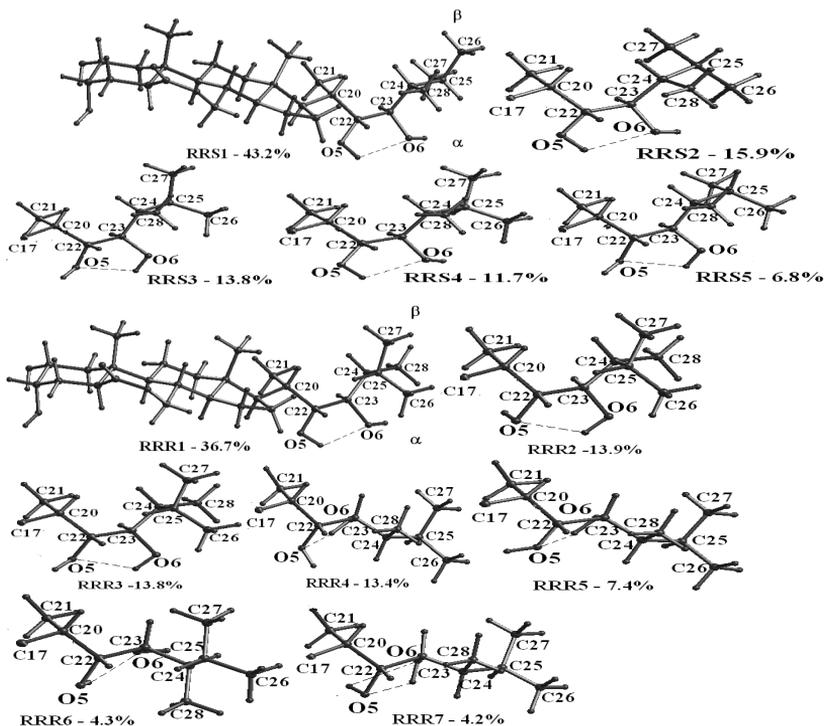
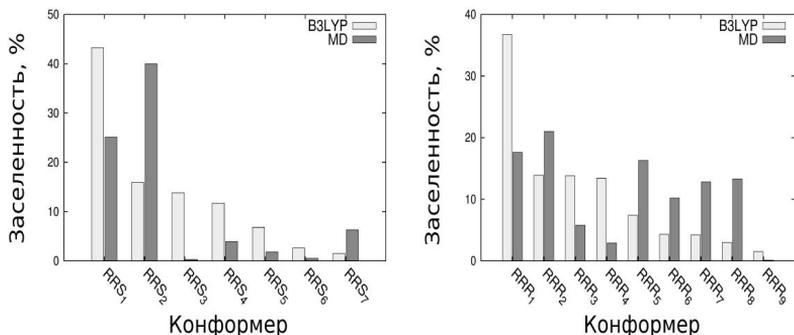


Рисунок 1. Низкоэнергетические конформеры брассинолида ( $RRS_i$ ) и 24-эпибрассинолида ( $RRR_i$ ) с указанием их относительного содержания в равновесной смеси (квантово-химический расчет). Буквами  $\alpha$  и  $\beta$  обозначены стороны от стероидальной плоскости. Для конформеров  $RRS_2 - RRS_5$  и  $RRR_2 - RRR_7$  показана структура боковой цепи.

Таким образом, применение метода молекулярной динамики (МД) с явным заданием свойств растворителя (воды) показало, что для молекулы брассинолида в равновесной смеси доля биологически значимых низкоэнергетических конформеров значительно выше, чем для молекулы 24-эпибрассинолида, что и объясняет ее более высокую биоактивность.



**Рисунок 2.** Населенности конформеров RRS<sub>i</sub> молекулы брассинолида и RRR<sub>i</sub> молекулы 24-эпибрассинолида по данным кванто-химических (B3LYP) и молекулярно-динамических (в воде) (MD) расчетов

## КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ СОСТОЯНИЯ (–)-СПАРТЕИНА

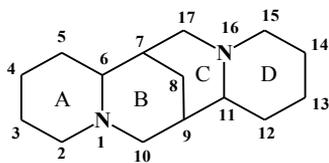
**Арабей С.М.<sup>1</sup>, Павич Т.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский государственный аграрный технический университет,  
Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Алкалоиды люпина, одним из которых является (–)-спартеин, известны главным образом из-за их биологической и биохимической активности [1]. Кроме того, молекулы данного класса алкалоидов являются естественными бидентантными лигандами и находят различные применения в координационной химии и практике, что требует систематических исследований их спектрально-люминесцентных свойств. Цель настоящей работы – интерпретация ИК и КР спектров (–)-спартеина на основе результатов квантово-химических расчетов, а также выявление спектральных проявлений особенностей его молекулярной структуры.

(–)-Спартеин является бисхинолизидиновым алкалоидом с ограниченной конформационной гибкостью (структура изображена ниже). Он представляет собой бесцветную маслянистую жидкость.



Спектр ИК поглощения жидкого (–)-спартеина зарегистрирован на ИК-фурье-спектрометре NEXUS с программным обеспечением OMNIC при спектральном разрешении  $2\text{ см}^{-1}$  и усреднении 256 сканирований при использовании инфракрасного микроскопа. ИК спектр получен для тонкослойного жидкого образца между таллий бромид-йодидными пластинами KPC-5. КР спектр (–)-спартеина был получен на спектрографе «SpectraPro 500i» путем накопления сигнала от 30 сканирований ( $\lambda_{\text{возб}} = 532\text{ нм}$ ). Для регистрации КР спектра (–)-спартеин использован жидкий образец, помещенный в капиллярную стеклянную трубку. Анализ колебательных состояний спартеиновой части молекулы был выполнен на основе квантово-химических расчетов частот и формы нормальных колебаний с привлечением полуэмпирического метода PM3 на базе стандартной компьютерной программы HyperChem с использованием полученных в работе результатов оптимизации геометрической структуры низкоэнергетического конформера спартеина [2].

Как показал эксперимент, большинство колебаний (–)-спартеина активно проявляются как в ИК, так и в КР спектре (на рисунке 1 приведено их сравнение). Видно, что практически для всех колебательных линий можно найти соответствие в двух спектрах. Этот факт свидетельствует о том, что результаты расчетов ИК спектров (частот нормальных колебаний и их форм) можно использовать и для интерпретации КР спектров. В ИК спектре (–)-спартеин в области  $200\text{--}1750\text{ см}^{-1}$  проявляется большое количество линий высокого спектрального разрешения (рисунок 1 (кривая 1)). КР спектр жидкофазного образца (–)-спартеина также имеет богатую колебательную структуру (рисунок 1, кривая 2). Отметим, что литературе, данные по КР спектрам практически не использовались для изучения колебательных состояний алкалоидов люпина, и только в работе [3] представлен КР спектр спартеина сульфата пентагидрата в KBr.

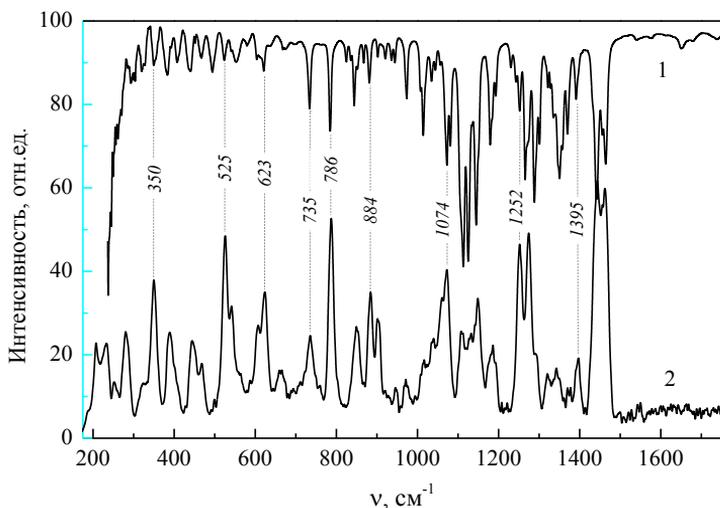


Рисунок 1 – ИК (1) и КР (2) спектры жидкого (–)-спартеина.

Как показали результаты расчета, в области  $1480\text{--}900\text{ см}^{-1}$  ИК и КР спектров (–)-спартеина проявляются в основном деформационные C–N–C и C–C–C колебания сложной формы. Так, колебание с экспериментальной частотой  $1465\text{ см}^{-1}$  соответствует вырожденным плоским деформационным C–N–C колебаниям (расчет дает две колебательные частоты:  $1468\text{ см}^{-1}$  для C17–N16–C15 деформационного колебания и  $1467\text{ см}^{-1}$  для C2–N1–C10 деформационного колебания). Колебания с частотами  $1442$  и  $1430\text{ см}^{-1}$  имеют аналогичные по форме деформационные колебания, но с заметным вкладом валентных N16–C11 и N1–C6 колебаний соответственно. В области  $1390\text{--}1350\text{ см}^{-1}$  проявляются деформационные C–C–C колебания различных пиперидиновых колец. Колебания с частотами около  $1200\text{ см}^{-1}$  соответствуют, согласно расчетам, неплоским колебаниям атомов N16 и N1 соответствующих колец. Сложным деформационным колебаниям атомов А-кольца и А/В-системы соответствуют колебания с экспериментальными частотами  $1035$  и  $973\text{ см}^{-1}$ . Колебание с частотой  $938\text{ см}^{-1}$  принадлежит деформационному C7–C8–C9 колебанию метиленового мостика. Низкочастотные колебания ( $494$  и  $441\text{ см}^{-1}$ ) имеют существенный вклад сложных деформаций D- и А-колец соответственно. Расчеты показывают, что колебания с частотами в области  $200\text{--}400\text{ см}^{-1}$  обусловлены неплоскими или крутильными колебаниями А/В-системы как единого целого.

Полученные экспериментальные сведения о связи химической структуры спартеина со спектральными свойствами (ИК и КР спектры) могут быть использованы при разработке научных основ спектрального экспресс-метода контроля алкалоидности (количественная и качественная оценка) различных природных и техногенных продуктов.

### **Литература**

1. Wink, M. Quinolizidine alkaloids: biochemistry, metabolism and function in plants and cell suspension cultures / M.Wink // *Planta Medica*. – 1987. - Vol.53, Issue 6. - P.509-514.
2. Павич А.А. Теоретические исследования структуры и стабильности конформеров молекулы спартеина / А.А. Павич, С.М. Арабей // Сборник статей Межд. научной конференции "Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем", Минск, Беларусь, – 2012. – Ч.1. – С.65-68.
3. Павич А.А. Перспективы разработки спектрального метода анализа алкалоидов люпина в природных и техногенных продуктах / А.А. Павич, С.М. Арабей, В.А. Чернявский // *Агропанорама*. – 2011. – №4. – С.33-37.

## **СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКСОВ НЕКОТОРЫХ ИНТЕРКАЛЯТОРОВ С ДНК**

**Вардеванян Ц.О., Антонян А.П., Саакян В.Г.**

*Ереванский государственный университет, Факультет Биологии, Кафедра Биофизики, Ереван, Армения*

Изучение особенностей связывания лигандов, содержащих группу ароматических колец с ДНК, имеют практическую важность, поскольку многие из этих соединений проявляют ярко выраженную биологическую активность [1-3]. В последнее время различные лиганды, в том числе бромистый этидий (БЭ), метиленовый синий (МС), все чаще применяются также в качестве биосенсоров, активных редокс молекул, для обнаружения повреждений в ДНК. Эти лиганды являются подходящими сенсорами для обнаружения ДНК в различных образцах, в которых она присутствует в наномолярных концентрациях [2,3].

Важно отметить, что лиганды могут связываться с ДНК несколькими способами, один или несколько из которых могут скрываться под ос-

новным. В частности, БЭ с двухцепочечной ДНК связывается тремя способами – интеркаляционным, полуинтеркаляционным и электростатическим [1], из которых полуинтеркаляционный зачастую скрывается под интеркаляционным и не всегда выявляется с помощью анализа экспериментальных данных. Для прямого экспериментального выявления полуинтеркаляционного способа были получены дифференциальные спектры поглощения комплексов БЭ-ДНК, из которых выявляется, что при низких концентрациях ДНК –  $C_{\text{ДНК}} \ll C_{\text{БЭ}}$ , при  $\lambda=480$  нм наблюдаются отрицательные, а при 540 нм – положительные пики. Это обусловлено тем, что при связывании с ДНК общая концентрация свободных молекул лиганда уменьшается. По мере увеличения концентрации ДНК, абсолютные значения отрицательных и положительных пиков при  $\lambda=480$  нм и  $\lambda=540$  нм соответственно возрастают. В спектрах комплексов БЭ-ДНК проявляется также изобестическая точка при 510 нм, что присуща спектрам абсолютного поглощения этой системы [4]. Мы полагаем, что максимумы при 540 нм в спектрах разностного поглощения соответствуют молекулам БЭ, связанным с ДНК интеркаляционным способом, поскольку этот способ является основным. Подтверждением этого может служить и тот факт, что абсолютные значения изменения поглощений пиков одного и того же спектра не одинаковы: при  $\lambda=480$  нм изменение больше, чем при  $\lambda=540$  нм. Этот факт обусловлен тем, что возрастание абсолютных значений отрицательных пиков спектров разностного поглощения при  $\lambda=480$  нм отражает связывание БЭ с ДНК всеми способами - интеркаляционным, а также полуинтеркаляционным и электростатическим (см. [1]). При этом, существование полуинтеркаляционного способа, наряду с интеркаляционным, является результатом образования реальной изобестической точки [4].

Нами получены также спектры разностного поглощения комплексов метиленового синего (МС) с ДНК. В спектрах разностного поглощения комплексов МС-ДНК также обнаруживаются отрицательные (при  $\lambda=660$  нм) и положительные пики (при  $\lambda=690$  нм), абсолютные значения которых, по мере увеличения концентрации ДНК, также возрастают. Из полученных спектров выявляется, что абсолютные значения пиков при 660 нм и 690 нм по величине мало отличаются друг от друга. Мы полагаем, что в случае МС небольшая разница абсолютных значений отрицательных и положительных пиков обусловлена двумя способами связывания [5]. Для удостоверения этого факта нами приведенные выше спектры были проанализированы с помощью предложенной в работе [4] математической модели. Результаты анализа подтверждают, что в дифференци-

альных спектрах поглощения комплексов МС-ДНК, в противоположность комплексам БЭ-ДНК, реальная изобестическая точка не образуется.

Нами исследовано также связывание другого интеркалятора – акридинового оранжевого (АО) с ДНК и выявлено, что, при низких концентрациях последней, в дифференциальных спектрах поглощения комплексов образуются только отрицательные пики при  $\lambda=490$  нм, абсолютное значение которых возрастает с увеличением концентрации ДНК. При дальнейшем увеличении ее концентрации, в спектрах начинают появляться положительные пики при  $\lambda\approx 505$  нм, абсолютные значения которых с увеличением концентрации ДНК возрастают. Увеличение абсолютных значений отрицательных пиков при 490 нм является результатом того, что концентрация свободных молекул АО уменьшается по мере комплексообразования с ДНК, по сравнению с контролем. Однако, при дальнейшем увеличении концентрации ДНК наблюдается обратное явление – абсолютные значения отрицательных пиков начинают уменьшаться, а положительных пиков при  $\sim 505$  нм увеличиваться. Еще одной особенностью дифференциальных спектров поглощения комплексов АО-ДНК является то, что изобестическая или псевдоизобестическая точка не образуется. Эти спектральные особенности комплексов АО-ДНК можно объяснить, исходя из того, что в случае этого лиганда имеет место два способа связывания, один из которых – интеркаляционный. Этот способ становится основным при больших концентрациях ДНК, этому способу соответствуют пики при  $\lambda\approx 505$  нм и гиперхромный эффект. Аналогичный эффект обнаружен и в случае БЭ. Другой способ по всей вероятности соответствует внешнему способу связывания этого лиганда с ДНК. Наиболее вероятным является электростатический способ, поскольку АО в растворах находится в катионной форме, как БЭ и МС.

Таким образом, полученные данные указывают, что в дифференциальных спектрах комплексов БЭ-ДНК при  $\lambda=510$  нм образуется физически реальная изобестическая точка, в случае комплексов МС-ДНК образуется псевдоизобестическая точка при  $\lambda=670$  нм, в случае комплексов АО-ДНК такая точка не образуется. Полученные данные указывают на то, что изобестическая или псевдоизобестическая точка в спектрах комплексов ДНК с интеркаляторами образуется вследствие полуинтеркаляционного способа связывания последних.

### Литература

1. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T. The Binding of ethidium bromide with DNA: Interac-

- tion with single- and double-stranded structures // Exp. and Mol. Medicine, – 2003. – V. 35, – N6. – P. 527–533.
2. Lin X., Ni Yo., Kokot S. An electrochemical DNA-sensor developed with the use of Methylene Blue as a redox indicator for the detection of DNA damage induced by endocrine-disrupting compounds // Analytica Chimica Acta, – 2015. – V. 867. – P. 29–37.
  3. Jung Yu.K., Park Hy.G. Colorimetric detection of clinical DNA samples using an intercalator-conjugated polydiacetylene sensor // Biosensors and Bioelectronic, – 2015. – V. 72. – P. 127–132.
  4. Вардеванян П.О., Элбакян В.Л., Шагинян М.А., Минасянц М.В., Парсаданян М.А., Саакян Н.С. Определение изобестической точки спектров поглощения комплексов ДНК с бромистым этидием // Журнал прикладной спектроскопии, – 2014. – т. 81, – № 6. – с. 970–973.
  5. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Hambardzumyan L.A., Mechanisms for binding between methylene blue and DNA. // J. Appl. Spectrosc., – 2013. – V. 80, – № 4. – P. 595–599.

## **ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МИЛЛИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА НА КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА**

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

*Ереванский государственный университет, Факультет Биологии,  
Кафедра Биофизики, Ереван, Армения*

В настоящее время электромагнитные волны крайне высоких частот (ЭМИ КВЧ) составляют фон окружающей среды и интенсивно воздействуют на живой материал, влияние которых обнаруживается на различных уровнях организации биологических систем – организменном, тканевом, клеточном и субклеточном [1]. Одной из мишеней воздействия этого фактора является кровь и влияние ЭМИ КВЧ приводит к изменениям различных ее параметров [2]. Показано, что ЭМИ КВЧ влияет на биологические системы в основном опосредовано, через воду, поскольку в указанном выше диапазоне ЭМВ некоторые частоты являются резонансными для воды [3,4].

Для выяснения влияния электромагнитного излучения миллиметрового диапазона (ММ ЭМВ) на биосистемы нами проведены исследования

особенностей денатурации необлученных и облученных ММ ЭМВ резонансной для воды частотой 51,8 ГГц и нерезонансными частотами 41,8 и 48 ГГц образцов сывороточного альбумина из крови человека (САКЧ) в физиологичном растворе. Получены кривые термической денатурации облученных образцов альбумина, которые сдвинуты в сторону более высоких температур, по сравнению с необлученным образцом. Из этих кривых выявляется, что под воздействием 41,8 ГГц белок претерпевает такое конформационное превращение, которое не приводит к полному переходу в клубкообразное состояние, как в случае необлученного, а также облученного при 51,8 ГГц образцов. Мы полагаем, что в этом случае белок приобретает более компактную, уплотненную конформацию. Вероятно, что энергия ММ ЭМВ с частотой 41,8 ГГц поглощается непосредственно молекулами белка, в то время как при облучении с частотой 51,8 ГГц энергия этих волн поглощается опосредовано через воду. В этом случае также структура белка становится более стабильным относительно денатурирующего фактора, однако в меньшей степени.

Исследованы также флуоресцентные характеристики альбумина под влиянием ММ ЭМВ и обнаружено, что конформация альбумина претерпевает определенное изменение при облучении частотой 41,8 ГГц. Это изменение приводит к тому, что единственный триптофан в молекуле белка переходит в более гидрофильное окружение. При облучении частотой 51,8 ГГц, конформационные изменения не столь выражены, чем при 41,8 ГГц. Облучение частотой 48 ГГц практически не вызывает изменений в конформации белка. По всей вероятности, под воздействием ММ ЭМВ имеет место разрушение гидратного слоя ионов, вследствие чего эти освободившиеся молекулы воды структурируются в непосредственной близости от поверхности молекул белка. Этот факт и обуславливает частичное тушение флуоресценции альбумина при облучении образцов 51,8 ГГц. Облучение же частотой 48 ГГц особых изменений не индуцирует.

Однако, при увеличении длительности облучения вдвое (60 мин), интенсивность флуоресценции наибольшая при частоте 51,8 ГГц. Это обусловлено тем, что при этой частоте изменения в гидратной оболочке молекул белка становятся значительными, что приводит к установлению новой конформации молекул альбумина. Мы полагаем, что триптофан смещается в более гидрофобное окружение в молекуле белка, за счет чего длина волны максимальной флуоресценции сдвигается в сторону коротких волн, а интенсивность флуоресценции белка возрастает. При частоте 41,8 ГГц, изменения в конформации альбумина практически не зависят от длительности облучения, что подтверждает вывод о том, что

энергия облучения поглощается непосредственно молекулой белка и, по всей вероятности, есть пороговая уровень энергии, которая вызывает отклик со стороны этой макромолекулы.

Таким образом, облучение ММ ЭМВ альбумина сывороточной плазмы крови человека приводит к конформационным перестройкам молекулы белка. В частности, влияние ММ ЭМВ приводит к изменению флуоресцентных свойств молекул САЧ, обусловленного конформационными изменениями в молекуле альбумина. При этом, физиологический эффект под воздействием ММ ЭМВ получают и' при нерезонансной для воды частоте 41,8 ГГц, и' при резонансной – 51,8 ГГц. Однако, под воздействием 41,8 ГГц конформационные перестройки белка практически не зависят от длительности облучения, в то время как при 51,8 ГГц такая зависимость обнаруживается. Полученные данные также указывают, что ММ ЭМВ могут непосредственно влиять на альбумин, вызывая определенные конформационные перестройки в его пространственной структуре. Это, в свою очередь, приводит к увеличению степени упаковки этого белка, вследствие чего белок денатурирует при более высоких температурах по сравнению с необлученными образцами.

#### Литература

1. Kalantaryan V.P., Babayan Y.S., Gevorgyan E.S., Hakobyan S.N., Antonyan A.P., Vardevanyan P.O. Influence of Low Intensity Coherent Electromagnetic Millimeter Radiation (EMR) on Aqua Solution of DNA // *Progress in Electromagnetics Research Letters*, 2010. – V. 13. – P. 1–9.
2. Ongel, K., Gumral, N., Ozguner, F. The potential effect of electromagnetic field: A review // *Cell membrane and free radical research*, –2009. – V. 1. – P. 85–89.
3. Петросян В.И., Синицын Н.И., Елкин В.А. Роль резонансных молекулярно-воновых процессов в природе и их использование для контроля и коррекции состояния экологических систем // *Биомедицинская радиоэлектроника*, – 2001, – N5-6, с. 62–105.
4. Fesenko E.E., Gluvsteyn A.Y. Changes in the state of water, induced by radiofrequency electromagnetic fields // *FEBS letters*, –1995. – V. 367. – P. 53–55.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ПЛАЗМЕННЫХ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

**Васильева А.Д.<sup>1</sup>, Бычкова А.В.<sup>1</sup>, Чикунова А.П.<sup>1</sup>, Данилова Т.А.<sup>1</sup>, Щеголихин А.Н.<sup>1</sup>, Леонова В.Б.<sup>1</sup>, Костанова Е.А.<sup>1</sup>, Бирюкова М.И.<sup>1</sup>, Кононихин А.С.<sup>1,2</sup>, Бугрова А.Е.<sup>1</sup>, Николаев Е.Н.<sup>1,2</sup>, Розенфельд М.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334 г. Москва, Россия

<sup>2</sup>Учреждение Российской академии наук институт энергетических проблем химической физики имени В.Л. Тальрозе РАН, 119334 г. Москва, Россия, E-mail: ms.kadaver@mail.ru

Окислительный стресс может быть одним из важнейших факторов в патогенезе различных заболеваний, в том числе, атерогенезе и в этиологии тромбоза. Белки, циркулирующие в плазме крови, являются мишенями для активных форм кислорода (АФК) и могут выступать в качестве биологических маркеров окислительного стресса [1]. Было исследовано влияние индуцированного озоном свободнорадикального окисления на структуру и функцию ключевых белков – факторов свертывания крови: фибриногена и плазменного фибринстабилизирующего фактора (рFXIII).

Чувствительность фибриногена к окислительной модификации в 20 раз превышает чувствительность других основных белков плазмы крови (альбумина, иммуноглобулинов, трансферрина, церулоплазмينا) [1]. Таким образом, фибриноген, составляющий около 4% белков плазмы крови, *in vivo* ранее других и в большей степени подвергается окислительной модификации. Молекула фибриногена состоит из двух пар полипептидных цепей  $A\alpha$ ,  $B\beta$  и  $\gamma$ , соединенных дисульфидными мостиками, и включает несколько важных в функциональном отношении структурных областей: центральную область E, две периферические области D, две  $\alpha C$  и две  $B\beta N$  области. В результате действия тромбина происходит отщепление фибринопептидов A и B и экспонирование сайтов, обеспечивающих связывание областей E и D разных молекул фибрина с формированием двуцепочечных протофибрилл.

С помощью метода масс-спектрометрии были проведены исследования, направленные на выявление конкретных сайтов окисления фибриногена в различных структурных единицах молекулы, в том числе аминокислот, участвующих в выполнении ряда функций молекулой, так,

например, модифицируемый при окислении аминокислотный остаток M226 альфа-цепи в нативном белке участвует в процессе фибриногенолиза [2]. Доказанная нами более низкая окислительная чувствительность области E фибриногена по сравнению с областью D (Рис.1) может позволять сохранять в целостности те ключевые участки области E, которые ответственны за связывание тромбина и самосборку фибрина. Усиливающую роль D:D взаимодействий при окислении можно рассматривать как компенсаторный механизм в сборке фибрина, когда нарушены D:E взаимодействия [3].

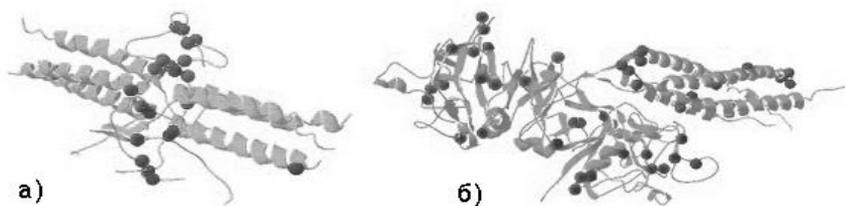


Рис.1 а) E область, с обозначенными сайтами модификации (отмечены черным); б) D область, с обозначенными сайтами модификации (отмечены черным).

В присутствии активной формы фибринстабилизирующего фактора (FXIIIa) фибриновые полимеры подвергаются ковалентному сшиванию посредством образования  $\epsilon/\gamma$ -глутамил-лизиновых изопептидных связей, что способствует стабилизации фибринового сгустка, сопровождающейся увеличением его механической прочности и устойчивости к плазминовой деградации [1].

pFXIII представляет собой гетеротетрамер (FXIII- $A_2B_2$ ) с молекулярной массой 320 кДа, состоящий из двух идентичных одноцепочечных каталитических субъединиц A (FXIII- $A_2$ ), и двух идентичных одноцепочечных регуляторных субъединиц B (FXIII- $B_2$ ), удерживаемых вместе слабыми нековалентными связями [3]. pFXIII циркулирует в крови в виде профермента, его активация сопровождается отщеплением активационного пептида и диссоциацией гетеросубъединиц с образованием FXIII- $A_2'$  и FXIII- $B_2$ .

Методом масс-спектрометрии выявлены модификации некоторых аминокислотных остатков, представленных в субъединицах молекулы (Рис. 2). Показано, что при активации фермента перед окислением число модифицированных аминокислотных остатков возрастает.

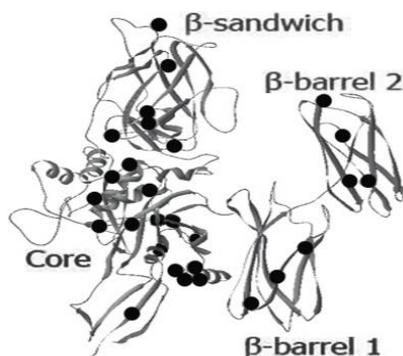


Рис. 2. Каталитическая субъединица А с обозначенными сайтами модификации (отмечены черным).

Снижение устойчивости фибринстабилизирующего фактора к окислению в процессе его активации обусловлено, по-видимому, как конформационными превращениями в каталитических субъединицах делающими ключевые аминокислотные остатки доступными растворителю, так и ослаблением взаимодействий между каталитическими и регуляторными субъединицами, что может служить поводом для предположения способности регуляторной субъединицы также выполнять функцию перехватчика свободных радикалов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 16-34-60244 мол\_а\_дк и № 15-04-08188 а. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского Научного фонда № 14-24-00114.

### Литература

1. Stadtman E. Protein oxidation and aging // *Free Radic. Res.* 2006. – V. 40, – No. 12. – P. 1250–1258.
2. Medved, L.; Weisel, J. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *J. Thromb. Haemost.* – 2009. – V. 7. – P. 355–359.
3. Muszbek L., Berczky Z., Bagoly Z., Komáromi I., Katona É. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmin and cellular functions. // *Physiol Rev.* 2011. – V. 91. – No. 3. – P. 931–972.
4. Rosenfeld M.A., Bychkova A.V., Shchegolikhin A.N., Leonova V.B., Biryukova M.I., Kostanova E.A. Ozone-Induced Oxidative Modification of Plasma Fibrin-Stabilizing Factor. // *BBA – Proteins and Proteomics.* – 2013. – V. 1834, Issue 12. – P. 2470–2479.

## ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕМ-СОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ

**Власова И.И., Смолина Н.В., Федоркова М.В., Мацкевич В.А.,  
Михальчик Е.В.**

*ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия*

Гем-содержащие пероксидазы – это ферменты, имеющие в активном центре гем, доступный для взаимодействия с пероксидом водорода, при этом в результате реакции  $H_2O_2$  восстанавливается до воды, а в активном центре фермента образуется высокорекреационный Compound I (редокс потенциал ( $E^\circ$ ) более 1V). Compound I по одноэлектронному механизму (через Compound II) может окислять ряд простых веществ, которые называются субстратами пероксидаз. Обязательными условиями наличия у гем-содержащего белка пероксидазной активности является свободная 6-ая координационная связь у атома железа в активном центре (и, соответственно, его высокоспиновое состояние), а также специфическое окружение гема аминокислотами для оптимальной координации молекулы  $H_2O_2$ .

Гем-содержащие пероксидазы можно разделить на две группы:

1. Истинные пероксидазы – это ферменты, для которых пероксидазные функции являются основными функциями. Их активный центр устроен так, что в отсутствии пероксидазных субстратов Compound I является относительно долгоживущим радикалом (Рис. 1А). К этим ферментам принадлежат миелопероксидаза (МПО), пероксидаза эозинофилов и лактопероксидаза. Строение активного центра МПО не позволяет ферменту окислять крупные молекулы, небольшие молекулы фенольных соединений могут служить посредниками в этих реакциях [1], Таблица 1.

2. Псевдопероксидазы - гем-содержащие белки, выполняющие важные функции в клетках и изначально не предназначенные для того, чтобы взаимодействовать с  $H_2O_2$ , но в результате изменений окружения и при развитии окислительного стресса они могут превращаться в пероксидазу. В свою очередь, эти белки можно разделить на две подгруппы:

А) Белки, у которых железо гема не имеет аминокислотных лигандов в 6-ом координационном положении, – это гемоглобин и миоглобин. Специальные белки – гаптоглобин и гемопексин – ответственны за то, чтобы убирать опасный гемоглобин и свободный гем из плазмы [2].

Б) Белки, у которых железо гема имеет шесть координационных связей, но под воздействием внешних факторов конфигурация активного

центра изменяется и, превратившись в пероксидазу, эти белки могут выполнять в клетке совершенно новые функции. Такими белками являются цитохром *c* (сyt *c*) и цитоглобин (Cytb).

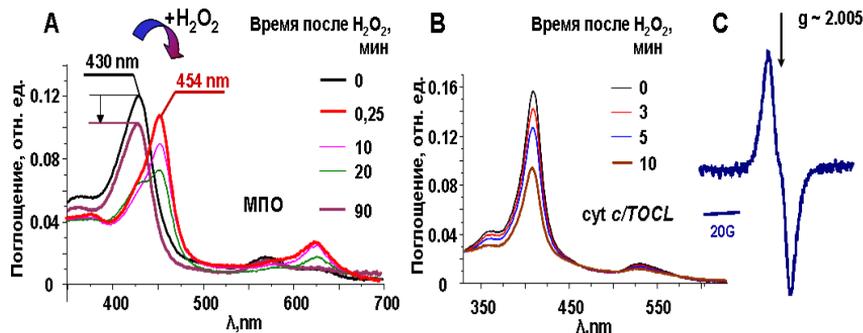


Рисунок 1. Оптические спектры миелопероксидазы (А) и комплекса цитохрома *c* с тетраолеил кардиолипином (ТОСЛ) (В), зарегистрированные через разные промежутки времени после добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (С) – спектр ЭПР (77К) сyt *c*/ТОСЛ через 20 секунд после добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Таблица 1. Пероксидазная активность гем-содержащих белков (μмоль субстрата/мин μмоль белка). Туг\* – тирозильный радикал, ТОСЛ – тетраолеил кардиолипин, РИР – фосфатидилинозитол фосфаты

	Белок	Туг*	Гваякол MW=127, E° ~ 0.9 V	Amplex Red MW=257, E° ~ 0.4 V	Этопозид MW=289, E° ~ 0.4 V
1.	1. МПО МПО+фенол	- +	660 ± 50	54.5 ± 3.2 355 ± 45	0 19.5 ± 2.5
2. А)	гемоглобин миоглобин	+ +	2.26 ± 0.35 0.90 ± 0.05	10.50 ± 1.80 2.20 ± 0.20	0.43 ± 0.05 0.34 ± 0.02
2. Б)	сyt <i>c</i> /ТОСЛ Cytb S-S Cytb S-H Cytb S-H + РИР	+ - - -	0.15 ± 0.04 0.30 ± 0.05 0.05 ± 0.01 0.20 ± 0.04	1.40 ± 0.17 3.20 ± 0.20 0.75 ± 0.02 2.83 ± 0.25	0.41 ± 20 0.28 ± 0.02 0.08 ± 0.01 0.22 ± 0.04

Основные отличия псевдопероксидаз от истинных пероксидаз:

1. Наличие окисляемых аминокислот вблизи активного центра, в первую очередь SH групп, тирозина и триптофана, Рис. 1В, С. Образую-

щиеся тирозильные радикалы имеют  $E^{\circ} \sim 0.9$ , они могут окислять другие молекулы и приводить к образованию агрегатов белковых молекул.

2. Окислительная способность псевдопероксидаз существенно снижена, что наглядно видно по окислению основного пероксидазного субстрата гваякола, Таблица 1.

Электрон-транспортная функция *c* обеспечивается гексакоординационным положением железа в геме белка. Связывание с кардиолипином (CL) приводит к изменению конфигурации активного центра, вызывая потерю или замену дистального лиганда. Это делает возможным взаимодействие гема с малыми молекулами, в том числе с  $H_2O_2$  и пероксидазными субстратами. Низкая пероксидазная активность *c*/CL комплексов биологически обоснована. Задача фермента - окислить тетралинолеил CL на внутренней мембране митохондрий и индуцировать, таким образом, апоптоз, а не приводить к некрозу клетки.

Цитоглобин – гекса-координированный белок, найденный в цитоплазме многих клеток, предположительно обеспечивает транспорт  $O_2$  к митохондриям и регулирует метаболизм NO в клетке. Координация железа в геме может меняться при окислении цистеинов белка и/или в результате его связывания с анионными липидами. В свою очередь, индуцированное цитоглобином окисление этих липидов может приводить к образованию регуляторных липидных молекул [4].

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-00873.

### Литература

1. Vlasova I.I., Feng W.H., Goff J.P., Giorgianni A., Do D., Gollin S.M., Lewis D.W., Kagan V.E., Yalowich J.C. Myeloperoxidase-dependent oxidation of etoposide in human myeloid progenitor CD34+ cells. *Mol. Pharmacol.* – 2011. – V. 79. – P. 479-487.
2. Kapralov A., Vlasova I.I., Feng W., Maeda A., Walson K., Tyurin V.A., Huang Z., Aneja R.K., Carcillo J., Bayir H., Kagan V.E. Peroxidase activity of hemoglobin-haptoglobin complexes: covalent aggregation and oxidative stress in plasma and macrophages. *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – P. 30395-407.
3. Kagan V.E., Tyurin V.A., Jiang J., Tyurina Y.Y., Ritov V.B., Amoscato A.A., Osipov A.N., Belikova N.A., Kapralov A.A., Kini V., Vlasova I.I., Zhao Q., Zou M., Di P., Svistunenko D.A., Kurnikov I.V., Borisenko G.G.. Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat. Chem. Biol.* – 2005. – V. 1. – P. 223-232.

4. Tejero J., Kapralov A.A., Baumgartner M.P., Sparacino-Watkins C.E., Anthonymutu T.S., Vlasova I.I., Camacho C.J., Gladwin M.T., Bayir H., Kagan V.E. Peroxidase activation of cytoglobin by anionic phospholipids: Mechanisms and consequences. *Biochim. Biophys. Acta.* – 2016. – V. 1861. – P. 391-401.

**СРАВНЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ДНК  
ПРОМЕЖУТОЧНЫХ И КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ  
МОДИФИКАЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ПРЕПАРАТОМ  
ЦИСПЛАТИН И ЕГО НЕАКТИВНЫМ АНАЛОГОМ  
ТРАНСПЛАТИНОМ**

**Галюк Е.Н.<sup>1</sup>, Чанг Ч.-Л.<sup>3</sup>, Ринейская О.Н.<sup>1</sup>, Ландо Д.Ю.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>*Кафедра биоорганической химии БГМУ, Минск, Беларусь,*

<sup>2</sup>*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск,*

<sup>3</sup>*Institute of Physics, Academia Sinica, Nankang, Taipei, Taiwan*

Ранее было показано, что и промежуточные монофункциональные, и конечные бифункциональные продукты, образованные противоопухолевым препаратом цисплатин в ДНК, дестабилизируют двойную спираль [1,2]. Наши УФ-спектрофотометрические эксперименты по плавлению показали, что дестабилизация монотонно возрастает со временем инкубации [1]. Для трансплатина картина оказалась более сложной. Для малых времен его инкубации с ДНК в течение 0.5 и 3 часов при 37°C, молярном отношении Pt/нуклеотид  $r_b=0.05$ ,  $[Na^+]=110$  мМ, pH 7 было обнаружено небольшое, но воспроизводимое *уменьшение* температуры плавления  $-0.7\pm 0.2^\circ\text{C}$ . Примерно такое же *увеличение* ( $+0.6\pm 0.25^\circ\text{C}$ ) имеет место после 48-часовой инкубации. Эти результаты нашли подтверждение и в калориметрических исследованиях [2]. Последнее позволяет предположить, что монофункциональные продукты трансплатина дестабилизируют, а конечные продукты – стабилизируют двойную спираль. Однако, смещение температуры плавления незначительно и сопоставимо с погрешностью спектральных и калориметрических экспериментов.

*Цель данного исследования* – точное измерение воздействия на стабильность ДНК промежуточных и конечных продуктов химической модификации трансплатином при помощи сочетания метода дифференциальной сканирующей калориметрии и техники отрицательных вторых

производных, а также сравнение с результатами полученными ранее для цисплатина [1,2].

Мы показали, что метод вторых отрицательных производных позволяет с высокой точностью (до  $0.05-0.1^{\circ}\text{C}$ ) измерить воздействие различных продуктов платинирования на стабильность двойной спирали. На рисунке показаны вторые отрицательные температурные производные калориметрического профиля плавления ДНК до и после обработки трансплатином. Инкубации смеси ДНК и трансплатина проводилась в течение 0 (контроль), 0.5, 3 и 48 часов. К сожалению, четыре узких пика сателлитной ДНК, используемые нами ранее в подобных исследованиях, при платинировании исчезают. Поэтому их нельзя использовать для оценки изменения стабильности. Однако первый минимум на кривой вторых отрицательных производных, хорошо выражен не только для исходной ДНК ( $79.0^{\circ}\text{C}$ , левая вертикальная пунктирная линия на рисунке), но и сохраняется после 0.5 и 3 часовой инкубации с трансплатином. Величина смещения минимума в целом совпадает с изменением температур плавления, но измеряется со значительно более высокой точностью ( $\sim 0.1^{\circ}\text{C}$ ).

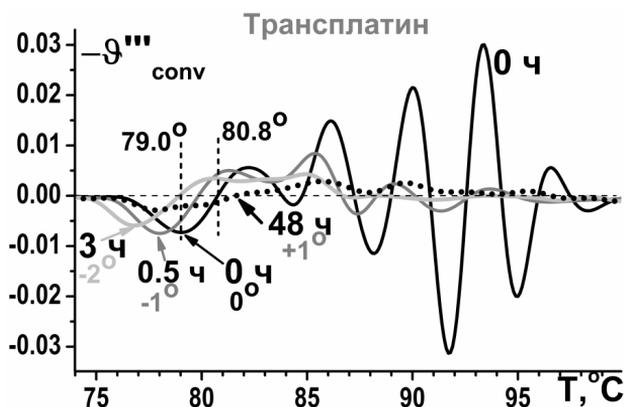


Рисунок – Вторая отрицательная температурная производная калориметрического профиля плавления, нормированного на площадь, до (0 часов) и после инкубации смеси ДНК и трансплатина в течение 0.5, 3 и 48 часов.

Однако после 48 часов инкубации и данный пик сильно искажается. Поэтому мы использовали другую характерную точку - первое пересечение кривых с нулевой осью. Для исходной ДНК это пересечение

обозначено на рисунке вертикальной линией, расположенной при температуре 80.8°C. В данном случае, величины дестабилизации близки к данным, полученным для температуры плавления и для положения минимума. Стабилизация, возникающая после 48 часов инкубации, также хорошо выражена. По величине она несколько меньше по сравнению с определенной по положению минимума. Последнее связано с отмеченной выше деформацией пика.

Полученные результаты показывают, что стабилизация, обусловленная конечными продуктами трансплатина, в основном возникает из-за внутрицепочечных сшивок, поскольку монофункциональные продукты вызывают дестабилизацию, а межцепочечные сшивки не дают достаточной стабилизации. При этом возникает вопрос о механизме увеличения стабильности ДНК внутрицепочечными сшивками, поскольку последние сильно деформируют двойную спираль ДНК. Это проявляется в нарушении тонкой структуры кривой плавления, и в более сильном уменьшении энтальпии перехода спираль-клубок по сравнению с цисплатином [2].

Однако необходимо учитывать, что изменение температуры плавления при платинировании зависит от структурных изменений как спиральной, так и расплавленной форм ДНК. Внутрицепочечная сшивка трансплатина охватывает более длинный участок цепи ДНК по сравнению с цисплатином и поэтому может вызвать более сильные ограничения в подвижности участка расплавленной ДНК, модифицированной трансплатином. Более сильное ограничение вызывает дополнительное уменьшение энтропии расплавленного состояния и энтропию перехода спираль-клубок ДНК [2]. Поскольку температура плавления равна отношению энтальпии и энтропии перехода спираль-клубок ( $\Delta H/\Delta S$ ), дополнительное уменьшение энтропии увеличивает температуру плавления [2].

### Литература

1. Lando, D.Y., et al. Temporal behavior of DNA thermal stability in the presence of platinum compounds. Role of monofunctional and bifunctional adducts // *J. Inorg. Biochem.* – 2012. – V. 117, N 1. – P. 164–170.
2. Lando, D.Y., et al. Comparative thermal and thermodynamic study of DNA chemically modified with antitumor drug cisplatin and its inactive analog transplatin // *J. Inorg. Biochem.* – 2014. – V. 137, N1. – P. 85–93.

# СИСТЕМА ФЕНТОНА И ОЗОН В ИНДУЦИРОВАННОМ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОМ ОКИСЛЕНИИ АЛЬБУМИНА И ФИБРИНОГЕНА

**Горобец М.Г., Бычкова А.В., Сульимова Н.Б., Константинова М.Л.,  
Леонова В.Б., Розенфельд М.А.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской  
академии наук, Москва, Россия*

*e-mail: [maria.g.gorobets@gmail.com](mailto:maria.g.gorobets@gmail.com), [markrosenfeld@rambler.ru](mailto:markrosenfeld@rambler.ru)*

Белки, циркулирующие в плазме крови, являются мишенями для активных форм кислорода (АФК). Цель данной работы – изучение модификации бычьего сывороточного альбумина (БСА) и фибриногена (ФГ) в модельных системах под действием озона и системы Фентона (сФ) – смеси пероксида водорода и соли железа (II).

Известно, что ФГ в 20 раз более чувствителен к окислительной модификации, чем другие основные белки плазмы – альбумин, иммуноглобулины, трансферрин [1]. Относительно альбумина известна его способность перехватывать около 80% АФК плазмы крови, что позволяет рассматривать альбумин как белковый антиоксидант и как биологический маркер патологического окислительного стресса [2]. Генерация свободных радикалов оценивалась с помощью селективных ловушек – о-фенилендиамина (о-ФДА), продукт окислительной модификации которого имеет максимум поглощения на 420-455 нм, а также с использованием терефталевой кислоты (ТФК) и соли (ТФС), образующих при взаимодействии с гидроксильными радикалами и феррильными ионами флуоресцирующие продукты – гидрокситерефталаты.

Проведена оценка влияния продолжительности инкубации образцов (БСА, ФГ, ТФК, ТФС, системы «белок + ТФС/ТФК») с источниками генерации АФК на спектры флуоресценции белков и продукта окисления ТФК/ТФС. Исследован эффект тушения флуоресценции триптофана белков при добавлении сФ, установлено, что его причиной является связывание белками ионов железа [3]. При окислении озоном падение флуоресценции триптофана белка – следствие окисления молекулярным озоном. Проанализировано изменение спектров триптофана белка в зависимости от количества озона (рис. 1). Показано образование битирозино-

вых сшивок внутри молекул белков при индуцированном окислении (рис. 1) [4].

Методом ИК-спектроскопии продемонстрирована способность ТФК и ТФС осуществлять перехват гидроксильных радикалов в модельных системах индуцированного окисления, содержащих белок (рис. 2), в случае действия на белки озона [4].

Количество образующегося  $\text{OH}^*$ , оцениваемого по спектрам флуоресценции окисленных продуктов ТФК/ТФС выше, чем при окислении сФ при равной модификации триптофана белков. Изменение pH (с 7,3 до 6,7) не оказывает воздействия на модификацию триптофана ФГ под действием сФ; при окислении озоном приводит к большей окислительной модификации, обусловленной различным количеством генерируемых АФК.

Проведена оценка влияния растворителя (воды, фосфатного и Трис–HCl буфера), концентрации и соотношения компонентов сФ, продолжительности инкубации железа (II) с белками, растворителем и о-ФДА на кинетику генерации свободных радикалов под действием сФ.

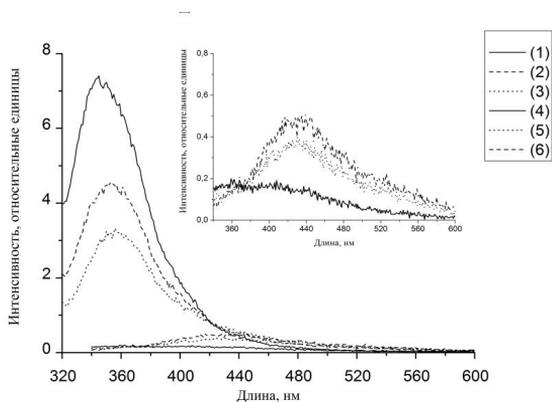


Рис. 1. Спектры флуоресценции, регистрируемые для образцов (волна возбуждения 310, 320 нм): 1,2,3 – триптофан ФГ (2,9 нМ), окисленного  $0, 0,2 \cdot 10^{-7}, 0,6 \cdot 10^{-7}$  моль  $\text{O}_3$ , соответственно; 4,5,6 – битиризинов ФГ (2,9 нМ), окисленного теми же количествами  $\text{O}_3$ .

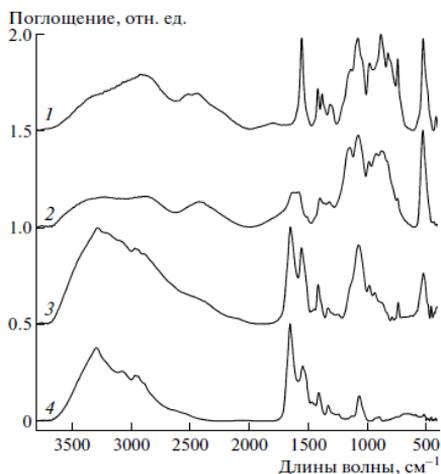


Рис. 2. ИК-спектры компонентов реакции: 1, 2 – спектр неокисленной ТФК ( $1,9 \cdot 10^{-3}$  М) и окисленной озоном ТФК, соответственно, 3 – спектр фибриногена ( $5,9 \cdot 10^{-6}$  М), окисленного в присутствии ТФК ( $1,9 \cdot 10^{-3}$  М), 4 – спектр фибриногена ( $5,9 \cdot 10^{-6}$  М), окисленного в отсутствие ТФК.

Проделанная работа поднимает методологическую проблему описания окислительной модификации белков под действием сФ. Причиной модификации белков признаются свободнорадикальные процессы, а тот факт, что белки способны вступать во взаимодействие с ионами железа, и это взаимодействие может предопределять протекание процесса окисления, часто оказывается вне поля зрения исследователей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 16-34-60244 мол\_а\_дк и № 15-33-70019 «мол\_а\_мос».

### Литература

1. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay / E. Shacter [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1994. – Vol. 17 – P. 429–437.
2. Antioxidant properties of serum albumin / M. Roche [et al.] // *FEBS Lett.* – 2008. – Vol. 582 – P. 1783–1787.
3. Oxygen-dependent oxidation of Fe(II) to Fe(III) and interaction of Fe(III) with bovine serum albumin, leading to a hysteric effect on the fluorescence of bovine serum albumin / X. Xu [et al.] // *J. Fluores.* – 2008 – Vol. 18 (1) – P. 193-201.

4. Усиление роли D:D взаимодействий в самосборке фибрина при окислении / М.А.Розенфельд [и др.] // Докл. Акад. Наук. – 2016. – Т. 466, №2 – С. 233–236.
5. Природа активных промежуточных частиц в процессах индуцированного озонном окисления фибриногена / М.А. Розенфельд [и др.] // Докл. Акад. Наук. – 2015. – Т. 461, №6 – С. 729–732.

## **ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКА С ШУНГИТОВЫМ УГЛЕРОДОМ В ВОДНЫХ НАНО- ДИСПЕРСИЯХ**

**Горюнов А.С., Рожков С.П., Суханова Г.А.**

*ФГБУН Институт биологии Карельского научного центра РАН,  
г.Петрозаводск, Россия*

Понимание фундаментальных взаимодействий новых ультратонких форм углерода с биологическими молекулами, тканевыми структурами и целыми организмами является первоочередным как с точки зрения биомедицинских приложений, так и охраны окружающей среды. В ряду углеродосодержащих материалов, которые преобладают среди наноматериалов, встречающихся в окружающей среде, шунгитовый наноуглерод (ShC) представляет собой один из ярких примеров [1], поскольку он весьма специфичен, довольно широко распространен и активно внедряется в различные биоактивные продукты не всегда с достаточным обоснованием. Важным обстоятельством, сложившимся в исследованиях ShC и его свойств в самое последнее время, является то, что все больше данных говорят о его принадлежности графеновому семейству [1]. Особенности механизма биоактивности ShC малоизучены и недостаточно понятны в отношении роли, которую играет наноуглерод, высвобождаемый непосредственно из шунгитовой породы в результате взаимодействия с водой. В связи с этим мы исследовали эффекты взаимодействия ShC с сывороточными альбуминами в водной нанодисперсии на предмет фракционного состава и структуры белка методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

Термодинамические свойства коммерческого необезжиренного сывороточного альбумина (СА) человека и быка изучались в водных нанодисперсиях ShC при концентрациях белка <1, 5 и 10 г/л с помощью микрокалориметра NanoDSC (TA-Instruments). Использовались полученные

от фирмы Карбон-релиз стабильные водные дисперсии наночастиц ShC (ShCNP) с концентрацией углерода ~0.1 мг/мл, приготовленные согласно методике [2], охарактеризованные с помощью спектрофотометрии UV-Vis, рамановского рассеяния и динамического рассеяния света (ДРС). Размер ShCNP определяется максимумом кривой распределения интенсивности ДРС (Nanosizer NanoZS, Malvern) по размерам при 51 нм и по-луширине 21 нм.

На рисунке показаны примеры термограмм СА в водном растворе и в нанодисперсии ShC и их деконволюции, которые показывают, что полученные термограммы могут быть описаны функцией, составленной из трех гауссовых слагаемых. Эти температурные зависимости парциальной молярной теплоемкости в целом подобны как по соотношению трех переходов, так и по их характеристикам, однако разрешенность переходов в присутствии ShC заметно повышается при всех исследованных концентрациях СА. Проявляется это как гораздо более выраженное низкотемпературное плечо термограммы. При этом существенно изменяется: разница температур 1-го и 2-го переходов, с одной стороны, и 3-го перехода – с другой; соотношение энтальпий переходов в пользу 1-го и 2-го переходов. Это может означать изменение внутримолекулярных межмолекулярных взаимодействий в белковых макромолекулах под влиянием межмолекулярных взаимодействий с ShCNP, но следует учесть соотношение поверхностей контакта белка и наночастиц. Так, даже при сравнимых концентрациях СА и ShC и размере наночастиц 50 нм, только малая доля процента всего белка в дисперсии оказывается в контакте с наночастицей. Это не позволяет ожидать, что даже большие изменения в структуре при таком контакте столь малой доли белка приведут к наблюдаемым значительным изменениям формы термограмм.

Другая возможность – это изменение соотношения фракций белка, различающихся по количеству и/или типу связанных жирных кислот (ЖК). Действительно, при неполном насыщении ЖК центров их связывания на белке, как в коммерческом необезжиренном или полученном из плазмы крови доноров СА, наблюдается раздвоение пика теплопоглощения, причем при снижении насыщения соотношение интенсивностей пиков существенно изменяется в пользу низкотемпературного пика [3]. Именно такого рода изменения формы термограмм в нанодисперсии ShC можно видеть на Рисунке. Это позволяет допустить, что повышение разрешенности пиков в присутствии ShC связано с изменением соотношения фракций белка с разным насыщением в сторону менее насыщенных жирными кислотами фракций, и, вероятно, с переносом ЖК с СА на ShCNP. Быстрый обмен, который имеет место между белковой «коро-

ной» наночастицы и белком в растворе [4], обеспечивает при этом участие в переносе значительной или большей доли белка в нанодисперсии ShC, что определяет и существенный характер изменений формы термограмм.

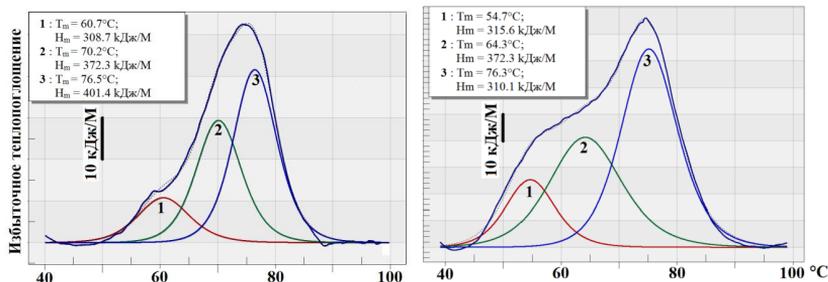


Рисунок - Термограммы сывороточного альбумина человека (САЧ) (0,5 г/л; pH 5,5) (асимметричные кривые). Симметричные кривые и пунктир – гауссовы составляющие и их сумма. Слева – раствор САЧ, справа – САЧ в водной нанодисперсии шунгитового углерода ShC.

Очевидно, здесь проявляется эффект, который используется в процедуре очистки СА от ЖК с помощью активированного угля, однако в данном случае имеет место совершенно иное соотношение концентраций: с преобладанием белка, а не углерода как при очистке. Это делает такой эффект значимым с точки зрения его влияния на связывание лигандов, а, значит, и с физиологической точки зрения, если иметь в виду, например, транспортную функцию СА.

### Литература

1. Rozhkova N.N. Natural graphene-based shungite nanocarbon / N.N. Rozhkova, S.P. Rozhkov, A.S. Goryunov // Carbon Nanomaterials Sourcebook: Graphene, Fullerenes, Nanotubes, and Nanodiamonds. Vol.1. / Ed. K.D.Sattler, Boca Raton. - London, New York: CRC Press Inc. (Taylor & Francis Group), 2016. – P.151–174.
2. Рожкова Н.Н. Наночуглерод шунгитов. - Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. – 2011. – 100 с.
3. Степура И. И. Исследование тепловой денатурации сывороточного альбумина человека в водно-спиртовых и водно-солевых растворах в присутствии органических лигандов / И.И. Степура, Е.А. Лапшина, Н.А. Чайковская // Молекулярная биология. – 1991. – Т.25. – С.337-347.

4. Gossman R. Comparative examination of adsorption of serum proteins on HSA- and PLGA-based nanoparticles using SDS-PAGE and LC-MS / R. Gossman, E. Fahländer, M. Hummel [et al.] // Eur. J. Pharm. Biopharm. - 2015. – V.93. – P.80-87.

## **УСИЛЕНИЕ ГАЛОГЕНМЕТАНАМИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЕМЫХ ТРИПТОФАНОМ ПОВРЕЖДЕНИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ**

**Гуринович В.В.<sup>1</sup>, Воробей А.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup> *Институт физики Национальной академии наук Беларуси,  
Минск, Беларусь*

Значительное усиление индуцируемого УФ-светом разрушения триптофана в растворе и белках в присутствии хлороформа и других галогенорганических соединений сопровождается образованием новых фотопродуктов, спектры поглощения которых локализуются в длинноволновой УФ-области спектра [1]. Увеличение интенсивности достигающей поверхности Земли солнечной УФ-радиации и появление в заметных дозах излучения в области длин волн короче 300 нм остро ставит задачу исследования возможных его неблагоприятных медико-биологических эффектов.

В связи с этим результаты исследований по влиянию на фотонику индольного хромофора в растворе, белках и биологических мембранах галогенорганических соединений – особо опасных загрязнителей окружающей среды, продукты распада которых обладают канцерогенным, мутагенным и эмбриотропным действием, вызывают поражение печени, почек, ЦНС и других органов является весьма актуальным. Галогенорганические соединения не поглощают УФ-излучение экологического диапазона, но оказывают влияние на фотонику различных хромофоров, как при непосредственной диссоциации, так и с помощью физической или химической сенсibilизации [2].

В настоящей работе исследована возможность образования донорно-акцепторных систем на основе триптофана и галогенметанов в клеточных мембранах, реализующих фотоиндуцируемый перенос электронов с синглетно-возбужденных молекул продуктов разрушения триптофана на молекулы галогенорганических соединений с образованием ак-

тивных радикалов. При этом хлороформ-зависимые продукты фоторазрушения триптофана способны выступать в роли фотосенсибилизаторов поврежденных биологических систем: аминокислот, белков, клеток. Ранее нами были получены данные по образованию в клеточных мембранах донорно-акцепторных комплексов на основе порфиринов и галогенметанов с переносом электронов с синглетно-возбуждённых молекул сенсибилизатора на молекулы акцептора (хлороформ, четырёххлористый углерод). Образуемые радикалы галогенметанов проявляют высокую активность в разрушительном действии на основные компоненты мембран – белки и липиды [3].

Добавление хлороформа в раствор триптофана приводит к значительному увеличению фотодеструкции аминокислоты, что проявляется в уменьшении оптической плотности при 280 нм. Поскольку добавление к раствору аминокислоты необлученного или облученного раствора галогенуглеводорода существенно не изменяет спектральные характеристики раствора, увеличение фотодеструкции триптофана обусловлено влиянием хлороформа на фотопроцессы в индольном хромофоре. Причём, хлороформ не является прямым катализатором фотопревращений аминокислоты, а вызывает образование новых продуктов фотодеструкции триптофана. При концентрации хлороформа 35 мМ интенсивность флуоресценции триптофана ( $10^{-4}$  М) уменьшается на ~30%, а квантовый выход фоторазрушения триптофана, увеличивается в 9 раз.

В основе данного процесса, вероятно, лежит перенос электрона от триптофана в синглетном возбужденном состоянии на молекулу галогенуглеводорода с образованием химически активных радикалов последнего. Такое утверждение подтверждает эксперимент по уменьшению скорости фоторазрушения триптофана в присутствии глутатиона, который является перехватчиком промежуточных радикальных продуктов, появляющихся при облучении раствора аминокислоты в присутствии галогенметана (3).

На рис. 1 представлена зависимость интенсивности флуоресценции триптофана в растворе от времени облучения длинноволновым УФ-светом ( $\lambda > 300$  нм) при различных условиях.

Как видно из рисунка, добавление в раствор аминокислоты хлороформа приводит к значительному увеличению фотодеструкции триптофана, что проявляется в снижении интенсивности его флуоресценции. При тех же условиях хлороформ-независимые фотопродукты триптофана сенсибилизируют разрушение менее 3% молекул данной аминокислоты.

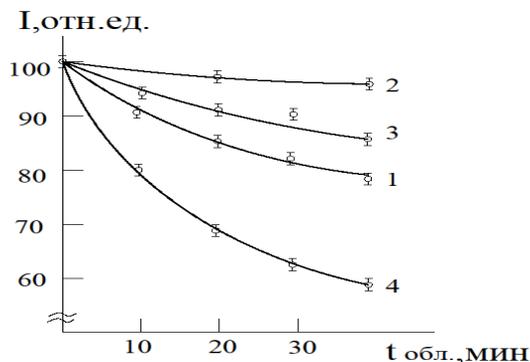


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции триптофана в растворе от времени облучения длинноволновым УФ-светом: в присутствии хлороформ-зависимых продуктов фоторазрушения триптофана -1, в присутствии хлороформ-независимых продуктов фоторазрушения триптофана -2; в присутствии хлороформ-зависимых продуктов фоторазрушения триптофана и  $5 \cdot 10^{-3}$  М азида натрия -3; раствор триптофана в  $D_2O$  -4.

Для выяснения вопроса о механизме наблюдаемых фотосенсибилизируемых повреждений исследовалось влияние известного тушителя синглетного кислорода – азида натрия, и тяжелой воды  $D_2O$ , увеличивающей время жизни  $^1O_2$  в растворе. Как видно из рисунка, азид натрия вызывает незначительное уменьшение, а тяжелая вода – выраженное увеличение сенсibiliзируемого хлороформ-зависимыми продуктами фоторазрушения аминокислоты, что свидетельствует об участии синглетного кислорода в данном процессе.

Особый интерес представляло исследование возможности сенсibiliзации хлороформ-зависимыми продуктами триптофана фотоповреждений клеток. Проведенные исследования действительно показали, что фоторазрушение триптофана в растворе на 20%, приводит к гибели 75% клеток (4).

Полученные данные свидетельствуют о возможности образования донорно-акцепторных систем на основе триптофана и галогенметанов, реализующих фотоиндуцируемый перенос электрона с возбужденных молекул сенсibiliзатора на молекулы акцептора, способных повреждать клетки. Таким образом, образуемые радикалы галогенметанов и галоген-зависимые фотопродукты триптофана способны сенсibiliзировать повреждения аминокислот, белков и клеток при облучении длинно-

волновым УФ-светом. Существенный вклад в такие фотосенсибилизируемые повреждения вносят реакции, протекающие с участием синглетного кислорода.

### **Литература**

1. Воробей А. В., Пинчук С. В., Шуканова Н. А., Черницкий Е. А. // Тез. докл. III конгр. Европ. об-ва фотобиол. Будапешт, 1989. с. 307.
2. Гуринович В.В., Цвирко М.П. // Журн. прикл. спектр. 2001. – Т.68, №1. – с.82-87.
3. Gurinovich V. V. Vorobey A.V. Tsvirko M.P. A new radical mechanism of porphyrin-photosensitized degradation. // High Energy Chemistry. – 2010. –Vol. 44, No. 3. – P.267-271.
4. Воробей А. В., Пинчук С. В., Шуканова Н. А. // Докл. АНБ, 1992. – №6, – с. 562.

### **ОБРАЗОВАНИЕ ТБК-АКТИВНЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ СПИРТОВ, САХАРОВ И РАСТВОРА Na-СОЛИ ГЕПАРИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА**

**Дорошкевич А.С., Сотникова В.В., Беридзе Р.М., Поддубный А.А.,  
Игнатенко В.А., Лысенкова А.В., Кузнецов Б.К.**

*УО Гомельский государственный медицинский университет, Гомель,  
Беларусь*

В работах [1-3], было показано, что под действием свободных радикалов кислорода из спиртов и сахаров получали ТБК-активные продукты, которые при взаимодействии с двумя молекулами тиобарбитуровой кислоты (ТБК) при температуре 90-100°C, образуют окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при 532 нм.

Обычно, триметиновый комплекс образуется при взаимодействии МДА (малоновый диальдегид) с ТБК при прогревании раствора в течение 15 минут при температуре 90-100°C.

В работе было изучено действие свободных радикалов на растворы гепарина с целью получения ТБК-активных продуктов. Гепарин относится к семейству гликозаминогликанов, его молекула содержит несколько полисахаридных цепей связанных с общим белковым ядром.

Свободные радикалы получали в водных растворах при действии ультразвука. Распространяясь в водной среде, ультразвуковые волны



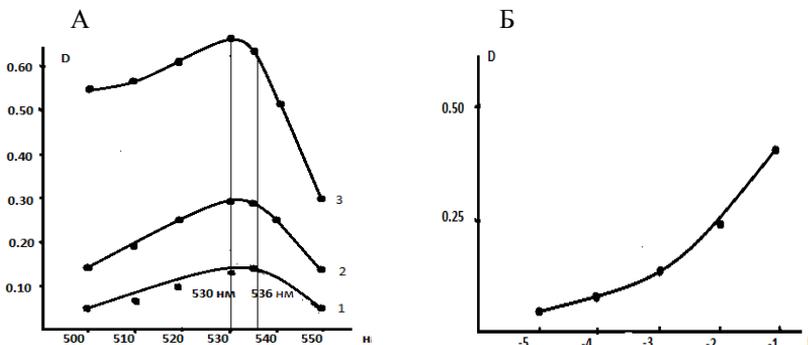


Рисунок 1 – А – Спектр D оптической плотности поглощения ТБК активных продуктов, полученных из раствора Na–соли гепарина: под действием ультразвука: 1 – 10 минут; 2 – 20 минут; 3 – 30 минут интенсивностью  $2 \text{ Вт/см}^2$ , частота 880 кГц. Б – Зависимость образования ТБК активного продукта, полученного из раствора Na–соли гепарина под действием ультразвука : 20 минут интенсивностью  $2 \text{ Вт/см}^2$ , частота 880 кГц от концентрации гепарина. Концентрация Na–соли гепарина мол.м. 25 тыс 5 мл на 15 мл растворителя. pH-5,6.

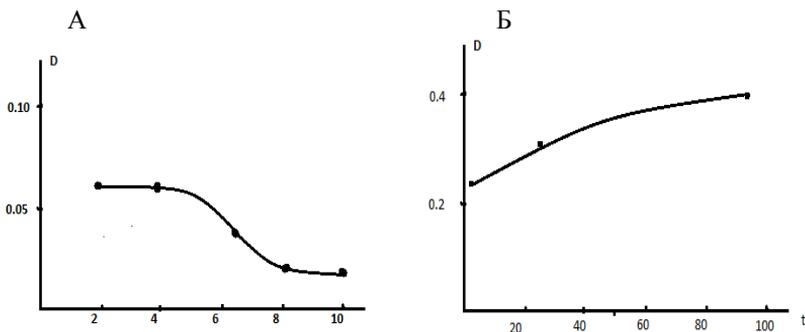


Рисунок 2 – Зависимость образования ТБК активного продукта полученного из раствора Na–соли гепарина: А – под действием ультразвука 20 минут интенсивностью  $2 \text{ Вт/см}^2$ , частота 880 кГц от pH среды. Б – под действием ультразвука 20 минут интенсивностью  $2 \text{ Вт/см}^2$ , частота 880 кГц от температуры облучаемой среды. Исходная концентрация Na–соли гепарина мол.м. 25 тыс, 5 мл на 15мл растворителя.

## Литература

1. Игнатенко В.А. Образование ТБК-активных продуктов из веществ полученных из углеводов и спиртов при взаимодействии с  $\text{FeSO}_4$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  / В.А Игнатенко., А.В Лысенкова., Д.А. Козловский, А.В. Бебешко, А.С. Азаренок // АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНЫ сб. науч. ст. респ. науч.-практ. конф. и 22-й итоговой сессии ГомГМУ (Гомель, 14–15 ноября 2013 года). В 4 томах. Том 2. УО ГомГМУ, г. Гомель. 2014, – С.77–80.
2. Игнатенко В.А. Образование ТБК-активных продуктов из веществ полученных из спиртов под действием ультразвука (УЗ) / В.А. Игнатенко, А.В. Лысенкова, А.В. Бебешко, А.С. Азаренок, Д.А Козловский // АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНЫ сб. науч. ст. респ. науч.-практ. конф. и 22-й итоговой сессии ГомГМУ (Гомель, 14–15 ноября 2013 года) В 4 томах, Том 2. УО ГомГМУ, г. Гомель. 2014, – С.73–77.
3. Лысенкова А.В. Образование ТБК- активных продуктов из веществ полученных из углеводов под действием ультразвука (УЗ) / А.В. Лысенкова, В.А. Игнатенко, А.В. Бебешко, Д.А. Козловский, А.С. Азаренок // АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНЫ сб. науч. ст. респ. науч.-практ. конф. и 22-й итоговой сессии Гомельского государственного медицинского университета (Гомель, 14–15 ноября 2013 года) В четырех томах. Том 3. УО ГомГМУ, г. Гомель. 2014, – С.67–70.

## СПОНТАННОЕ ИСПУСКАНИЕ СВЕТА МОЛЕКУЛЯРНЫМ СИНГЛЕТНЫМ КИСЛОРОДОМ В КОНДЕНСИРОВАННЫХ СРЕДАХ

**Жарникова Е.С., Пархоц М.В., Джагаров Б.М.**

*Институт физики им. Б.И. Степанова, Минск, Беларусь,  
e-mail: [e.jarnikova@ifanbel.bas-net.by](mailto:e.jarnikova@ifanbel.bas-net.by)*

Необходимость детального изучения механизмов образования и дезактивации активных форм кислорода, в том числе синглетного молекулярного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ), обусловлена его использованием при фотодинамической терапии злокачественных и других новообразований. Наличие собственной люминесценции  $^1\text{O}_2$  позволяет проводить прямой спектроскопический контроль его появления и исчезновения. Однако детек-

тирование синглетного кислорода ограничено низкими значениями квантовых выходов ( $\gamma_L$ ) этого вида свечения в конденсированных средах. Величина сигнала напрямую связана с константой скорости ( $k_r$ ) спонтанного излучательного перехода  $a^1\Delta_g \rightarrow X^3\Sigma_g^-$  в молекуле кислорода [1]. Цель работы состояла в изучении влияния диэлектрических свойств среды на излучательную константу скорости перехода  $a^1\Delta_g \rightarrow X^3\Sigma_g^-$  в молекуле кислорода. Для измерений использовали методы лазерной флуориметрии и лазерной кинетической абсорбционной спектроскопии.

Исследования проводили в наборе органических растворителей с постепенно меняющимся показателем преломления среды, а также в бинарной смеси толуол-ацетон (рис. 1, табл. 1).

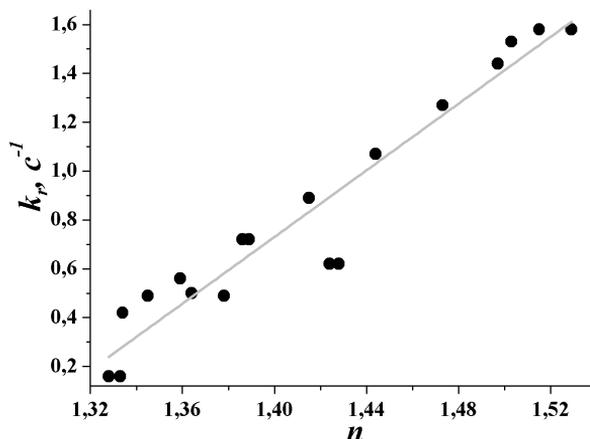


Рисунок 1— Зависимость  $k_r$  от  $n$ .  
Коэффициент корреляции  $R^2=0.93$ :  $y=6.8x-8.8$

В качестве соединения-эталона выступал мезопорфирин IX диметилловый эфир (МП), который использовали в ацетонитриле, ацетоне, бинарной смеси толуол-ацетон, толуоле, 1,4-диоксане, бензоле, 2-пропанол, циклогексане и йодэтаноле. В водных растворах, дейтерированной воде, метаноле, ацетонитриле и этаноле использовали  $TMPrP^{4+}$ . Квантовый выход фотосенсибилизированного образования молекулярного синглетного кислорода для одного и того же фотосенсибилизатора в пределах погрешности измерений не изменяется при переходе от одного растворителя к другому. Методика эксперимента подробно описана в работах [2, 3].

В работе для анализа экспериментальных данных используется подход, который включает в себя учет влияния на излучательную константу скорости  $k_r$ , как внутренних квантово-механических свойств молекулы-излучателя, так и свойств окружающей среды, таких как плотность фотонных состояний и фактор локального поля ( $f$ ), равный отношению напряженности локального поля к напряженности макроскопического электромагнитного поля [4].

Таблица 1 – Абсолютные значения констант скоростей ( $k_r$ ), квантовый выход люминесценции ( $\gamma_L$ ) и время жизни ( $\tau_\Delta$ )  $^1\text{O}_2$

Растворитель	n	$k_r, \text{c}^{-1}$	$\gamma_L \cdot 10^{-5}$	$\tau_\Delta, \text{мкс}$
D <sub>2</sub> O	1.328	0.16	1.09	68
H <sub>2</sub> O	1.333	0.16	0.06	3.8
Метанол	1.334	0.42	0.39	9.5
Ацетонитрил	1.345	0.49	3.26	68
Ацетон	1.359	0.56	2.91	53
Этанол	1.364	0.50	0.64	13
2-пропанол	1.378	0.49	1.06	22.1
Толуол-ацетон (20/80)	1.386	0.72	3.27	46
n-гептан	1.389	0.72	2.15	30.3
Толуол-ацетон (40/60)	1.415	0.89	3.61	41
1,4-диоксан	1.424	0.62	1.74	26.7
Циклогексан	1.428	0.62	1.35	22.2
Толуол-ацетон (60/40)	1.444	1.07	3.78	36
Толуол-ацетон (80/20)	1.473	1.27	3.97	32
Толуол	1.497	1.44	4.26	30
Бензол	1.503	1.53	4.7	30.9
Йодэтан	1.515	1.58	6.96	44.6
Бензонитрил	1.529	1.58	3.35	21.5

Излучательная константа скорости спонтанного испускания молекулярного синглетного кислорода достаточно хорошо коррелируют с линейной зависимостью от показателя преломления среды (рис. 1). Поскольку, фактор локального поля, является функцией от показателя преломления среды, и с учетом линейной зависимости  $k_r$  от  $n$ , можно предположить, что эта зависимость будет носить также линейный характер. Кроме того,  $k_r$  пропорциональна квадрату дипольного момента ( $\mu^2$ ) перехода  $a^1\Delta_g \rightarrow X^3\Sigma_g^-$  в среде ( $\mu \gg \mu_0$ ) [4], который, в свою очередь, как мы предполагаем, зависит от величины поляризуемости среды. Однако

необходимо отметить, что это вывод носит в некоторой мере качественный характер, т.к. отсутствует строго теоретическое выражение, связывающее дипольный момент перехода  $a^1\Delta_g \rightarrow X^3\Sigma_g^-$  и поляризуемость среды.

Анализ полученных результатов показывает, что зависимость излучательной константы скорости от диэлектрических свойств среды определяется следующими эффектами:

- прямым влиянием показателя преломления, обусловленного плотностью фотонных состояний;
- непрямым эффектом через фактор локального поля, который является функцией от показателя преломления;
- непосредственным взаимодействием молекулы синглетного кислорода с молекулой среды (одной или несколькими), в результате которого нарушается симметрия молекулы кислорода, что приводит к усилению дипольного момента перехода  $a^1\Delta_g \rightarrow X^3\Sigma_g^-$ , и как следствие к увеличению излучательной константы скорости люминесценции  $^1O_2$ .

#### Литература

1. Эффективность фотосенсибилизированного водорастворимыми порфиринами образования синглетного кислорода / Б.М. Джагаров [и др.] // Журнал физической химии.– 1987.– Т. 61, № 9.– С. 2450 – 2454.
2. Влияние диэлектрических свойств среды на спонтанное излучение молекулярного синглетного кислорода / Б.М. Джагаров [и др.]// Журн. Прикл. Спектр.– 2012. – Т. 79, № 6.– С. 869 – 874.
3. Dependence of the spontaneous emission of singlet oxygen on the refractive index and molecular polarizability of the surrounding dielectric media / В.М. Dzhagarov [et al.] // Оптика и Спектроскопия.– 2014.– Т. 116, № 6.– С.1003 – 1008.
4. Toptygin, D. Effects of the solvent refractive index and its dispersion on the radiative decay rate and extinction coefficient of a fluorescence solute / Dmitri Toptygin // Journal of Fluorescence.– 2003.– Vol. 13, № 3.– P. 201 – 219.

# ХИРАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ

Жулябина О.А., Твердислов В.А.

*Московский государственный университет имени  
М.В. Ломоносова,  
физический факультет, кафедра биофизики, Москва, Россия*

Синтез белка – это сложный многостадийный процесс, который протекает во всех живых клетках. Он происходит с участием молекул тРНК и мРНК. Основными функциями тРНК является отбор и транспортировка аминокислот к месту синтеза белка. Каждой аминокислоте соответствует своя тРНК. Присоединение аминокислот к тРНК катализируют ферменты аминоацил-тРНК-синтетазы, каждый из которых присоединяет определенную аминокислоту к соответствующей тРНК. АТФ выступает в качестве источника энергии [1].

Как известно, все аминокислоты являются левыми. В основе тРНК, наоборот, лежат правые сахара. Третичная структура тРНК также является правой. Таким образом, правая по первичной и третичной структура молекула тРНК взаимодействует только с левыми аминокислотами. Эта особенность возникла в ходе эволюции и может быть связана с пространственной структурой молекул. В модельной системе, имитирующей добиологическое неферментативное аминоацилирование молекулы – предшественника тРНК, была обнаружена хиральная селективность правых тРНК по отношению к левым аминокислотам. Поскольку энергии связи L- и D-энантиомеров аминокислот с правыми тРНК одинаковы, причины такой селективности имеют кинетический характер. В присутствии ионов натрия и магния боковая цепь правых аминокислот находится очень близко к 3'-ОН группе миниспирали модельной тРНК, в то время как боковые цепи левых аминокислот находятся на значительном расстоянии от этой группы и не мешают протеканию реакции, при этом скорость реакции не зависит от размеров боковой цепи [2].

На данный момент сложно определить конкретный физический фактор, который мог бы повлиять на выбор D-рибозы, а не L-рибозы при создании РНК. Возможно, это произошло в результате важного эволюционного «решения», которое было сделано случайно. тРНК, состоящая из правых молекул рибозы, определяет гомахиральность в реакции аминоацилирования тРНК, приводящую к гомахиральности белков, состоящих из L-аминокислот [3]. Данная гипотеза является продолжением развива-

ющей концепции о знакопеременных хиральных иерархиях: система имеет тенденцию к формированию последовательности иерархических уровней с изменяющимся знаком хиральности заново образующихся структур и с увеличением их относительного масштаба. Это было наглядно продемонстрировано в наших более ранних работах на примере устройства ДНК и белков: правая дезоксирибоза – левые нуклеотиды – правая двойная спираль ДНК – левая суперспираль. Аналогично в белках: левые аминокислоты, правые альфа-спирали и т.д. [4, 5].

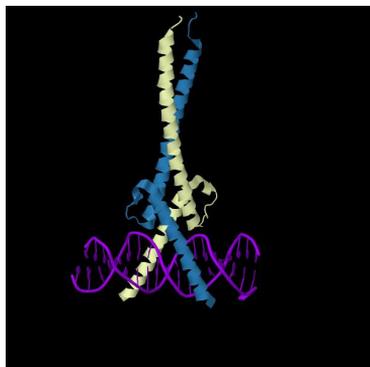
При рассмотрении ДНК-белковых структур также можно выделить несколько наиболее интересных объектов с точки зрения взаимодействия хиральных объектов различных иерархических уровней.

При исследовании надмолекулярных структур прослеживается взаимодействие правых субъединиц. Это можно наглядно продемонстрировать на примере взаимодействия TAL-эффиктора с ДНК в модели из [6]. Правозакрученная ДНК взаимодействует с правой суперспиралью, состоящей из нескольких небольших  $\alpha$ -спиралей (рис.1).



Рисунок 1. Взаимодействие TAL-эффиктора с ДНК [6].

Еще одним ярким примером взаимодействия хиральных структур является взаимодействие по типу «лейциновая молния». «Лейциновая застёжка» образует димерный белок благодаря связыванию двух параллельных  $\alpha$ -спиралей подобно застёжке-молнии [6]. В таком случае правая ДНК взаимодействует с левозакрученными  $\alpha$ -спиралями, которые в свою очередь являются правыми. То есть наблюдается взаимодействие правой третичной структуры ДНК и левой третичной белковой структуры. Тот же самый принцип взаимодействия наблюдается и при взаимодействии транскрипционного фактора Мус с ДНК (рис. 2) [6].



4.

Рисунок 2. Комплекс ДНК и транскрипционного фактора Мус [6].

Данные, представленные в работе, позволяют по-новому взглянуть на взаимодействие нуклеиновых кислот и белков. Дальнейшее развитие идеи о связи хиральности с пространственной структурой различных комплексов белков и нуклеиновых кислот поможет понять важнейший физический аспект молекулярной биологии, касающийся фолдинга, связи структуры и функции биомолекул, а также эволюционные принципы развития сложных систем с хиральной иерархичностью.

### Литература

1. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. – М. : НИИ Биомед. химии РАМН, 1999.
2. Tamura K. Molecular basis for chiral selection in RNA aminoacylation. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – Vol. 12. –P. 4745–4757.
3. Sczepanski J.T., Joyce G.F. A cross-chiral RNA polymerase ribozyme // *Nature*. – 2014. – Т. 515. – №. 7527. – С. 440-442.
4. Твердислов В.А., Ильченко С.А., Малышко Е.В., Жулябина О.А. Хиральность в структурной организации биомолекул // *Вестник науки и образования*. – 2015. – №. 4 (6).
5. Tverdislov V. A. Chirality as a primary switch of hierarchical levels in molecular biological systems // *Biophysics*. – 2013. – Т. 58. – №. 1. – С. 128-132.
6. <http://www.rcsb.org/>; H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne The Protein Data Bank. // *Nucleic Acids Research*, – 2000. – Vol. 28. – P.235-242.

## РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ И ВТОРИЧНЫЕ СТРУКТУРЫ ДНК

Зайкин А.В., Попцова М.С.

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
физический факультет, кафедра биофизики,  
ул. Ленинские горы, д.1, кор.2, г. Москва, Россия, 119991*

Со времени открытия Уотсоном и Криком ДНК-структуры в виде двойной спирали [1], так называемой канонической В-формы, или В-ДНК, были получены экспериментальные доказательства существования структур, отличных от классической В-формы [2]. К таким структурами относятся структуры стебель-петля (известные также как шпильки или крестообразные структуры), триплексы, квадруплексы, А-ДНК, Н-ДНК, Z-ДНК и другие.

Важная роль вторичных структур ДНК была показана для разных геномных процессов, от бактерий до человека. Было показано, что структуры стебель-петля могут функционировать как терминаторы, аттенюаторы, промотеры и рекогниционные элементы [3-5]. В настоящей работе мы рассматриваем отдельный тип вторичных структур – структуры стебель-петля. Данные структуры могут образовываться в местах палиндромных участков последовательностей ДНК или РНК и образовывать шпильку в одинарной последовательности или крестообразную структуру в двойной спирали.

Ранее нами были проаннотированы геномы бактерий палиндромными структурами (аннотация доступна на сайте [www.dnapunctuation.org](http://www.dnapunctuation.org)). Распределение этих структур по геному показало, что в геноме бактерий гены транскрипционных факторов (ТФ) и их окрестности статистически значимо обогащены структурами стебель-петля. Профили плотности покрытия структурами стебель-петля межгенных областей, прилегающих непосредственно к гену, выявили наличие шпилек как в терминаторных, так и в промотерных областях. Хорошо известно, что у бактерий шпильки часто служат терминаторами транскрипции, однако роль шпилек в промотерной области еще плохо изучена.

Транскрипционные факторы – это гены, кодирующие белки-регуляторы множества генов, кодирующих разнофункциональные белки. ТФ обычно связываются с промотерными последовательностями ДНК в областях до 50 нуклеотидов отстоящих от сайта. Однако, остается от-

крытым вопрос, как осуществляется регуляция самих транскрипционных факторов.

Существуют экспериментальные данные, подтверждающие влияние вторичных структур на уровень экспрессии кластера генов [6]. В данной работе было показано, что шпилька между генами *arsC* и *arsD* сильно влияет на экспрессию кластера, но механизмы действия пока еще плохо изучены. Аналогично, регуляция оперона *dra-nupC-pdp* у бактерии *Bacillus subtilis* происходит с посредством шпильки, расположенной в промотерной области оперона [7].

Целью настоящей работы является определение подкласса авторегуляторных ТФ, чья регуляция осуществляется структурами стебель-петля. Для этого был произведен анализ транскрипционной регуляторной сети бактерии *Bacillus subtilis*, из которой были вычленены элементы с положительной и отрицательной обратной связью, в которых участвуют ТФ. Также были определены ТФ, которые потенциально регулируются структурами стебель-петля.

Для этого сначала с посредством эволюционного алгоритма был определен статистически значимый набор параметров структуры стебель-петля в промотерных областях ТФ. В эволюционном алгоритме был использован критерий согласия Пирсона для направленной селекции (чем больше значение критерия, тем лучше набор параметров шпильки). Критерий согласия Пирсона считался для двух вариантов выборки: ТФ противопоставлялись всем остальным генам *B.subtilis* и все авторегуляторные ТФ (ТФ с петлей обратной связи) – всем остальным ТФ.

В случае выборки второго типа с помощью эволюционного алгоритма был найден такой набор параметров, что характеризующие им шпильки были найдены в промотерных областях генов ТФ с петлей обратной связи, а во всех остальных ТФ структуры стебель-петля отсутствовали в принципе. Этот результат говорит в пользу возможной регуляторной роли шпилек, находящихся в промотерных областях ТФ.

Для выборок первого типа было обнаружено 27 генов, имеющих шпильку с определенным набором параметров в промотерной области. В этом случае гены можно было разбить на четыре основных группы: имеющие идентичную шпильку с идентичными координатами (12 генов), имеющие идентичную шпильку с идентичными координатами (4 гена), имеющие идентичную шпильку с идентичными координатами (тоже 4 гена) и все остальные (7 генов).

В первом случае (12 генов) было обнаружено, что вся исследуемая промотерная область (100 нуклеотидов) почти абсолютно идентична у этих 12 генов, хотя гены имеют разные функции (резистентность к мы-

шьяку, регуляция уровня фруктозы и т.д.) и находятся в разных штаммах *B.subtilis*. Вторая и третья группы (по 4 гена) имеют аналогичное свойство (почти абсолютная идентичность исследуемой промотерной области). Четвертая же группа не имеет каких-то явно выраженных общих свойств.

Полученные результаты свидетельствуют о важной роли структур стебель-петля в авторегуляторных циклах ТФ. Требуется дальнейшие исследования генетической сети и усовершенствования методов эволюционного алгоритма для поиска статистически значимых структур в промотерных областях ТФ.

### Литература

1. Watson, J.D. and F.H. Crick, Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid // Nature. – 1953. – V. 171. – P. 737–738.
2. Smith, G.R., Meeting DNA palindromes head-to-head // Genes Dev, – 2008. – V. 22. – P. 2612–2620.
3. Wilson, K.S. and P.H. von Hippel, Transcription termination at intrinsic terminators: the role of the RNA hairpin // Proc Natl Acad Sci U S A, – 1995. – V. 92. – P. 8793–8797.
4. Wong, T.N., T.R. Sosnick, and T. Pan, Folding of noncoding RNAs during transcription facilitated by pausing-induced nonnative structures // Proc Natl Acad Sci U S A, – 2007. – V. 104. – P. 17995–18000.
5. Haasnoot, P.C., et al., A conserved hairpin structure in Alfamovirus and Bromovirus subgenomic promoters is required for efficient RNA synthesis *in vitro* // Rna, 2000. – V. 6. – P. 708–716.
6. Yu, X., et al., Transcriptional and posttranscriptional regulation of *Bacillus sp. CDB3* arsenic-resistance operon *ars1*. // PeerJ, 2015. – V. 3. – P. e1230.
7. Zeng, X. and H.H. Saxild, Identification and characterization of a DeoR-specific operator sequence essential for induction of *dra-nupC-pdp* operon expression in *Bacillus subtilis* // J Bacteriol, 1999. – V. 181. P. 1719–1727.

## МЕХАНИЗМЫ РЕЛАКСАЦИИ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ В КОВАЛЕНТНО-СВЯЗАННОЙ ТРИАДЕ «ТРИПТОФАН-ПОРФИРИН-ХИНОН»

**Зенькевич Э.И.<sup>1</sup>, Кнюкшто В.Н.<sup>2</sup>, Ступак А.П.<sup>2</sup>, Ларкина Е.А.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский национальный технический университет, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт физики им. Б.И. Степанова, Минск, Беларусь*

<sup>3</sup>*Московский Технологический университет, Москва, Россия*

Супрамолекулярная химия представляет собой интенсивно развивающуюся область фундаментальной и прикладной науки, связанную с изучением условий формирования, а также физико-химических и биологических свойств комплексных структур различного состава и морфологии. К этому направлению следует отнести исследования мультимолекулярных систем на основе тетрапиррольных соединений (димеры, тримеры, пентады, дендримеры, порфириновые нанотрубки и т.д.) [1, 2]. Такие объекты являются хорошими моделями для детального исследования путей и механизмов протекания первичных фотопроцессов в фотосинтетических комплексах *in vivo*, а также представляют интерес для нано- и биотехнологий.

В докладе представлены экспериментальные спектрально-флуоресцентные и кинетические характеристики триады, содержащей метилированный дейтеропорфирин IX DpIX(OMe)<sub>2</sub>, триптофан и хинон (Trp-Dp-Q, см. структуру на рис. 1), а также диад «дейтеропорфирин-хинон» (Dp-Q) и «триптофан-дейтеропорфирин» (Trp-Dp). На основании полученных результатов проведен сравнительный теоретический анализ механизмов релаксации возбужденных состояний в таких комплексах (перенос энергии, ПЭ, и фотоиндуцированный перенос электрона, ФПЭЛ) и рассчитаны основные параметры этих процессов.

Оптимизация структуры триады Trp-Dp-Q проводилась по программе HyperChem 7.0 Pro (Methods AM1 and PM3). Вследствие сложности системы и гибкости ковалентного мостика геометрия триады определяется вращением вокруг ковалентных связей спейсера. Расчет конформации с наименьшей энергией осуществлялся последовательным изменением (от 0 до 350° с шагом 10°) пары торсионных углов ковалентного мостика для нахождения областей с наименьшей энергией. После оптимизации, полученной конформации методом Ньютона-Рафсона (градиент 0,01 ккал/(А·моль)), окончательная оптимизация молекулярной структуры осуществлялась при помощи метода Флитчера-Ривса. Расчеты

показали, что в предпочтительной конформации триады триптофан и хинон находятся по разные стороны плоскости порфирина (рис. 1), причем хиноновая субъединица практически параллельна плоскости порфирина (угол  $1-3^\circ$ , расстояние между плоскостями  $d \approx 3.45 \text{ \AA}$ ), а аминокислотная располагается под углом  $45-50^\circ$  ( $d \approx 3.14 \text{ \AA}$ ). Выполненные эксперименты и их анализ дают возможность сопоставить теоретические оценки параметров ПЭ и ФПЭЛ с результатами, полученными из экспериментальных данных для этих процессов.

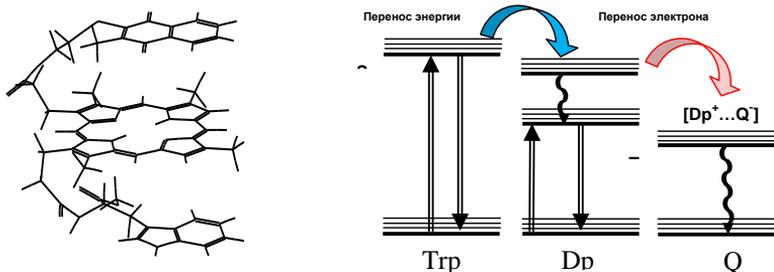


Рисунок 1. Оптимизированная структура триады Trp-Dp-Q, схема электронных состояний и пути дезактивации возбужденных состояний.

Установлено, что в различных растворителях спектры поглощения (270-700 нм) диад и триады практически совпадают с суммарными спектрами индивидуальных компонент, т.е. взаимодействия между Dp, Trp и Q в основном электронном  $S_0$ -состоянии отсутствуют. Параметры флуоресценции порфириновой субъединицы Dp в составе диад практически совпадают с таковыми, полученными для индивидуального Dp, внутримолекулярные константы скоростей дезактивации возбужденного  $S_1$ -состояния порфиринового фрагмента в составе диад с Trp не изменяются.

Показано, что наличие молекулы Q (акцептора электрона) в составе диады Dp-Q и триады Trp-Dp-Q приводит к уменьшению квантового выхода флуоресценции Dp и сопровождается сокращением длительности  $S_1$ -состояния порфирина по отношению к свечению индивидуального порфирина. Это тушение слабо зависит от полярности растворителя. Обосновано, что неэкспоненциальный характер затухания и слабая зависимость тушения флуоресценции Dp от полярности растворителя в диаде и триаде, содержащих акцептор электрона хинон, обусловлены конформационной динамикой этих систем вследствие гибкости ковалентного –

CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO- спейсера. В результате, при 295 К в растворителях с различными физико-химическими свойствами (полярность, вязкость и т.д.) может реализоваться несколько типов конформаций с варьируемыми расстояниями между взаимодействующими хромофорами. На основании сопоставления экспериментальных данных и теоретических расчетов обосновано, что процесс ФПЭЛ от порфирина на хинон в составе диады и триады (см. схему на Рис. 1) является неадиабатическим и относится к «нормальной области» в рамках полуклассической теории Маркуса. Полученные вероятности ФПЭЛ D<sub>p</sub>→Q составляют  $k_{\text{ФПЭЛ}}=1.7 \times 10^7 \div 2.2 \times 10^8 \text{ с}^{-1}$ . Уменьшение вероятности ФПЭЛ при переходе от диады D<sub>p</sub>-Q к триаде T<sub>rp</sub>-D<sub>p</sub>-Q свидетельствует о существенных стерических взаимодействиях между гибкими фрагментами триады, содержащими T<sub>rp</sub> и Q.

Обнаружено, что при 295 К в тетрагидрофуране переход от диады с одной молекулой триптофана (T<sub>rp</sub>-D<sub>p</sub>) к диаде, содержащей две молекулы аминокислоты (T<sub>rp</sub>-D<sub>p</sub>-T<sub>rp</sub>), энергетическое взаимодействие T<sub>rp</sub> и D<sub>p</sub> в диадах проявляется в почти 2<sup>х</sup>-кратном усилении свечения D<sub>p</sub> по отношению к индивидуальному порфирину такой же концентрации (сенсбилизация акцептора энергии) и одновременном тушении флуоресценции T<sub>rp</sub>. Совокупность полученных экспериментальных фактов и проведенных расчетов свидетельствует о том, что в диадах T<sub>rp</sub>-D<sub>p</sub> и T<sub>rp</sub>-D<sub>p</sub>-T<sub>rp</sub> реализуется эффективный диполь-дипольный синглет-синглетный ПЭ T<sub>rp</sub>(D)→D<sub>p</sub>(A) с эффективностью  $\Phi_{\text{ПЭ}} \approx 0.65 \div 0.90$  при расстояниях между донором и акцептором  $r_{\text{DA}} \approx 15 \div 19 \text{ \AA}$  и критическом расстоянии переноса  $R_0 = 40.1 \text{ \AA}$  (схема на Рис.1).

Экспериментальные вероятности процессов ПЭ и ФПЭЛ в рассматриваемых комплексах хорошо коррелируют с теоретическими расчетами с учетом геометрических параметров для оптимизированных структур и вариации этих параметров за счет стерических взаимодействий между молекулярными фрагментами.

Финансовая поддержка работы: ГПНИ «Конвергенция - 2020 3.0.3».

### Литература

1. Zenkevich E.I., von Borczyskowski C. Formation Principles and Excited States Relaxation in Self-Assembled Complexes: Multiporphyrin Arrays and “Semiconductor CdSe/ZnS Quantum Dot-Porphyrin” Nanocomposites. / Handbook of Porphyrin Science. Vol. 22 – Biophysical and Physicochemical Studies of Tetrapyrroles. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore. – 2012. –Chapter 104. – P. 68-159.

2. Zenkevich E.I., von Borczyskowski C. Surface Photochemistry of Quantum Dot-Porphyrin Nanoassemblies for Singlet Oxygen Generation. / Photoinduced Processes at Surfaces and in Nanomaterials. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC. – 2015. – Vol. 1196, Chapter 12. – P. 235–272.

## **КОНКУРЕНЦИЯ ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ И ЭЛЕКТРОНА В САМОСОБИРАЮЩИХСЯ ТРИАДАХ ПОРФИРИНОВ (ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ)**

**Зенькевич Э.И.<sup>1</sup>, Сакевич Л.А.<sup>1</sup>, Степанов М.А.<sup>1</sup>, Килин Д.С.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский национальный технический университет, Минск, Беларусь*  
<sup>2</sup>*Университет Южной Дакоты, США*

Нами разработана методология формирования по принципу «снизу-вверх» («bottom-up») наноразмерных мультпорфириновых структур, основанная на одновременном использовании ковалентного связывания и самосборки нековалентного характера за счет двухточечного координационного взаимодействия по принципу «замок-ключ», и методами стационарной и кинетической лазерной спектроскопии показано, что перенос энергии (ПЭ) и электрона (ФПЭЛ) играют ключевую роль в динамике релаксационных процессов в таких комплексах [1].

Несмотря на определенные успехи в экспериментальном плане, расчет динамики возбужденных состояний электронов или экситонов в таких мультпорфириновых комплексах не является окончательно решенным. Для количественного теоретического анализа полученных нами результатов для триад порфиринов (Рис. 1) представляется целесообразным воспользоваться ХШР-формализмом [3], в котором учет влияния колебательных степеней свободы проводится на основе стохастического изменения энергии электронных состояний.

В качестве модели для триады рассматривается трехуровневая система с участием возбужденных состояний (Рис. 1). Расчет взаимодействия электронных состояний с колебательными модами определяются следующими факторами: 1) Колебательная релаксация значительно быстрее процессов ПЭ и ФПЭЛ (экспериментально наблюдаемые кинетики не проявляют динамических эффектов в диапазоне времен 120 фс–1.4 пс, обусловленных колебательно подструктурой. 2) Высокая частота колебаний реакционной координаты (моды) по сравнению с реорга-

низацией. 3) Безбарьерная конфигурация энергетических потенциальных кривых для состояний  $|1\rangle$ ,  $|2\rangle$ ,  $|3\rangle$  отсутствует. Соответственно, в рамках этой модели динамика возбужденных состояний  $|1\rangle = |^1\text{Димер}^* \dots \text{Лиганд}\rangle$ ,  $|2\rangle = |^1\text{Димер} \dots ^1\text{Лиганд}^*\rangle$  описывается уравнением движения для соответствующей редуцированной матрицы плотности без учета колебательной структуры электронных состояний

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial t} \sigma_{\kappa\lambda} = & -\frac{i}{\hbar} ([H_S, \sigma])_{\kappa\lambda} + 2\delta_{\kappa\lambda} \{ \Gamma_{\mu\kappa} [n(\omega_{\mu\kappa}) + 1] + \Gamma_{\kappa\mu} n(\omega_{\kappa\mu}) \} \sigma_{\mu\mu} \\ & - \sum_{\mu} \{ \Gamma_{\mu\kappa} [n(\omega_{\mu\kappa}) + 1] + \Gamma_{\kappa\mu} n(\omega_{\kappa\mu}) + \Gamma_{\mu\lambda} [n(\omega_{\mu\lambda}) + 1] + \Gamma_{\lambda\mu} n(\omega_{\lambda\mu}) \} \sigma_{\kappa\lambda} \\ & + \{ \Gamma_{\lambda\kappa} [2n(\omega_{\lambda\kappa}) + 1] + \Gamma_{\kappa\lambda} [2n(\omega_{\kappa\lambda}) + 1] \} \sigma_{\lambda\kappa}. \end{aligned}$$

В данном случае гамильтониан триады  $H_S$  включает энергии  $E_\lambda$  соответствующих состояний и энергии взаимодействия между ними (couplings),  $n(\omega) = [\exp(\hbar\omega / k_B T) - 1]^{-1}$  - распределение Бозе-Эйнштейна,  $\Gamma_{\kappa\lambda}$  - константа затухания, индексы  $\kappa, \lambda, \mu = 1, 2, 3$ . Для удобства в численных расчетах параметр  $\Gamma_{\mu\nu}$  и населенность соответствующей моды бассейна  $d_{\mu\nu} = \Gamma_{\mu\nu} |n(\omega_{\mu\nu})|$  заменяется диссипативным переходом  $d_{\mu\nu} = \Gamma_{\mu\nu} |n(\omega_{\mu\nu})|$  и соответствующей дефазировкой  $\gamma_{\mu\nu} = \sum_k (d_{\mu\nu} + d_{\nu\mu})/2$ . В такой модели порфириновая триада описывается в соответствующих поверхностях потенциальной энергии в пространстве с одной координатой реакции, которая отражает поляризацию растворителя, индуцированную полем триады.

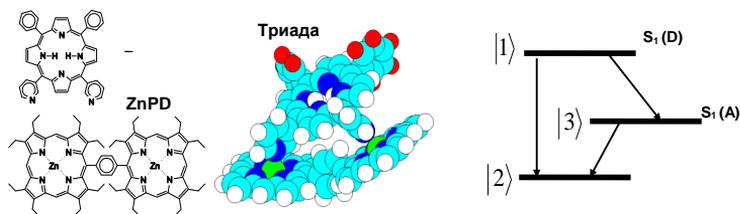


Рисунок 1. Структуры димера ZnPD, экстра-лиганда  $H_2P$  и триады, а также схема возбужденных состояний  $S_1(D)$ ,  $S_1(A)$ , СТ и фотоиндуцированных релаксационных процессов триаде: а) слабый диссипативный перенос энергии, б) последовательный перенос электрона, с) слабый когерентный диссипативный перенос заряда.

Расчеты в рамках рассматриваемой модели ХШР показывают, что конкуренция процессов ПЭ и ФПЭЛ приводит к сложной динамике ре-

лаксационных процессов в триаде. На временном интервале  $t_{\text{ФПЭЛ}} < t < \tau_S$  система достигает квазитермического равновесия между возбужденным состоянием  $|2\rangle$  и близко лежащим состоянием с переносом заряда  $CT\ |3\rangle$ . В рассматриваемом нами случае представляет интерес расчет равновесной населенности  $P_{DA^*} = \rho_{33}$  состояния  $|2\rangle$ , который можно численно реализовать методом ХШР. С учетом найденных теоретических параметров для электронных и электронно-колебательных взаимодействий в рассматриваемой триаде расчеты показали, что равновесная населенность  $P_{DA^*}(\infty)$  убывает в двух случаях: 1) при понижении (стабилизации) энергии СТ-состояния (индуцированная ростом полярности растворителя) и 2) с понижением температуры (т.е. уменьшением термического заселения локально-возбужденного состояния  $|2\rangle$  из СТ-состоянием  $|3\rangle$ ).

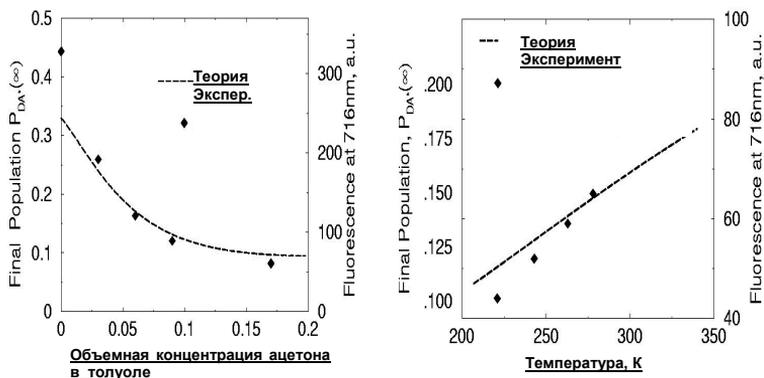


Рисунок 2. Сопоставление экспериментальных данных (черные точки) и теоретических расчетов (пунктирные линии) зависимости интенсивности флуоресценции экстра-лиганда  $H_2P$  в составе триады от температуры (А) и полярности (Б) растворителя.

Как видно из Рис. 2, теоретические зависимости равновесной населенности  $P_{DA^*}(\infty)$  локально-возбужденного синглетного состояния экстра-лиганда  $|2\rangle = |\text{Димер} \dots \text{Лиганд}^*\rangle$  от температуры и полярности окружения находятся в разумном соответствии с наблюдаемым в эксперименте тушением флуоресценции экстра-лиганда  $H_2P(m^{\wedge}Pyg)_2-(iso-PrPh)_2$  в составе триады  $(ZnOEP)_2Ph \otimes H_2P(m^{\wedge}Pyg)_2-(iso-PrPh)_2$  с ростом температуры и объемного содержания ацетона в толуоле. Расчеты предсказывают, что при высокой концентрации ацетона изменение темпера-

туры может индуцировать переход от когерентного к некогерентному типу зависимости.

Финансовая поддержка работы: ГПНИ «Конвергенция - 2020 3.0.3».

### **Литература**

1. Zenkevich E.I., von Borczyskowski C. // J. Porphyrins and Phthalocyanines.- 2014. - Vol. 18, - P.1–19.
2. Zenkevich E.I., von Borczyskowski C. / Multiporphyrin Arrays: Fundamentals and Applications. Pan Stanford Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore. – 2012. Chapter 5. –P. 217-288.
3. Schreiber M., Kilin D., Kleinekathoefer U. // J. Lumin. – 1999. – Vol. 83-84. – P. 235-243.

## **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КУРКУМИНОИДОВ С НАТИВНЫМ И МОДИФИЦИРОВАННЫМ БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ**

**Капустин М.А., Чубарова А.С.**

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

В последнее десятилетие проводятся интенсивные исследования биологически активных веществ (БАВ), содержащихся в корнях куркумы (*Curcuma longa* L.). Основными БАВ куркумы являются диарилгептаноиды – куркумин (С), деметоксикуркумин (DMC) и бисдеметоксикуркумин (BDMC), а также эфирное масло. Кроме этих трех основных куркуминоидов описан ряд их производных, содержащихся в корне куркумы в минорных количествах [1]. Препараты куркуминоидов обладают различными биологическими активностями: антиоксидантной, противораковой, антирадикальной, гепатопротекторной и пр. Лекарственные композиции на основе БАВ куркумы обладают высоким терапевтическим потенциалом. Однако эффективность применения препаратов на основе куркумина ограничена крайне низкой водорастворимостью куркуминоидов и их невысокой термо- и фотостабильностью [1]. Возможным путем решения проблемы может являться получение комплексов включения куркуминоидов с макроциклическими олигосахаридами [2].

Целью работы являлось изучение взаимодействия куркуминоидов с нативным и модифицированным бета-циклодекстрином и определение влияния циклодекстринов на растворимость куркуминоидов в воде.

Материалы и методы исследования.

В качестве объекта исследования был взят препарат суммарной фракции куркуминоидов (полученный из корней *Curcuma longa* L.). В работе использовались бета-циклодекстрин (BCD, М.в. = 1134,98 г/моль, «Sigma»), 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрин (HPBCD, М.в. = 1396 г/моль, «Sigma»), спирт этиловый технический (96%, марка «Экстра-М», ГОСТ 18300-87, ОАО «Белхим»), вода деионизированная MiQ, ацетон (ч.д.а., гост 2603-79, ЗАО «Экос-1»), петролейный эфир 50/70 (ТУ 0251-001-44995515-08, ООО «МНПП Химфа»), ацетонитрил (HPLC Gradient grade, Fisher Chemical), уксусная кислота ледяная (ХЧ, ГОСТ 61-75, АО «Реахим»).

Экстракцию куркуминоидов проводили в аппарате Сокслета в течение 5 часов ацетоном при температуре 60°C, при соотношении сырье:экстрагент 1:8. Полученный экстракт сконцентрировали на роторном испарителе при пониженном давлении и получили олеорезин. Суммарная фракция куркуминоидов была выделена методом перекристаллизации при растворении олеорезина корня куркумы в петролейном эфире [3]. Анализ состава полученного препарата куркуминоидов, растворимость в деионизированной воде при pH 5,7 и 30 °C и соотношение куркуминоидов в водном растворе проводили методом ВЭЖХ с использованием хроматографической системы Agilent 1100/1200 Series на обратной фазной колонке Zorbax SB-C18 (3.5 мкм, 4.6x250 мм) в изократическом режиме; компоненты подвижной фазы – вода/ацетонитрил/уксусная кислота; скорость потока 1 мл/мин. Детекцию куркуминоидов проводили на длине волны 425 нм. Концентрацию куркуминоидов в образцах определяли методом калибровочных кривых, построенных для индивидуальных куркуминоидов: бисдеметоксикуркумина (BDMC), деметоксикуркумина (DMC) и куркумина (C). Стандарты веществ куркуминоидов были получены методом препаративной ТСХ. Анализ взаимодействия компонентов препарата куркуминоидов с BCD и HPBCD в водном растворе проводили с использованием метода фазовой растворимости. Оценку растворимости образующихся комплексов включения (кавататов) куркуминоидов с циклическими олигосахаридами проводили путем определения типа кривой фазовой растворимости [4].

Результаты и их обсуждение.

Полученные экспериментальные данные позволили установить, что растворимость куркуминоидов после инкубации 2 мг препарата в 3 мл

деионизированной воды при интенсивном перемешивании в течение 24 часов при pH=5,7 и температуре 30 °C составила 0,105 мг/л. С использованием метода ВЭЖХ было установлено, что в растворенной фракции куркуминоидов доля BDMC, DMC и C составила 65,53%, 22,98% и 11,49% соответственно. При инкубировании препарата куркуминоидов в системе с разными концентрациями BCD была достигнута максимальная растворимость куркуминоидов – 23,43 мг/л при концентрации BCD 21,32 мМоль/л. При этом доля BDMC, DMC и C составила 82,1%, 14,8% и 3,1% от общего количества растворившихся куркуминоидов соответственно. Дальнейшее увеличение концентрации BCD в системе было ограничено растворимостью BCD при данных условия.

При инкубировании препарата куркуминоидов в системе с разными концентрациями HPBCD была достигнута растворимость куркуминоидов – 389,12 мг/л при концентрации HPBCD 100 мМоль/л. При этом доля BDMC, DMC и C составила 34,38%, 30,32% и 35,3% от общего количества растворившихся куркуминоидов соответственно. Исходя из графика фазовой растворимости, предел растворимости препарата куркуминоидов не был достигнут при данных условиях. Следует отметить, что соотношение куркуминоидов в водной фазе меняется с увеличением концентрации HPBCD в системе, а при увеличении концентрации BCD – соотношение куркуминоидов в водной фазе сохраняется практически неизменным.

Анализ диаграммы фазовой растворимости показал, что растворимость куркуминоидов возрастает с увеличением концентрации BCD и HPBCD в системе, что позволяет сделать вывод о формировании комплексов включения куркуминоид:циклодекстрин. При этом, циклодекстрины выступают в качестве вещества «хозяина», в гидрофобные полости молекул которых встраиваются неполярные участки молекул вещества «гостя». В случае внесения в систему BCD, диаграмма фазовой растворимости имеет характер Vs-типа, в связи с низкой растворимостью самого BCD и образованием малорастворимых кавитатов куркуминоидов с циклодекстрином. В случае использования в качестве солюбилизующего агента HPBCD, были получены кривые фазовой растворимости A-типа, что свидетельствует об образовании высокорастворимых комплексов включения.

Таким образом, в водных растворах происходит конкурентное взаимодействие куркуминоидов с BCD и HPBCD. При внесении в систему BCD наблюдается увеличение растворимости препарата куркуминоидов более чем в 220 раз, а в случае HPBCD – более чем в 3700 раз, по сравне-

нию с растворимостью препарата куркуминоидов при указанных условиях в деионизированной воде в отсутствие циклодекстринов.

### Литература

1. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises / P. Anand [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2007. – Vol. 4, № 6. – P. 807–818.
2. Капустин, М.А. Получение и свойства комплексов включения циклодекстрина с диметилловым эфиром фталевой кислоты / М.А. Капустин, Н.В. Гавриленко, В.П. Курченко // *Труды БГУ*. – 2011. – Том 6, ч. 2. – С. 126–133.
3. Isolation, Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L.) by Column Chromatography / S. Revathy [et al.] // *Journal of Experimental Sciences*. – 2011. – Vol. 2, № 7. – P. 21–25.
4. Characterization study of resveratrol/sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex and in vitro anticancer activity / V. Venuti [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – Vol. 115. – 2014. – P. 22–28.

## ХЕЛАТИРОВАНИЕ ФЛАВОЛИГНАНАМИ ИЗ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ ДВУХВАЛЕНТНЫХ ИОНОВ КОБАЛЬТА И СВИНЦА

Капустин М.А., Чубарова А.С.

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Загрязнение окружающей среды различными поллютантами: радионуклидами, нитросоединениями, пестицидами и другими токсичными веществами, приводит к появлению их в пищевых продуктах. Эти вещества могут попадать и накапливаться во внутренней среде организма. Одними из самых опасных загрязнителей экосистемы являются тяжелые металлы. В качестве объектов исследования были выбраны кобальт и свинец, так как они в значительных объемах используются в промышленном производстве и в результате накопления во внешней среде представляют серьезную опасность вследствие высокой биологической активности и токсичности [1]. Попадание и накопление в организме человека ионов этих металлов приводит к различным заболеваниям, и, прежде всего, повреждается печень, как орган, который выполняет барьерную функцию между внешней и внутренней средой организма. Одними из основных лекарственных средств, применяемых для профилактики и ле-

чения заболеваний печени, являются гепатопротекторы. Среди них широко используются лекарственные средства на основе комплекса биологически активных веществ, получаемых из экстракта плодов расторопши пятнистой (*Sylibum marianum* L. Gaertn.) [2]. Плоды расторопши пятнистой богаты флаволигнанами – веществами, относящимися к группе фенолпропаноидных соединений, сумма которых называется силимарином. Преобладающими флаволигнанами, содержащимися в силимарине являются: силибинин, силикрестин и силидианин [3]. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* установлено, что силимарин и входящие в его состав флаволигнаны проявляют ряд важных биологических активностей. Актуальным является поиск новых активностей, свойственных данным соединениям. Поскольку флаволигнаны обладают гепатотропностью, представляется перспективным обнаружение и характеристика хелатирующих свойств этих веществ для определения гепатопротекторного действия при токсическом воздействии тяжелых металлов на организм человека.

Цель нашей работы состояла в определении хелатирующей активности флаволигнанов: силибинина, силикрестина и силидианина в отношении ионов кобальта (II) и свинца (II).

Методы исследования. В работе использовали спектрофотометрические методы: процесс комплексообразования сопровождался изменениями в спектрах поглощения нативных флаволигнанов. Определение стехиометрических соотношений лигандов и ионов металлов проводили по методу Остромысленского-Джоба (метод непрерывных изменений или изомольярных серий) и по методу Бента-Френча [4]. Прочность полученных комплексов оценивали по величине константы их образования. Константы образования комплексных соединений флаволигнанов с ионами металлов были определены по уравнению Накагуры [5].

Результаты и обсуждения. Показано, что флаволигнаны обладают способностью связывать ионы кобальта (II) и свинца (II). При соэкспонировании в метаноле силибинин, силикрестин и силидианин образуют комплексные соединения с ионами этих металлов в соотношении 3:2.

Процесс образования комплекса сопровождается изменениями спектральных характеристик исходных флаволигнанов. Известно, что в спектре поглощения нативных флаволигнанов присутствуют две характерные полосы: I – в области 320–420 нм и II – в области 240–285 нм. Полоса I обусловлена поглощением В-кольца, а полоса II – кольца А. Для проведения спектральных исследований комплексообразования готовили серию растворов с постоянной концентрацией флаволигнана ( $1 \times 10^{-3}$  моль/л) и возрастающей концентрацией ионов кобальта (II) и свинца (II). Измерение оптической плотности этих растворов проводили в диа-

пазоне длин волн 200–800 нм. Увеличение концентрации ионов металла в растворах силибинина и других флаволигнанов, приводит к появлению нового пика в спектре поглощения, что свидетельствует о протекании процесса комплексообразования.

Комплексообразование сопровождалось изменениями в спектрах поглощения исходных флаволигнанов в области полосы поглощения I, где происходило образование нового максимума поглощения. Флаволигнаны не имеют двойной связи в кольце С и катехольной группы в кольце В, что определяет возможность таких изменений спектра поглощения в полосе I в процессе хелатирования ионов металлов. Наличие двойной связи в кольце С и катехольной группы в кольце В у некоторых флавоноидов обуславливает батохромный сдвиг характеристического пика.

Соотношение компонентов в образовавшемся комплексе оценивали методом Бента-Френча, основанном на построении логарифмической зависимости величин оптической плотности от концентрации ионов металлов в растворе ( $\lg A f(\lg[Cu])$ ). При этом стехиометрический коэффициент компонентов, входящих в комплекс, соответствует тангенсу угла наклона прямой. Для комплексов ионов исследуемых металлов с силибининном, силикрестинном и силидианином тангенс угла наклона прямой соответствовал стехиометрическому соотношению компонентов 3:2.

Для подтверждения полученных результатов стехиометрических соотношений компонентов в комплексах дополнительно был применен метод Остромысленского-Джоба (метод непрерывных изменений). Этот метод основан на определении соотношения изомолярных концентраций реагирующих веществ, которые отвечают максимальному выходу образующегося комплексного соединения. Кривая зависимости выхода комплекса от соотношения компонентов характеризуется по положению экстремума. Оно соответствует максимально возможному содержанию комплекса лиганда с ионом металла в растворе. Положение экстремума на кривой связано со стехиометрическими коэффициентами. Структурные особенности флаволигнанов являются результатом формирования комплексов с высокой стехиометрией: Ме:Лиганд – 2:3.

Анализ значений констант образования комплексов для исследованных флаволигнанов показал, что из-за отсутствия двойной связи в кольце С, в метаноле они образуют менее прочные комплексы с ионами металлов по сравнению с флавоноидами.

Работа поддержана грантом БРФФИ №М15М–111.

## Литература

4. Донник И.М. Оценка здоровья животных в территориях химического и радиоактивного загрязнения / И.М. Донник // Зоотехния. – 2003. – №10. – С. 20–23.
5. Мараховский Ю.Х., Рубенс Ю.П. Гепатопротекторы: потенциальные возможности и ограничения защиты печени // Медицина. – 2004. – №1. – С. 9–13.
6. Corchete P. *Silybum marianum* (L.) Gaertn: the source of silymarin // Bioactive molecules and medicinal plants / K.G. Ramawat, J.M. Merillon. – Springer Berlin Heidelberg, 2008. – P. 123–148.
7. Pekal A. Interaction of quercetin with copper ions: complexation, oxidation and reactivity towards radicals / A. Pekal, M. Biesaga, K. Pyrzynska // Biometals. – 2010. – Vol. 24, № 1. – P. 41–49.
8. Лапочкин О.В. Получение и изучение комплексных соединений ванадила с аминокислотами: глицин,  $\alpha$ -аланин,  $\beta$ -аланин: автореф. дис. канд. фарм. наук: 15.00.02 / О.В. Лапочкин; Пятигорская государственная фармацевтическая академия. – Пятигорск, 2008. – 22 с.

## КОМПЬЮТЕРНЫЙ СКРИНИНГ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОНИКНОВЕНИЯ ВИЧ-1 – ПЕПТИДОМИМЕТИКОВ НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА 10E8

**Кашин И.А.<sup>1</sup>, Тузиков А.В.<sup>2</sup>, Андрианов А.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биоорганической химии Национальной академии наук  
Беларуси, Минск, Беларусь, andrianov@iboch.bas-net.by*

<sup>2</sup>*Объединенный институт проблем информатики Национальной  
академии наук Беларуси, Минск, Беларусь, tuzikov@newman.bas-net.by*

ВИЧ-1 проникает в клетку-хозяина путем последовательного взаимодействия белка gp120 оболочки вируса с первичным рецептором CD4 и хемокиновыми корецепторами CCR5 или CXCR4 [1]. В результате этих взаимодействий происходят структурные изменения gp120, которые активируют трансмембранный белок gp41, что приводит к слиянию оболочки вируса с клеточной мембраной и последующему внедрению генома ВИЧ в клетку-мишень [1]. В последние годы обнаружены моноклональные антитела (МКА) к ВИЧ-1 с широкой нейтрализацией, распозна-

ющие консервативные участки связывания белка gp120 с рецептором CD4 и корецепторами, а также важный для слияния мембраны вируса с мембраной клетки-мишени участок MPER (Membrane-Proximal External Region) белка gp41 [2]. Обнаружение антител с широким спектром нейтрализующей активности и установление механизмов их действия является важным шагом к разработке эффективной вакцины и лекарственных препаратов против ВИЧ-1. В связи с этим представляется актуальным поиск низкомолекулярных соединений, способных имитировать фармакофорные свойства антител с широкой вирусной нейтрализацией.

В настоящей работе проведен компьютерный скрининг химических соединений – потенциальных пептидомиметиков МКА 10e8, представляющего одно из самых эффективных антител к ВИЧ-1, которое нейтрализует около 98 % вирионов из различных подтипов вируса путем специфического связывания с участком MPER белка gp41 [3]. Выполнена оценка нейтрализующей активности найденных соединений с последующим отбором молекул – наиболее вероятных ингибиторов проникновения ВИЧ-1, механизм действия которых основан на блокировании сегмента MPER оболочки вируса, критического для ее слияния с мембраной клетки-мишени. Для решения этой задачи проведены следующие исследования:

1. Осуществлены молекулярно-динамические (МД) расчеты структурного комплекса участка MPER белка gp41 с Fab-фрагментом МКА 10e8 [3] и идентифицированы аминокислотные остатки антитела, ответственные за связывание.

2. На основе полученной информации сформированы модели фармакофора для компьютерного скрининга потенциальных пептидомиметиков антитела в базе данных MMsINC [4] и с помощью программного обеспечения веб-сервера рерMMsMIMIC [5] отобраны химические соединения, удовлетворяющие заданным критериям поиска.

3. Методами молекулярного докинга построены структурные комплексы найденных соединений с пептидом MPER ВИЧ-1, проведен их анализ и отобраны лучшие по значению оценочной функции молекулы.

4. Методами молекулярной динамики исследованы конформационные и энергетические характеристики комплексов и рассчитаны средние значения свободной энергии их образования.

Компьютерный скрининг базы данных MMsINC [4] позволил обнаружить 3036 потенциальных пептидомиметика МКА 10e8. В результате оценки эффективности их связывания с пептидом MPER методами молекулярного моделирования были идентифицированы восемь соединений, характеризующихся отрицательными значениями свободной энергии об-

разования структурных комплексов с белком gp41. Поэтому эти соединения были отобраны в качестве наиболее вероятных миметиков антитела.

Анализ результатов молекулярного докинга показывает, что найденные соединения характеризуются близким механизмом взаимодействия с участком MPER ВИЧ-1, основу которого формируют специфические  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия и ван-дер-ваальсовы контакты, приводящие к блокаде аминокислотных остатков белка gp41, ответственных за слияние оболочки вируса с мембраной клетки-мишени. При этом важную роль играют  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия между  $\pi$ -сопряженными системами их ароматических колец и боковой цепи Trp-672 – одного из ключевых остатков линейного эпитопа, используемого антителом для специфического связывания с белком gp41 [3]. Как и МКА 10e8, найденные соединения блокируют расположенную между двумя  $\alpha$ -спиралями “шарнирную” область пептида MPER, которая обеспечивает его конформационную подвижность, необходимую для проявления функциональной активности белка gp41 в процессе слияния мембран [3]. Согласно расчетным данным, идентифицированные соединения имитируют сегмент Trp-33, Gly-52c, Pro-52b, Glu-53, Lys-97 тяжелой цепи антитела 10e8, который включает остатки, формирующие межатомные контакты с функционально важными аминокислотами белка gp41. Данные молекулярной динамики структурных комплексов потенциальных пептидомиметиков МКА 10e8 с пептидом MPER белка gp41 согласуются с выводами, сделанными на основе анализа результатов молекулярного докинга. Структурные комплексы, построенные методами молекулярного докинга, энергетически стабильны, о чем свидетельствуют низкие значения свободной энергии их образования и соответствующие им величины стандартных отклонений. Анализ средних значений энтальпии связывания с лигандами, вычисленных для каждого остатка пептида MPER, показывает, что практически во всех рассматриваемых случаях весомый вклад в энтальпийную составляющую свободной энергии образования комплексов вносят консервативные остатки Trp-666, Trp-670 и Trp-672 белка gp41, наличие которых необходимо для функционирования участка MPER ВИЧ-1 [3]. Этот вывод также относится к остатку Ile-675, расположенному в функционально важной “шарнирной” области эктодомена gp41 [3]. Семь из восьми лигандов используют в качестве “горячих точек” связывания остатки Trp-678 и Leu-679 белка, а шесть соединений эффективно взаимодействуют с остатком Arg-683 белка gp41, представляющим одну из аминокислот, критических для специфического связывания МКА 10e8 с молекулярной мишенью [3].

Идентифицированные соединения могут быть использованы в работах по созданию новых противовирусных препаратов – ингибиторов слияния ВИЧ, блокирующих участок MPER белка gp41.

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (проект X15-022).

### Литература

1. Andrianov, A.M. HIV-1 gp120 V3 loop for anti-AIDS drug discovery: computer-aided approaches to the problem solving / A.M. Andrianov // Expert Opin. Drug Discov. – 2011. – Vol. 6. – P. 419-435.
2. McCoy, L.E. Neutralizing antibodies to HIV-1 induced by immunization / L.E. McCoy, R.A. Weiss // J. Exp. Med. – 2013. – Vol. 210. – P. 209-223.
3. Huang, J. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody / J. Huang [et al.] // Nature. – 2012. – Vol. 491. – P. 406-414.
4. Masciocchi, J. MMsINC: a large-scale chemoinformatics database / J. Masciocchi [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2009. – Vol. 37. – P. D284-D290.
5. Floris, M. Swimming into peptidomimetic chemical space using peptidomimetic MMsMIMIC / M. Floris [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2011. – Vol. 39 – P. 261-269.

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ВИЧ-1 НА ОСНОВЕ ГЛИКОСФИНГОЛИПИДОВ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И ХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА

**Корноушенко Ю.В.<sup>1</sup>, Кисель М.А.<sup>1</sup>, Тузиков А.В.<sup>2</sup>, Андрианов А.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь, kornoushenko@iboch.bas-net.by*

<sup>2</sup>*Объединенный институт проблем информатики Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

Важную роль в процессе проникновения ВИЧ-1 в клетку-мишень играет третий вариабельный домен (петля V3) белка gp120 оболочки вируса, который отвечает за связывание ВИЧ с корцепторами CCR5 или

CXCR4 и определяет его предпочтения по отношению к первичным макрофагам и Т-лимфоцитам. В связи с этим петля V3 рассматривается как перспективная мишень для создания новых противовирусных препаратов с широкой вирусной нейтрализацией. Однако высокая изменчивость ее аминокислотного состава создает серьезные трудности в достижении этой цели. Тем не менее, в работе [1] было показано, что отдельные сегменты петли V3 могут сохранять трехмерную структуру в различных модификациях ВИЧ, формируя слабые звенья в системе его защиты. Поэтому представляется актуальным поиск химических соединений, способных блокировать эти структурно консервативные участки оболочки вируса. Согласно данным литературы, к числу таких соединений может быть отнесен гликофинголипид  $\beta$ -галактозилцерамид ( $\beta$ -GalCer), образующий в некоторых клетках, отличных от макрофагов и Т-лимфоцитов, первичный рецептор для ВИЧ-1. Использование этого гликолипида в качестве противовирусного препарата проблематично из-за его нерастворимости в воде и неспособности образовывать стабильные наноструктуры при сольubilизации, однако его растворимые аналоги могут быть использованы как перспективные базовые структуры для создания новых анти-ВИЧ агентов с широким спектром нейтрализующего действия.

Цель исследования: Методами молекулярного моделирования сконструировать растворимые аналоги  $\beta$ -GalCer и на основе оценки их потенциальной нейтрализующей активности синтезировать соединения, наиболее перспективные для тестирования на анти-ВИЧ активность.

Для достижения поставленной цели в работе решены следующие задачи: 1. С помощью методов компьютерной графики сконструированы двенадцать растворимых аналогов  $\beta$ -GalCer и проведены квантово-химические расчеты их трехмерных структур. 2. Методами молекулярного докинга построены модели структурных комплексов гликолипидов с петлей V3 ВИЧ-1 и выполнен анализ межмолекулярных взаимодействий, ответственных за их энергетическую стабилизацию. 3. Методами молекулярной динамики (МД) сгенерированы МД траектории комплексов и рассчитаны свободные энергии их образования. 4. Синтезированы два соединения, которые, согласно расчетным данным, проявляют высокое сродство к структурно консервативным участкам петли V3 ВИЧ-1.

Анализ структурных комплексов аналогов  $\beta$ -GalCer с петлей V3 ВИЧ-1 показал, что специфичность связывания определяется нестандартными  $\text{HN}\cdots\pi$  водородными связями между остатком сахара гликолипидов и  $\pi$ -электронами ароматического кольца консервативных остатков Phe-20/Tyr-21 или His-34 V3-домена, входящих в состав сегментов, критических для взаимодействия вируса с корецепторами CCR5 или

СХСR4 клетки-мишени . Исследование МД траекторий комплексов указывает на сохранение характера распределения межмолекулярных водородных связей, наблюдаемого для статических моделей. При этом остаток галактозы гликолипидов пространственно сближен с ароматическими остатками петли V3 на расстояния, необходимые для реализации ХН·π взаимодействий, а низкие значения свободной энергии образования комплексов свидетельствуют об их энергетической стабильности.

Среди сконструированных гликолипидов наиболее эффективные взаимодействия с петлей V3 проявляли β-галактозилсфингозин и N-(L-α-тирозинил)-β-галактозилсфингозин. Поэтому следующим этапом работы был синтез этих соединений с целью их последующего тестирования на биологическую активность.

β-Галактозилсфингозин (рисунок 1) получали из цереброзидов мозга свиньи по методике [2] с некоторыми модификациями [3]. N-(L-α-тирозинил)-β-галактозилсфингозин (рисунок 2) синтезировали по методу смешанных ангидридов, ацилируя amino группу β-галактозилсфингозина ВОС-L-тирозином с последующим снятием ВОС-защитной группы трифторуксусной кислотой.

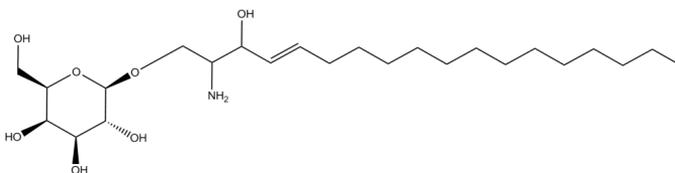


Рисунок 1 – Структурная формула β-галактозилсфингозина.

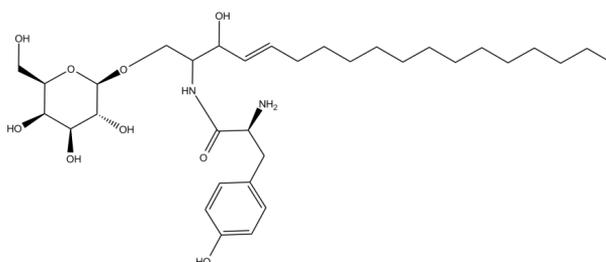


Рисунок 2. – Структурная формула N-(L-α-тирозинил)-β- галактозилсфингозина.

В результате тестирования  $\beta$ -галактозилсфингозина, проведенного в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (д.м.н. В.Ф. Еремин), установлено, что этот аналог  $\beta$ -GalCer обладает анти-ВИЧ активными свойствами. Химиотерапевтический индекс, т.е. соотношение максимально переносимой концентрации и минимально активной концентрации соединения, составило 40,0, что свидетельствует о высокой степени противовирусной активности.

Полученные соединения, сконструированные методами молекулярного моделирования и химического синтеза (рисунки 1 и 2), формируют продуктивную основу для создания новых эффективных лекарственных препаратов против ВИЧ с широким спектром нейтрализующего действия.

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (проект X15-022).

### Литература

1. Andrianov, A.M. Discovery of novel promising targets for anti-AIDS drug developments by computer modeling: application to the HIV-1 gp120 V3 loop / A.M. Andrianov, I.V. Anishchenko, A.V. Tuzikov // J. Chem. Inf. Model. – 2011. – Vol. 51. – P. 2760-2767.
2. Препаративная биохимия липидов. Под ред. Л.Д. Бергельсона, Э.В. Дятловицкой. // М.: Наука. 1981. 256 с.
3. Получение и анти-ВИЧ активность  $\beta$ -галактозилсфингозина / Ю.В. Корноушенко [и др.] // Известия НАН Беларуси, серия химических наук. – 2015 – № 1. – С. 85–88.

## ОКИСЛЕНИЕ ТИАМИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА

**Лабор С.А.<sup>1</sup>, Степура И.И.<sup>1</sup>, Смирнов В.Ю.<sup>2</sup>, Степура В.И.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Беларусь;*

<sup>2</sup>*Гродненский медуниверситет, Гродно, Беларусь*

<sup>3</sup>*Гродненский университет им. Янки Купалы, Гродно, Беларусь*

Тиамин (или витамин В1) является важнейшим незаменимым фактором питания и используется в организме в качестве структурного ком-

понента молекулы тиаминдифосфата (ТДФ). ТДФ является кофактором таких важнейших ферментов энергетического метаболизма, как пируватдегидрогеназа и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа. ТДФ также является кофактором транскетолазы, ключевого фермента пентозофосфатного цикла. В данной работе показано, что тиамин и его фосфорные эфиры являются эффективными ловушками синглетного кислорода.

Нами изучались процессы окисления тиамин под действием синглетного кислорода, получаемого при облучении ароматических аминокислот ультрафиолетовым (УФ) светом 250-300 нм (лампа СВД 120А). Необходимо отметить, что воздействие УФ света на ароматические аминокислоты (например, тирозин) в аэробных условиях приводило также к фотоэжектированию электронов и образованию свободных радикалов аминокислот и супероксиданионов. Стационарную концентрацию супероксид-анионов измеряли по количеству восстановленного феррицитохрома *c* в ферро-форму после облучения растворов цитохрома *c* в присутствии ароматических аминокислот. Долгоживущие тирозильные свободные радикалы эффективно окисляли тиамин с образованием тиохрома [1]. Однако, при высоких концентрациях аминокислот окисление тиамин происходило главным образом под действием синглетного кислорода, генерируемого триплетными состояниями аминокислот.

Разделение и идентификацию продуктов окисления тиамин проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Аджилент-1100 (сорбент Зорбакс-экстенд-С18). Среди продуктов фотолиза тиазолового компонента найдены ацетотиопропиловый спирт, небольшие количества 4-метил-5-оксиэтилсульфоксида. Аминопиримидиновый компонент значительно более устойчив к действию синглетного кислорода и в результате воздействия ультрафиолета на тиамин в растворе в основном образуется 2-метил-4-амино-5-аминометилпиримидин, который был идентифицирован методом ВЭЖХ с использованием соответствующего соединения-стандарта. Кроме того, среди продуктов фотолиза тиамин в следовых количествах, менее 0,1% от концентрации разрушенного тиамин обнаружен тиохром.

Как известно, метионин, гистидин, триптофан, тирозин и цистеин являются аминокислотами, наиболее чувствительными к фотосенсибилизированному фотоокислению синглетным кислородом. При высоких концентрациях данных аминокислот (при 100-кратном молярном избытке по отношению к тиамину) эффективно протекают конкурентные реакции окисления аминокислот и практически весь синглетный кислород прехватывается аминокислотами.

Облучение видимым светом не приводило к образованию продуктов окисления тиаминa и изменения формы спектров поглощения. Однако, если в растворе тиаминa присутствовал рибофлавин или пиридоксаль-Р и такие его аналоги как пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин, фосфопиридоксин, то наблюдали фотосенсибилизированное окисление тиаминa под действием видимого света. Причем с наибольшей скоростью окислялся тиазоловый компонент тиаминa.

Количество разрушенного тиаминa хорошо коррелировало со значением квантового выхода генерации синглетного кислорода рибофлавином и производными пиридоксина [2]. Эти результаты свидетельствуют об участии синглетного кислорода в окислении тиаминa и тиаминдифосфата. Добавление в водный раствор азида натрия практически полностью ингибировало окисление тиаминa или тиаминдифосфата.

При воздействии УФ (250-300 нм) на тиамин в нейтральной среде в аэробных условиях происходит фотолиз тиаминa, причем продукты фотолиза практически идентичны тем, которые образуются при окислении тиаминa с участием синглетного кислорода. Добавление азида позволяет ингибировать на ~90 % окисление тиаминa под действием ультрафиолета (Рисунок).

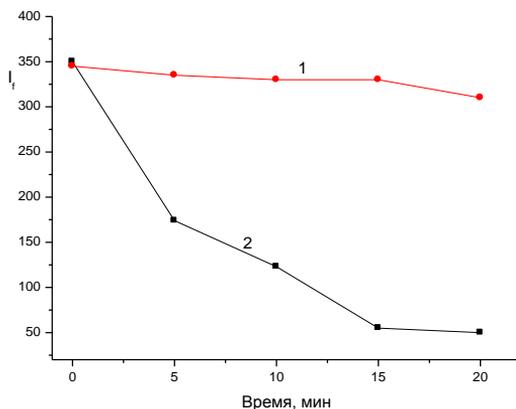


Рисунок. Разрушение тиаминa под действием УФ (лампа СВД 120А) в атмосфере воздуха в зависимости от времени облучения в присутствии (1) и отсутствии азид-иона (2) в растворе. pH 7.0

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что тиамин является эффективной ловушкой синглетного кислорода и может оказывать защитный эффект на белковые макромолекулы, подверженные действию УФ, в том числе на белки хрусталика глаза. Ингибирование

тиамином повреждений кристаллинов хрусталика, вероятно, вызвано конкурентной реакцией протекающей с высокой скоростью между синглетным кислородом и тиазоловым компонентом тиамина. Обсуждается роль тиамин и производных тиамин как перспективного класса антикатарактальных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда БРФФИ, грант № M14-091.

### Литература

1. Степура И.И., Степура В.И. // Окисленные производные тиамин. Механизмы образования под действием активных форм азота, кислорода и в реакциях, катализируемых гемопротеинами. 2014. – LAP LAMBERT Academic Publishing, – p. 280.
2. Dzhagarov B. M. et al. Quantum yield of photosensitized formation of singlet oxygen by vitamins of the B6 group and their adducts with amino acids and proteins // J Appl Spectrosc. – 1994. – V. 61, – №. 1. – P. 505–508.

### ОКИСЛЕНИЕ ТИАМИНА, КАТАЛИЗИРУЕМОЕ МЕТМИОГЛОБИНОМ И ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА, В ПРИСУТСТВИИ ПАРАЦЕТАМОЛА

Лабор С.А.<sup>1</sup>, Степура В.И.<sup>2</sup>, Смирнов В.Ю.<sup>3</sup>, Степура И.И.<sup>1</sup>,  
Янцевич А.В.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии НАН Беларуси, Гродно, Беларусь

<sup>2</sup>Гродненский госуниверситет им Я. Купалы, Гродно, Беларусь

<sup>3</sup>Гродненский государственный медуниверситет, Гродно, Беларусь

<sup>4</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Многочисленными исследованиями показано, что при взаимодействиях пероксида водорода с гемопротеинами, в том числе с миоглобинами и гемоглобинами, формируются высокореакционные оксоферрильные формы гемопротеинов, которые окисляют биомолекулы и инициируют перекисное окисление липидов. Обе оксоферрильные формы гемоглобина – соединение I [1] и соединение II были обнаружены в крови при физиологических условиях.

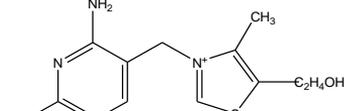
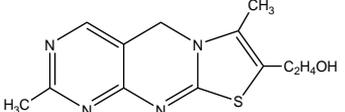
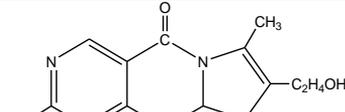
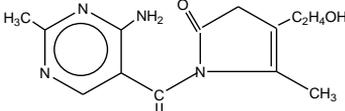
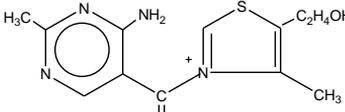
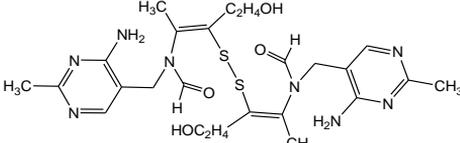
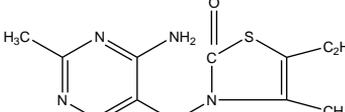
Мы показали, что в присутствии тиамин наблюдается возрастание скорости трансформации оксоферрильных форм гемопротеинов в ферри-

формы. Процесс восстановления оксоферрильных форм миоглобина или гемоглобина сопровождался окислением тиаминина с образованием тиохрома, оксидигидротиаохрома и тиаминдисульфида. Тиохром, оксидигидротиаохром и тиаминдисульфид тиаминина были идентифицированы методом ВЭЖХ. Время удерживания стандартов – тиохрома, оксидигидротиаохрома, тиаминдисульфида хорошо совпадало с временем удерживания соединений полученных после инкубации тиаминина в растворах и разделенных методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent-1100, оснащенного диодно-матричным детектором.

Концентрацию продуктов окисления тиаминина, образованных после инкубации тиаминина с метмиоглобином и пероксидом водорода, определяли спектрально-флуоресцентными методами. Максимум в электронном спектре поглощения тиохрома находится при 365 нм, а максимум поглощения оксидигидротиаохрома - при 342 нм. Первоначально в растворе, содержащем метмиоглобин, пероксид водорода и тиамин, преимущественно образуется тиохром и небольшие количества оксидигидротиаохрома. По данным ВЭЖХ после длительной инкубации в растворе (например, 0,5-3 часа) наблюдается увеличение содержания оксидигидротиаохрома. Максимум поглощения суммарного пика продуктов окисления тиаминина смещается в коротковолновую область (менее 350 нм), что также свидетельствует о высоком содержании в растворе оксидигидротиаохрома. После инкубации смеси в течение 24 часов основным продуктом в растворе также является оксидигидротиаохром, но также регистрируются продукты дальнейшего окисления оксидигидротиаохрома.

Тиамин-монофосфат и тиаминдифосфат в отличие от тиаминина стабильны и не испытывают окислительных превращений с образованием фосфатов оксидигидротиаохрома даже после длительной инкубации в смеси с метмиоглобином и пероксидом водорода. В смеси, содержащей ТДФ, пероксид водорода и метмиоглобин образуются небольшие количества тиохром-дифосфата в сравнении с количеством тиохрома образовавшегося в растворах, содержащих тиамин. Эти результаты позволяют предположить, что вход в гемовый карман для молекул фосфорных эфиров тиаминина затруднен по сравнению с молекулами тиаминина.

Табл.1. Структурные формулы тиамина и продуктов окислительной трансформации тиамина

Структурная схема	Название соединения
 <p style="text-align: right;"><math>m/z=265.11</math></p>	Тиамин
 <p style="text-align: right;"><math>m/z=263.09</math></p>	Тиохром (Тх)
 <p style="text-align: right;"><math>m/z=279.09</math></p>	Оксидигидротиохром
 <p style="text-align: right;"><math>m/z=305.11</math></p>	Оксотиаминтиазолон
 <p style="text-align: right;"><math>m/z=280.11</math></p>	Оксотиамин
 <p style="text-align: right;"><math>m/z=563.22</math></p>	Тиаминдисульфид (TS-ST)
 <p style="text-align: right;"><math>m/z=280.11</math></p>	Тиамин-тиазолон

Методом масс-спектрометрии показано, что растворы тиамин (m/z=265,11) после инкубации с метмиоглобином и пероксидом водорода кроме тиохрома (m/z = 263,09), оксодигидротиохрома (m/z = 279,09), тиамин-дисульфида (m/z = 563,22) содержат тиамин-тиазолон (m/z = 280,11), оксотиамин (m/z = 280,11), оксотиамин тиазолон (m/z = 305,11). Тиамин-тиазолон и оксотиамин имеют одинаковую молекулярную массу, но различаются по временам удерживания на хроматограмме. Кроме того, метод масс-спектроскопии позволяет обнаружить в следовых количествах продукты окисления тиольной формы тиамин, предположительно, тиамин-сульфеновую кислоту (m/z = 297), тиамин-сульфоновую кислоту (m/z = 313), тиамин-цистеиновую кислоту (m/z = 329). В присутствии высоких концентраций парацетамола тиамин превращается только в тиохром, а выход оксодигидротиохрома, тиамин-тиазолона и других продуктов окисления тиамин полностью ингибируется. В этих условиях ингибируются двуэлектронные реакции окисления тиамин с участием оксоферрильного комплекса гема и в растворе протекают только одноэлектронные реакции окисления тиамин феноксильными радикалами. Полученные результаты позволяют предположить, что окисление тиохрома в оксодигидротиохром в двуэлектронных реакциях, а также псевдопероксидазное окисление тиамин, сопряженное с окислением парацетамола, тирозина в одноэлектронных реакциях может выступать в качестве факторов, препятствующих накоплению токсичной оксоферрильной формы миоглобина при окислительном стрессе. Антиоксидантный эффект тиамин в присутствии парацетамола усиливается вследствие образования тиохрома, который эффективно восстанавливает оксоферрильные формы миоглобина в ферри-формы.

### Литература

1. Svistunenko D.A., et al., The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood // J Biol Chem, – 1997. – V. 272. – P. 7114–7121.

## СТЕХИОМЕТРИЯ И СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТИОФЛАВИНА Т, ВСТРОЕННЫХ В АМИЛОИДНЫЕ ФИБРИЛЛЫ

Лавыш А.В.<sup>1</sup>, Маскевич А.А.<sup>1</sup>., Луговский А.А.<sup>2</sup>, Воропай Е.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Гродненский госуниверситет им. Я. Купалы, Гродно, Беларусь

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Один из методов обнаружения и изучения амилоидных фибрилл (АФ) основан на регистрации и анализе интенсивности флуоресценции тиофлавина Т (ThT), встроенного в фибриллы. Однако использование ThT для обнаружения и изучения фибрилл в тканях затруднено, поскольку спектры поглощения и флуоресценции ThT расположены в синезеленом спектральном диапазоне, где существенным является рассеяние света фибриллами (в экспериментах *in vitro*), а также поглощение и флуоресценция биологических тканей и жидкостей (в экспериментах *in vivo*). Значительно повысить чувствительность метода обнаружения АФ в растворах и тканях позволяет применение производных ThT, имеющих спектры, смещенные в сторону больших длин волн. Такими производными являются вновь синтезированные соединения перхлорат транс-2-[4-(диметиламино)стирил]-3-этил-1,3-бензотиазолия (DMASEBT) и тозилат транс-2-[(4-(диметиламино)-2,6-диметилстирил]-3-этил-1,3-бензо-тиазолия (2M-DMASEBT). С помощью квантово-химических методов и спектральных исследований показано [1], что DMASEBT и 2M-DMASEBT являются молекулярными роторами, и при увеличении вязкости и жесткости микроокружения квантовый выход и длительность затухания их флуоресценции значительно возрастают.

В водном растворе (рН 6) спектры поглощения DMASEBT и 2M-DMASEBT имеют максимумы на 514 и 516 нм, соответственно, а спектры флуоресценции – на 597 и 570 нм, соответственно. В присутствии АФ наблюдается значительный (55 нм для DMASEBT, и 60 нм для 2M-DMASEBT) батохромный сдвиг спектра поглощения красителей. При изменении концентрации АФ наблюдается изобестическая точка при 550 нм, что указывает на существование двух форм красителя (свободного и встроенного в АФ). Измерения спектров флуоресценции (при возбуждении 520 нм) показали, что спектры флуоресценции красителей в присутствии АФ испытывают батохромный сдвиг, который, в случае DMASEBT составляет ~3 нм, а для 2M-DMASEBT ~14 нм. При добавлении АФ с концентрацией 0,1 мг/мл интенсивность флуоресценции

DMASEBT возрастает примерно в 42 раза, а 2М-DMASEBT – примерно в 100 раз.

Значительный батохромный сдвиг спектров поглощения и существенное возрастание интенсивности свечения красителей при добавлении АФ мы объясняем встраиванием молекул данных красителей в жесткую  $\beta$ -складчатую структуру фибрилл. Окружение молекул красителей, встроенных в АФ, является менее полярным, а потому стабилизация основного состояния молекул значительно меньше, чем в водном растворе. Кроме того, жесткое окружение препятствует торсионному вращению фрагментов молекул друг относительно друга и блокирует переход в нефлуоресцирующее состояние.

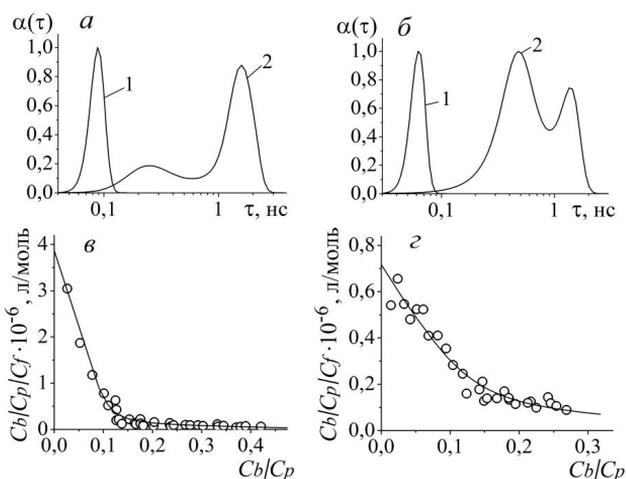


Рисунок 1 – Распределение длительностей затухания флуоресценции DMASEBT (а) и 2М-DMASEBT (б) в присутствии АФ (1 – распределение при отсутствии АФ, 2 – распределение в присутствии 0,15 мг/мл АФ), а также графики в координатах Скэтчарда для DMASEBT (в) и 2М-DMASEBT (з), описывающие встраивание красителей в АФ

Анализ кинетики затухания флуоресценции новых производных ThT в присутствии АФ с помощью метода максимума энтропии (MEM [2]) позволил установить, что кинетика может быть представлена двухмодальным распределением длительностей затухания  $\alpha(\tau)$  (рисунок 1, а, б, кривые 2). Наличие двух мод в распределении свидетельствует о существовании как минимум двух центров встраивания с различным

сродством к молекулам красителей (мод встраивания). Видно, что для DMASEBT характерно наличие двух мод с длительностями в максимумах 0,25 и 1,58 нс, а для 2М-DMASEBT – 0,51 и 1,35 нс. Также на рисунке 1 (а, б) показаны распределения для красителей в водном растворе при отсутствии АФ (кривые 1), которые являются одномодальными с длительностями в максимуме 0,09 нс для DMASEBT, и 0,06 нс для 2М-DMASEBT. Поскольку DMASEBT и 2М-DMASEBT являются молекулярными роторами и для них характерно возрастание квантового выхода и длительности затухания флуоресценции при увеличении вязкости или жесткости микроокружения, то можно полагать, что молекулы, находящиеся в более жестком микроокружении, имеют большую длительность затухания флуоресценции, что соответствует моде с большей длительностью в распределении  $\alpha(\tau)$ .

По нелинейному характеру экспериментальных зависимостей, представленных на рисунке 1 (в, г) можно судить о существовании как минимум двух мод встраивания, отличающихся константами встраивания  $K_{bi}$  и числом мест встраивания  $n_i$ . Для DMASEBT полученные константы встраивания для двух мод составляют  $K_{b1} = 3,6 \cdot 10^7$  л/моль и  $K_{b2} = 1,6 \cdot 10^5$  л/моль, а числа мест встраивания –  $n_1 = 0,10$  и  $n_2 = 0,53$ , соответственно. Для 2М-DMASEBT параметры встраивания составили  $K_{b1} = 5,2 \cdot 10^6$  л/моль и  $K_{b2} = 1,2 \cdot 10^5$  л/моль,  $n_1 = 0,12$  и  $n_2 = 0,58$ . Таким образом, можно сделать вывод, что новые производные ThT весьма эффективно встраиваются в АФ, что приводит к значительным изменениям их спектрально-кинетических свойств. Данные производные могут быть использованы как эффективные флуоресцентные маркеры для обнаружения и изучения структуры фибрилл в растворе и биологических тканях.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (договор № Ф14Р-226).

### Литература

1. Лавыш, А.В. Торсионная релаксация новых производных тиофлавина Т в возбужденном состоянии / Вестник Гродненского государственного университета имени Янки Купалы. Сер. 2. – 2015. – № 1. – С. 71–82.
2. Maskevich, A.A. Analysis of fluorescence decay kinetics of thioflavin T by a maximum entropy method / A.A. Maskevich, V.I. Stsiapura, P.T. Balinski // J. Appl. Spectr. – 2010. – V. 77. – P. 194–201.

# ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НАНОПЛАТФОРМЫ НАНОАЛМАЗ-ХЛ Е6-ФОЛИЕВАЯ КИСЛОТА

**Лапина В. А., Бушук С. Б., Воробей А. В., Павич Т. А.,  
Кальвинковская Ю. А., Бушук Б. А.**

*Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Для установления включения активных компонентов, хлорина е6 и фолиевой кислоты, в состав наноплатформы, основанной на наноалмазных частицах, и влияния этого включения на свойства исходных компонентов проведено исследование спектральных характеристик синтезированной наноплатформы.

На рис. 1 приведены спектры поглощения двухкомпонентной наноалмаз-хлорин е6 (НА-Хл е6) и трехкомпонентной наноалмаз-хлорин е6-фолиевая кислота (НА - Хл е6 - ФК) синтезированных наноплатформ [1]. Как видно, при уменьшении длины волны поглощение образцов резко возрастает, что обусловлено светорассеянием света на наночастицах.

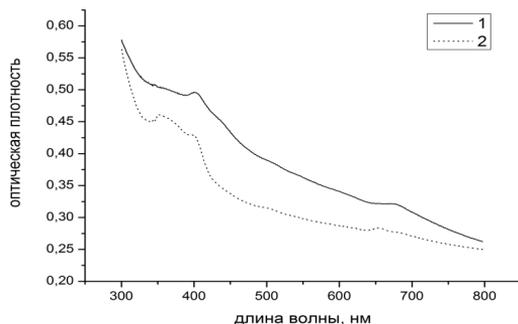


Рис. 1 Спектры поглощения: (1) - двухкомпонентной НА-Хл е6 и (2) - трехкомпонентной НА - Хл е6 - ФК наноплатформ в ЗФР с 5 % DMSO.  $C_{\text{Хл е6}} = 4 \cdot 10^{-7}$  моль/л, концентрация наноплатформы – 0,014 мас. %.

Вместе с тем, в спектрах обоих образцов наблюдаются характерные для хлорина е6 полосы поглощения: полоса  $S_{0e}$  в области 400 нм и обычно используемая при фотодинамической терапии полоса поглощения в области 640 – 680 нм, что свидетельствует о конъюгировании Хл е6 с алмазными наночастицами.

Было исследовано влияние конъюгации наноплатформы НА-Хл е6 с ФК на электронную структуру фотосенсибилизатора. На рис. 2 приведены спектры флуоресценции наноплатформы в ЗФР с 5 % DMSO. Видно что конъюгирование ФК с двухкомпонентной наноплатформой не оказывает существенного влияния на характерные для Хл е6 спектры. Так, при  $\lambda_{\text{возб}} = 405$  нм наблюдается флуоресценция в области 640 – 700 нм, а при  $\lambda_{\text{возб}} = 365$  нм видна флуоресценция в области 400 – 600 нм.

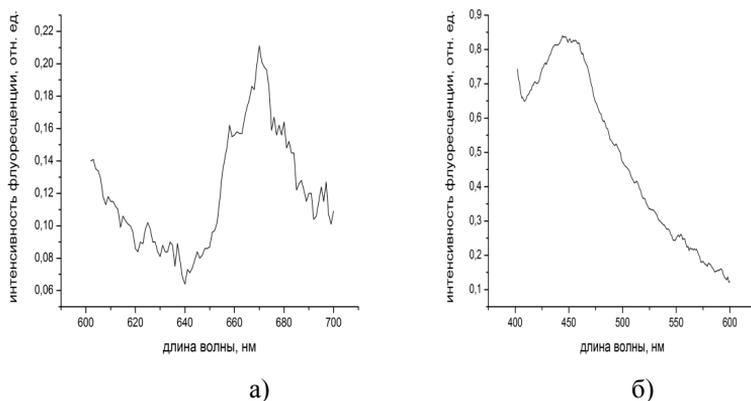


Рис. 2. Спектры флуоресценции НА - Хл е6 - ФК : а)  $\lambda_{\text{возб}} = 405$  нм, б)  $\lambda_{\text{возб}} = 365$  нм.  $C_{\text{Хл е6}} = 4 \cdot 10^{-7}$  моль/л,  $C_{\text{НА - Хл е6 - ФК}} = 0,014$  мас. %.

Это свидетельствует о том, что конъюгирование с ФК не оказывает существенного влияния на электронно-возбужденные уровни Хл е6.

Важным является исследование фотосенсибилизирующей активности Хл е6 в составе наноплатформы НА-Хл е6-ФК и ее фотоустойчивость в биологической среде. В качестве такой среды использовали сывороточный альбумин человека (САЧ) в забуференном физиологическом растворе (ЗФР).

На рисунке 3 приведены данные по влиянию освещения образцов, содержащих наноплатформу и САЧ в ЗФР, на интенсивность флуоресценции белковых триптофанилов. Наблюдаемое выраженное падение триптофановой флуоресценции при освещении свидетельствует о фотосенсибилизируемой деструкции индольного кольца триптофанов САЧ включенным в наноплатформу хлорином е6.

Из приведенных данных следует, что конъюгированный Хл еб способен фотосенсибилизировать разрушение триптофанилов САЧ при освещении, т.е. он сохраняет свою фотодинамическую активность.

Фотодинамическая активность конъюгированного Хл еб проявляется и по повреждению входящей в состав наноплатформы фолиевой кислоты (рис. 4 (а)). Так, при освещении происходит увеличение интенсивности флуоресценции продуктов разрушения ФК, флуоресцирующих в области 400-550 нм при возбуждении 365 нм.

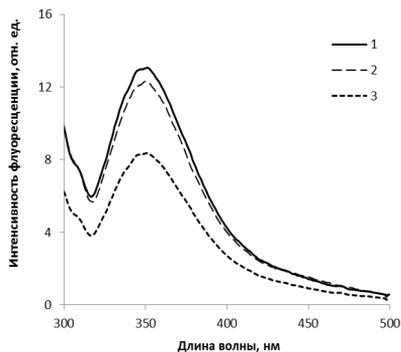


Рис. 3 – Спектры флуоресценции САЧ в суспензии с НА-Хл еб-ФК до (1) и после освещения светом диапроектора с тепловым фильтром в течение 2 мин (2) и 7 мин (3).  $\lambda_{\text{возб}}=280$  нм.  $C_{\text{САЧ}} = 3,2 \cdot 10^{-7}$  моль/л.

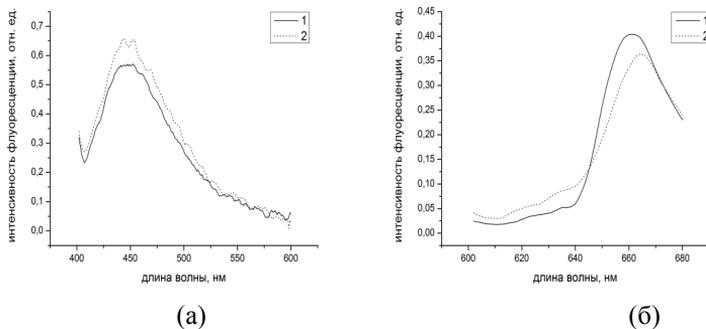


Рис. 4 – Спектры флуоресценции хлорина еб (а) и фолиевой кислоты (б) в суспензии НА-Хл еб-ФК до (1) и после освещения светом диапроектора в течение 7 мин.  $\lambda_{\text{возб}}=365$  нм (а), 405 нм (б).  $C$  наноплатформы = 0,014 мас. %.

Из рис. 4 (б) также видно, что при освещении частично разрушается и конъюгированный Хл еб Однако, фоторазрушение хлорина еб происходит более чем в 3 раза медленнее, чем фотосенсибилизируемая им деструкция триптофанов САЧ.

#### Литература

1. В. А. Лапина, С. Б. Бушук, Т. А. Павич, А. В. Воробей. ЖПС, – 2016, – Т.82, –№3, – с. 347–353.

### МИГРАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА И ОКСИДА УГЛЕРОДА ЧЕРЕЗ КСЕНОНОВЫЕ САЙТЫ В ИЗОЛИРОВАННЫХ ЦЕПЯХ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА

**Лепешкевич С.В.<sup>1</sup>, Гилевич С.Н.<sup>2</sup>, Пархоц М.В.<sup>1</sup>, Джагаров Б.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Институт физики им. Б.И. Степанова, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup> *Институт биоорганической химии, Минск, Беларусь*

Экспериментально доказано существование каналов миграции молекулярного кислорода ( $O_2$ ) через ксеноновые сайты в изолированных  $\alpha$  и  $\beta$  цепях гемоглобина человека. Для этого был использован метод лазерной наносекундной абсорбционной спектроскопией с применением кювет высокого давления, содержащих наряду с водным раствором белка одну атмосферу воздуха и вплоть до 25 атмосфер инертного газа. Использование кювет высокого давления позволило ввести атомы ксенона внутрь белка и связать их в ксеноновых сайтах. В свою очередь, привлечение техники лазерной кинетической спектроскопии [1, 2] позволило проследить влияние встраивания атомов ксенона на процесс повторного связывания молекулы  $O_2$  с белком после фотодиссоциации.

Показано, что встраивание атомов ксенона приводит к уменьшению эффективности выхода молекулы  $O_2$  из изолированных  $\alpha$  цепей гемоглобина в 1.30 раза. Эффективность выхода молекулы  $O_2$  для  $\beta$  цепей не изменяется. В пределах экспериментальной погрешности, не происходит изменения бимолекулярной константы скорости ассоциации молекулы  $O_2$  с изолированными цепями гемоглобина. Показано, что встраивание атомов ксенона приводит к уменьшению характеристического времени наиболее медленной компоненты геминальной рекомбинации молекулы  $O_2$  с изолированными цепями. Наблюдаемое уменьшение характеристического времени обусловлено уменьшением внутрибелкового простран-

ства доступного для миграции молекулы  $O_2$  после встраивания атомов ксенона.

Для адекватного объяснения наблюдаемых изменений эмпирических параметров повторного связывания молекулы  $O_2$  с белком, нами была предложена кинетическая модель, описывающая миграцию молекулы  $O_2$  внутри белка по двум альтернативным каналам с последующим повторным связыванием (рисунок). В рамках данной модели было показано, что константа скорости вхождения молекулы  $O_2$  из растворителя внутрь белка в область первичного сайта связывания (область гемового кармана) ( $k_{SB}$ , см рисунок) превышает на один порядок константу скорости вхождения молекулы  $O_2$  в область вторичных сайтов (ксенон-связывающих областей белка) ( $k_{SC}$ , см. рисунок), что подтверждает гипотезу об основном канале входа молекулы  $O_2$  внутрь белка через His(E7) калитку.

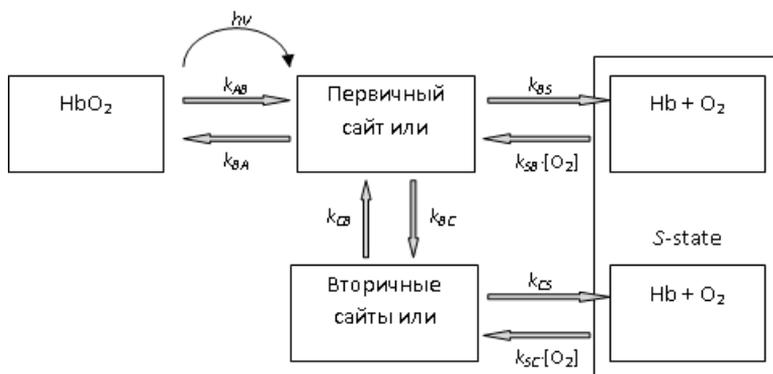


Рисунок. Кинетическая модель, описывающая миграцию двухатомного лиганда внутри белка по двум альтернативным каналам с последующим повторным связыванием.

Кроме того, рассчитана доля молекул  $O_2$  выходящих наружу белка через вторичные сайты в изолированных  $\alpha$  и  $\beta$  цепях гемоглобина. Показано, что в  $\alpha$  цепях через ксеноновые сайты выходит одна треть молекул  $O_2$ . Используя литературные данные [3] для эффективности геминальной рекомбинации оксида углерода (CO) с изолированными  $\alpha$  и  $\beta$  цепями гемоглобина в отсутствие и при введении 9 атмосфер ксенона, нами была рассчитана доля молекул CO выходящих из белка через вторичные сайты. Как и в случае с молекулой  $O_2$ , одна треть молекул CO выходит из изолированных  $\alpha$  цепей через ксеноновые сайты. Существенная доля молекул лиганда ( $O_2$  или CO) выходящих из  $\alpha$  субъединиц через ксеноно-

вые сайты говорит об эквивалентности каналов выхода как из области гемового кармана, так и из ксенон-связывающих областей внутри белка. В отличие от  $\alpha$  цепей, молекула  $O_2$ , посещая ксенон-связывающие области в  $\beta$  цепях, не покидает матрицу белка. Кроме того, была рассчитана эффективность выхода молекул  $O_2$  из белка через ксеноновые сайты. Найдено, что эффективности выхода молекулы  $O_2$  через ксенон-связывающие области в  $\alpha$  и  $\beta$  цепях гемоглобина составляют  $(5.6 \pm 1.1) \cdot 10^{-2}$  и  $(1.0 \pm 2.0) \cdot 10^{-2}$ , соответственно.

Таким образом, экспериментально доказано существование каналов миграции двухатомных лигандов через ксеноновые сайты в изолированных  $\alpha$  и  $\beta$  цепях гемоглобина. Каналы миграции в  $\alpha$  и  $\beta$  цепях различаются.  $\alpha$  цепь, в отличие от  $\beta$  цепи, обладает более чем одним каналом выхода из белка и, соответственно, более сложной структурой взаимосвязанных полостей, что была ранее теоретически предсказана методом молекулярной динамики [4]. В случае встраивания атомов ксенона в белок происходит затруднение миграции лиганда в белке, что отражается на экспериментально измеряемых параметрах повторного связывания молекулы лиганда изолированными цепями гемоглобина. В частности, закупорка каналов миграции атомами ксенона уменьшает эффективность выхода молекулы  $O_2$  из  $\alpha$  цепей после фотодиссоциации.

Авторы благодарят Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований (№ Ф13-016) за финансовую поддержку.

### Литература

1. Lepeshkevich S. V. Molecular oxygen binding with  $\alpha$  and  $\beta$  subunits within the R quaternary state of human hemoglobin in solutions and porous sol-gel matrices. / S. V. Lepeshkevich, M. V. Parkhats, I. I. Stepuro, B. M. Dzhagarov // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1794. – P.1823-1830.
2. Lepeshkevich S. V. Photosensitized singlet oxygen luminescence from the protein matrix of Zn-substituted myoglobin. / S. V. Lepeshkevich, M. V. Parkhats, A. S. Stasheuski, V. V. Britikov, E. S. Jarnikova, S. A. Usanov, B. M. Dzhagarov // *J. Phys. Chem. A* – 2014. – V. 118. – P.1864-1878.
3. Birukou I. Modulating distal cavities in the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of human HbA reveals the primary ligand migration pathway. / I. Birukou, D. H. Maillett, A. Birukova, J. S. Olson // *Biochemistry* – 2011. – V. 50. – P.7361-7374.
4. Lepeshkevich S. V. The kinetics of molecular oxygen migration in the isolated  $\alpha$  chains of human hemoglobin as revealed by molecular dynam-

ics simulations and laser kinetic spectroscopy. / S. V. Lepeshkevich, S. A. Biziuk, A. M. Lemeza, B. M. Dzhagarov // Biochim. Biophys. Acta – 2011. – V. 1814. – P.1279-1288.

## **ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННАЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА ВНУТРИ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАНООБЪЕКТОВ**

**Лепешкевич С.В., Пархоц М.В., Жарникова Е.С., Джагаров Б.М.**

*Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ) играет принципиально важную роль во многих химических, биофизических и биохимических системах. Данная активная форма кислорода является основным агентом в разрушении опухолевых тканей при фотодинамической терапии онкологических заболеваний. В последние годы большое число работ направлено на определение квантовых выходов образования синглетного кислорода в системах, содержащих наночастицы различных типов. Известно, что характеристики синглетного кислорода существенным образом зависят от диэлектрических свойств окружающей среды. Тем не менее, до сих пор не решен вопрос, каким образом изменяются люминесцентные характеристики синглетного кислорода внутри, а также на поверхности и вблизи наносистем.

В данной работе представлены результаты исследований фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода внутри биологических нанобъектов – Zn-замещенных гембелков. Нативные гембелки имеют в своем составе гем - Fe-протопорфирин IX, не способный генерировать синглетный кислород ввиду малого времени жизни возбужденных  $\pi\pi^*$ -состояний. Замена Fe-протопорфирина IX на Zn-протопорфирин IX позволяет получить биологический нанобъект, в котором фотосенсибилизатор (ФС) находится внутри белковой матрицы, при этом не нарушается нативная структура и конформационная подвижность белков.

Zn-замещенные гембелки были получены кислотнo-бутанонным методом [1]. Люминесценция синглетного кислорода регистрировалась на созданном в Институте физики НАН Беларуси высокочувствительном лазерном флуорометре для ближнего ИК-диапазона [2]. Возбуждение

осуществлялось на длине волны 532 нм с частотой 2.5 кГц. В качестве эталона использовался водорастворимый порфирин ТМРур<sup>4+</sup> в воде.

Полученные кинетики люминесценции синглетного кислорода фотосенсибилизированного ТМРур<sup>4+</sup> и Zn-замещенным миоглобином (ZnMb) представлены на рисунке 1.

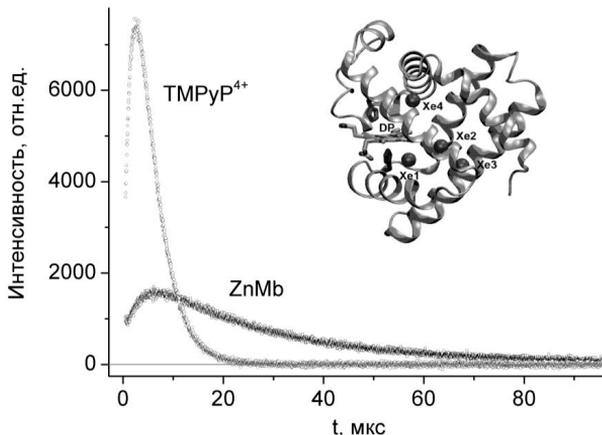


Рисунок 1 - Кинетика люминесценции синглетного кислорода фотосенсибилизированного Zn-замещенным миоглобином и ТМРур<sup>4+</sup> в буферном растворе рН 7.4. На вставке приведена структурная формула ZnMb

Известно, что в однородных системах кинетика люминесценции <sup>1</sup>O<sub>2</sub> описывается функцией следующего вида:

$$I(t) = \frac{A}{k_1 - k_2} [\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t)], \quad (1)$$

где А – коэффициент, зависящий от исходных концентраций взаимодействующих реагентов,  $k_1$  и  $k_2$  – соответственно константы нарастания и затухания сигнала свечения, описывающие дезактивацию триплетного состояния ФС и синглетного кислорода. В случае неоднородных систем, в частности для образцов, содержащих Zn-замещенные гембелки, кинетика не описывается функцией вида (1). Для описания генерации <sup>1</sup>O<sub>2</sub> внутри белковой матрицы и последующей его дезактивации нами была предложена кинетическая модель, учитывающая процессы излучательной и безызлучательной дезактивации <sup>1</sup>O<sub>2</sub> как в матрице белка, так и в окружающей водной среде [3]. На основании предложенной модели было получено выражение (2) для описания кинетики свечения синглетного кислорода в исследуемых системах:

$$I(t) = \chi_1 e^{-\alpha_1 t} - \chi_2 e^{-\alpha_2 t} + (\chi_2 - \chi_1) e^{-\alpha_3 t}, \quad (2)$$

где  $\alpha_1$  – константа скорости, описывающая дезактивацию триплетного состояния ФС,  $\alpha_2$  – константа скорости, описывающая дезактивацию  $^1\text{O}_2$  в растворителе,  $\alpha_3$  – константа скорости, описывающая дезактивацию  $^1\text{O}_2$  внутри белковой матрицы ( $k_{\Delta}^p$ ) и выход  $^1\text{O}_2$  из белка в окружающую среду ( $k_{\text{escape}}$ ),  $\chi_1, \chi_2$  – коэффициенты, зависящие от исходных концентраций взаимодействующих реагентов и констант  $\alpha_i$ .

Анализ полученных кинетик показал, что во временном интервале от 0 до 576 нс существенный вклад в интенсивность сигнала вносят рассеянное лазерное излучение и флуоресценция ФС. Поэтому для анализа кинетик свечения синглетного кислорода был выбран интервал от 576 нс до 350 мкс. На основании исследований процесса повторного связывания молекулы кислорода нативными гембелками было установлено, что синглетный кислород выходит из матрицы белка за время менее 150 нс. Следовательно в выбранном временном интервале константа скорости  $\alpha_3$  не может быть определена непосредственно из кинетических измерений люминесценции  $^1\text{O}_2$ , фотосенсибилизированного Zn-замещенными гембелками, однако она может быть рассчитана с привлечением дополнительных экспериментальных данных, описывающих люминесценцию  $^1\text{O}_2$ , фотосенсибилизированного эталоном сравнения ТМРyF<sup>4+</sup>.

Таким образом, используя предложенный алгоритм, может быть определена константа дезактивации синглетного кислорода внутри белковой матрицы  $k_{\Delta}^p = k_r^p + k_{nr}^p$ , а также рассчитаны излучательная  $k_r^p$  и безызлучательная  $k_{nr}^p$  константы дезактивации синглетного кислорода внутри белка.

Предложенный алгоритм регистрации и обработки кинетик свечения синглетного кислорода был реализован на таких бионанообъектах, как Zn-замещенные гембелки. Показано, что процесс безызлучательной дезактивации  $^1\text{O}_2$  в матрице белка может быть представлен в виде суммы независимых процессов тушения  $^1\text{O}_2$  всеми аминокислотами белка и фотосенсибилизатором. Установлено, что константа скорости излучательной дезактивации  $^1\text{O}_2$  в матрице белка в  $\sim 8$  раз больше соответствующей константы в водной среде, что говорит о существенном влиянии матрицы белка на процесс излучательной дезактивации  $^1\text{O}_2$ .

Авторы благодарят Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований (№ Ф15СО-036) за финансовую поддержку.

## Литература

1. Teale F.W.J. // Biochim. Biophys. Acta. – 1959. – Vol. 35. – P. 543
2. Сташевский А.С., Галиевский В.А., Джагаров Б.М. // Приборы и методы измерений. – 2011. – № 1(2). – С. 25-31.
3. Lepeshkevich S.V., Parkhats M.V., Stasheuski A.S., Britikov V.V., Jarnikova E.S., Usanov S.A., Dzhagarov B.M. // J. Phys. Chem. A. – 2014. – Vol. 118, № 10. – P. 1864-1878.

## ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ДЕНДРИМЕРОВ НА СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВ

**Лозникова С.Ж.<sup>1</sup>, Суходола А.А.<sup>2</sup>, Тихомиров С.А.<sup>2</sup>,  
Milowska K.<sup>3</sup>, Majoral J.-P.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

<sup>3</sup>*Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz, Poland*

<sup>4</sup>*Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS, Toulouse, France*

Быстрое развитие нанотехнологий привело к появлению нового раздела в медицине – наномедицины. Применение наноматериалов для лечения требует детального изучения их влияния на биологические структуры. Дендримеры класс полимеров, имеющий структурные преимущества перед вирусными и невирусными системами (векторами) доставки генетического материала в большие органы и ткани. При внутривенном способе введения дендримеров возможно их неспецифическое взаимодействие с белками и клетками крови, тканями стенок сосудов. Поэтому исследование механизмов взаимодействия дендримеров с регуляторными белками плазмы крови является актуальной задачей современной нанобиофизики и медицины.

В настоящее время остается недостаточно изученным характер взаимодействия дендримеров с белками. Понимание механизмов их взаимодействия является необходимым условием использования наноматериалов в медицине. В настоящей работе в качестве объектов исследования нами выбраны ферментативные белки – щелочная фосфатаза (ЩФ), тромбин, лактат-дегидрогеназа (ЛДГ) и аспартат трансминаза (АСТ). Исследовалось взаимодействие белков с фосфорными (ФД) и полиами-

доаминными (ПАМАМ) дендримерами 3-его и 4-ого поколений. В данной работе проведен анализ биосовместимости дендримеров с целью их использования в качестве эффективных и безопасных переносчиков генетического материала для лечения рака.

Методика эксперимента.

В работе использованы тромбин человека (Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, МЗ РБ), ЩФ (Sigma-Aldrich Chemical Company, США), ЛДГ (Sigma-Aldrich Chemical Company, США) и АСТ (ERM, Sigma-Aldrich Chemical Company, США). Растворы белков, кроме ЩФ, готовили в 10 мМ фосфатно-буферном растворе, pH 7,4. Для ЩФ использовали буфер по Кларку-Лабсу, pH 8,0 [1]. Измерения кинетики триптофановой фосфоресценции при комнатной температуре (ТФКТ) в микросекундном диапазоне проводили на автоматизированном лазерном спектрометре, созданном в Институте физики им. Степанова НАН Беларуси [2]. В качестве возбуждающего излучения использовали импульсы  $\lambda=290$  нм. Удаление кислорода из образцов осуществляли с помощью сульфита натрия (20 мМ) в течение 15 мин при 20 °С. Коммерческие дендримеры ПАМАМ G3, G4 были получены из Sigma-Aldrich Chemical Company (США). ФД были синтезированы в Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS [3].

Результаты и обсуждение.

Исследовано взаимодействие между ферментативными белками и катионными ПАМАМ и фосфорными дендримерами 3-его и 4-ого поколений методом ТФКТ в микросекундном диапазоне.

Показано, что добавление дендримеров к растворам белков приводило к частичному тушению микросекундной ТФКТ всех исследованных белков. Значения времен жизни ТФКТ белков значительно снижаются при взаимодействии с ФД и ПАМАМ дендримерами 3-его и 4-ого поколений. Полученные результаты свидетельствуют об эффекте динамического тушения ТФКТ белков при комплексообразовании с дендримерами при молярном соотношении 6:1 (дендример:белок), что является следствием усиления частоты и амплитуды внутримолекулярной подвижности структуры белков и сопровождается частичным разворачиванием белков.

Таким образом, при образовании комплексов белка с дендримерами происходит увеличение внутримолекулярной подвижности компонентов структуры белка. При этом, формирование комплексов белка с дендримерами приводит к экспонированию дендримером поверхностных триптофанилов белка в водное окружение.

Интересно, что максимальный эффект наблюдался в случае ТФКТ щелочной фосфатазы, белка, имеющего аномально жесткий центр. При этом время жизни ТФКТ белка существенно снижалось при добавлении дендримеров в молярном соотношении 6:1 (дендример:белок). Схожие изменения наблюдались для обоих типов дендримеров двух генераций.

Для фосфорных дендримеров наблюдался более выраженный эффект, чем для ПАМAM дендримеров. Данные можно объяснить следующим образом. Времена жизни ТФКТ белков сильно зависят от удаления кислорода [4-6]. Сильное взаимодействие дендримеров с поверхностью белка может ограничить эффективное удаление кислорода из белковой глобулы [4-6], что приводит к существенному уменьшению ТФКТ.

Полученные результаты позволяют предполагать значительный вклад жесткости структуры белковых макромолекул в их взаимодействие с наноструктурами.

This work was partially supported by the National Science Centre of Poland, Project No. DEC-2012/04/M/NZ1/00059 and by a Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme Fellowship within the 7th European Community Framework Programme, project No. PIRSES-GA-2012-316730 NANOGENE. Также работа поддержана грантом БРФФИ № Б15МС-001 «Индукцируемые наноматериалами изменения структурно-динамического состояния щелочной фосфатазы, тромбина, лактат-дегидрогеназы и аспаргат трансминазы»

### Литература

1. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – Москва: Мир, 1999. – 543 с.
2. Борисевич Н.А., Суходола А.А., Толсторожев Г.Б. Природа длительной люминесценции N-метилиндола и индола в газовой фазе // Журн. прикл. спектр. – 2007 – Vol. 74, № 3. – P. 341-345.
3. Phosphorus-containing dendrimers. From material science to biology / J.P. Majoral, A.M. et al // Heteroatom Chem. – 2002. – Vol. 13. – P. 474–485.
4. Saviotti M.L., Galley W.C. Room temperature phosphorescence and the dynamic aspects of protein structure // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1974. – Vol. 71, № 10. – P. 4154 – 4158.
5. О конформационной чувствительности параметров триптофановой фосфоресценции при комнатной температуре белков мембран и клеток / В.М. Мажуль и др. // Весці АН БССР. Сер. Біял. Навук. – 1976. – № 6. – С. 52 – 56.

6. Мажуль В.М., Ермолаев Ю.С., Конев С.В. Триптофановая фосфоресценция при комнатной температуре – новый метод изучения структурного состояния биологических мембран и белков в клетке // ЖПС. – 1980. – Т. 32, Вып. 5. – С. 903 – 907.

## СВОЙСТВА МОЛЕКУЛЯРНЫХ РОТОРОВ НА ОСНОВЕ НОВЫХ СТИРИЛОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

Луговский А.А.<sup>1</sup>, Самцов М.П.<sup>1</sup>, Луговский А.П.<sup>1</sup>,  
Лавыш А.В.<sup>2</sup>, Маскевич А.А.<sup>2</sup>, Кузнецова И.М.<sup>3</sup>, Туроверов К.К.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup> Гродненский госуниверситет им. Я. Купалы, Гродно, Беларусь

<sup>3</sup> Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, РФ

В настоящее время однозначно показано, что болезнь Альцгеймера и ряд других прогрессирующих нейродегенеративных расстройств связаны со спонтанной пространственной перестройкой определённого белка (специфичного для каждого заболевания) и его последующей полимеризацией с образованием амилоидных фибрилл (АФ) с молекулярной массой в несколько миллионов дальтон, вызывающих дегенерацию нейронов [1]. Обнаружение АФ в различных тканях является актуальной задачей для разработки эффективной диагностики данных заболеваний на ранних стадиях. В качестве флуоресцентного зонда для изучения АФ широко используется бензотиазоловый краситель тиофлавин Т (ThT), образующий интенсивно флуоресцирующий в сине-зеленой области (450–500 нм) комплекс. Однако использование ThT в опытах *in vivo* осложняется тем, что в этой спектральной области биологические ткани обладают значительным собственным поглощением и флуоресценцией.

Нами был синтезирован ряд производных ThT, обладающих длинноволновым поглощением и флуоресценцией и являющихся перспективными в качестве флуоресцентных красителей для детекции и изучения структуры фибрилл и протофибрилл. Выполнены измерения спектров поглощения и флуоресценции синтезированных соединений в растворителях различной полярности. Максимумы спектров поглощения красителей смещаются в длинноволновую область с ростом длины полиметиновой цепочки. Так максимум поглощения соединения (1) в изопропанол находится на длине волны 421 нм, для монокарбостирилового соедине-

ния (2) – 543 нм, а для дикарбостириловых красителей (3) и (4) – 584 и 556 нм, соответственно.

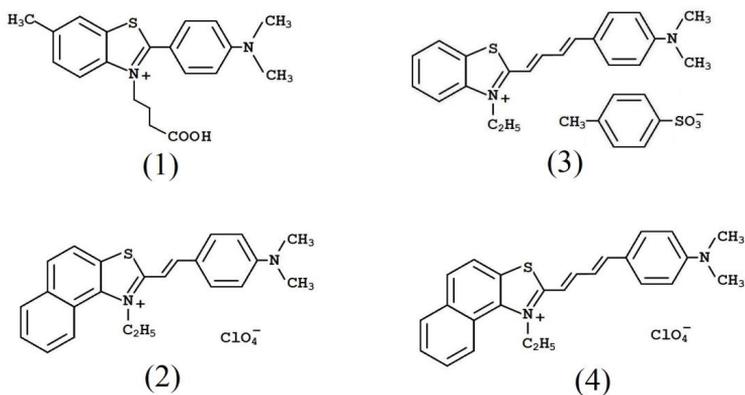


Рисунок 1 – Структуры синтезированных соединений

Установлено, что с ростом полярности растворителя спектр поглощения всех полученных соединений испытывает гипсохромный сдвиг. Вследствие взаимодействия молекул красителя с полярными молекулами растворителя энергия основного состояния понижается, что и приводит к гипсохромному сдвигу спектра поглощения. При этом величина сдвига увеличивается с ростом полиметиновой цепочки исследуемых стироловых красителей. Положение спектра флуоресценции также изменяется в различных растворителях, однако не наблюдается определенной зависимости от полярности растворителя.

Выполнены измерения спектров флуоресценции (возбуждение 520 нм) и кинетики затухания флуоресценции (возбуждение 467 нм) красителей в водно-глицериновых растворах, имеющих различную вязкость. Установлено, что с ростом вязкости растворителя существенно возрастает интенсивность и длительность затухания флуоресценции всех исследуемых соединений. Такое свойство данных соединений позволяет отнести их к классу молекулярных роторов [1]. Например, при увеличении вязкости среды на 2 порядка интенсивность флуоресценции соединения (3) увеличивается примерно на порядок, а длительность затухания возрастает от 0,09 до 1,15 нс. Интересно отметить, что для соединения (1) характерно наличие двух полос поглощения с максимумами на 330 и 420 нм, причем при возбуждении на 330 нм интенсивность флуоресцен-

ции соединения (1) снижается практически в 2 раза, в то время как при возбуждении на 420 нм интенсивность флуоресценции возрастает примерно в 60 раз при увеличении вязкости раствора на 2 порядка. При этом оптическая плотность на длинах волн возбуждения с увеличением вязкости практически не изменялась.

Для исследования спектральных свойств соединений (1)–(4) в водном (рН 6,0) растворе в присутствии протофибрилл и фибрилл, измерения выполняли в процессе приготовления фибрилл (т.е. инкубации белка), добавляя к раствору красителя одинаковое количество раствора инкубируемого инсулина быка, а также в присутствии зрелых фибрилл при различных концентрациях. Результаты измерений представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Интенсивность флуоресценции синтезированных красителей в зависимости от концентрации АФ ( $C_{\text{АФ}}$ )

Соединение	Интенсивность флуоресценции, отн. ед.			
	без фибрилл	$C_{\text{АФ}} = 0,05$ мг/мл	$C_{\text{АФ}} = 0,08$ мг/мл	$C_{\text{АФ}} = 0,10$ мг/мл
(1) (возб. 390 нм)	15,7	18,7	29,5	31,7
(2) (возб. 500 нм)	3,4	21,0	34,3	42,1
(3) (возб. 500 нм)	7,5	22,8	31,9	35,7
(4) (возб. 500 нм)	6,7	26,7	41,9	52,3

На основании полученных результатов можно заключить, что в присутствии АФ в растворе происходит значительное возрастание интенсивности флуоресценции производных ThT (особенно соединений (2) и (4)), что может быть объяснено встраиванием молекул данных соединений в фибриллы. При встраивании жесткая структура  $\beta$ -складчатого листа АФ препятствует торсионному вращению фрагментов молекул друг относительно друга, вследствие чего переход в нефлуоресцирующее ПСТ-состояние оказывается невозможным. Это позволяет заключить, что новые синтезированные соединения могут рассматриваться как перспективные флуоресцентные зонды для обнаружения и изучения АФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (договор № Ф14Р-226).

## Литература

1. Chimon, S. et al. Evidence of fibril-like  $\beta$ -sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2007. – 14. – P.1157–1164.

## СИММЕТРИИ В ИЕРАРХИЯХ ХИРАЛЬНЫХ БЛОКОВ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ

Малышко Е.В., Твердислов В.А.

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
физический факультет, кафедра биофизики,  
ул. Ленинские горы, д.1, кор.2, Москва, Россия, 119991*

Одним из продуктивных методов теоретической биологии является геометризация задачи. Естественно предположить, что генетический мир нуклеиновых кислот и мир белков должны функционировать в пространстве одного ранга симметрий, но с определенным количественным отличием в материальных носителях. Речь идёт о соотношениях симметрий в первичных, вторичных и т.д. структурных уровнях в нуклеиновых кислотах и белках. При этом обе системы должны быть построены иерархически, чтобы иметь исполнительную и регулирующую подсистемы. Естественным инструментом в комбинаторике структурных корреляций в этих подсистемах становится хиральный дуализм элементов на всех уровнях структурной организации. Предназначение биологических иерархий состоит в способности сопрягать разномасштабные в пространстве и времени процессы.

Впервые в макромолекулярных системах нами были выделены знакопеременные уровни иерархии хиральных объектов в последовательности от «нижнего» ассиметричного атома углерода до суперспиралей и надмолекулярных структур [1,2]. Отмечено закономерное чередование знака хиральности D-L-D-L при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации ДНК [3]. Последовательность смены знака хиральности в структурно-функциональной иерархии белковых структур подобна той, что мы наблюдали для ДНК: L-D-L-D. Очевиден сдвиг на полпериода, поскольку белковая иерархия «стартовала» с L-аминокислот, а нуклеотидная – с D-углевода дезоксирибозы. Первичная структура белка представляет собой последовательность остатков L-аминокислот. Полипептидная цепь укладывается в спираль или в склад-

чатый слой. Как правило,  $\alpha$ -спираль является правым энантиомером - правая  $\alpha$ -спираль стабильнее левой [4]. Взаимодействующие правые  $\alpha$ -спирали стремятся образовать левую суперспираль. Четвертичная структура белков представлена надмолекулярными структурами, сформированными при правой укладке левых суперспиралей.

В то время как знаки хиральности для первых двух уровней иерархии белковых структур не вызывают сомнений, знакопеременные уровни в более сложных конструкциях третичной и четвертичной структуры выглядят не такими однозначными и представляют особый интерес.

Авторами [5] предложена систематическая классификация суперспиралей, представленная «периодической таблицей». Белковые структуры разделены на две группы: классические (с одной суперспиралью и, следовательно, одним гидрофобным ядром) и комплексные/сложные (содержащие две и более классические суперспирали). Классические суперспирали из двух, трех, четырех или пяти спиралей занимают первый ряд таблицы и возглавляют каждый столбец, в то время как сложные суперспирали разделяются на классы и вертикально упорядочиваются в зависимости от того, на какой классической суперспирали они основываются. Каждый белок, содержащий суперспираль, можно рассмотреть отдельно при помощи ресурса [6]. Для доказательства преобладания левой конфигурации суперспиралей всех типов мы проанализировали все доступные белковые структуры из «периодической таблицы» [5,7]. Практически во всех случаях, когда визуально наблюдалось внутримолекулярное перекрытие  $\alpha$ -спиралей, выявлена тенденция их свивания в левую суперспираль. В результате анализа получены количественные оценки наличия мотива левого свивания для каждого выделенного в таблице из [5] класса. Отметим, что в простейшем случае – для суперспирали, состоящей из двух  $\alpha$ -спиралей, - характерна левая укладка почти что во всех структурах этого класса. С увеличением количества  $\alpha$ -спиралей число структур с подобной тенденцией уменьшается, но в отдельных классах, представленных наиболее сложными суперспиралями из 5-9  $\alpha$ -спиралей, процентное содержание структур с тенденцией к левой укладке в данном классе резко увеличивается. Обращаем особое внимание, что среди всего многообразия структур из [5] правое свивание было отмечено лишь в двух случаях: в тетрабрахионе термофилов *Staphylothermus marinus* (1FE6 в [6]) и в искусственно синтезированном тетрамере (1RN4 в [6]). В ряде случаев было сложно судить о свивании из-за нагромождений  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -листов в белках над суперспиралью. Иногда явную тенденцию было сложно проследить из-за слишком коротких фрагментов  $\alpha$ -спиралей в составе суперспирали. К тому же, в некоторых случаях

(особенно часто – в суперспирали на основе 4-х  $\alpha$ -спиралей) отмечена почти параллельная укладка  $\alpha$ -спиралей с совсем небольшим свиванием влево, и эти структуры мы не стали причислять к обладающим левым мотивом укладки.

Основываясь на этом, высказанное нами ранее утверждение о закономерной смене знака хиральности при переходе от вторичной к третичной структуре для  $\alpha$ -спиралей можно считать убедительно обоснованным. Необходимо заметить, что и на уровне четвертичных структур белков можно проследить тенденцию смены знака хиральности [2].

Термодинамической причиной структурообразования является вертикальная рацемизация, а сам эффект объясняет траектории фолдинга, а также функционирование молекулярных машин [1]. Практическое применение исследования может быть направлено на анализ межмолекулярных взаимодействий системы «хиральное лекарство – мишень», а так же для анализа влияния хиральных ксенобиотиков на организмы.

#### Литература

1. Твердислов В.А., Малышко Е.В., Ильченко С.А. Известия РАН. Серия физическая, том 79, № 3, – с. 1728–1732.
2. Твердислов В.А. Биофизика. 2013. – т. 58, № 1. – С. 159.
3. Твердислов В. А., Сидорова А. Э., Яковенко Л. В. Биофизика. – 2012. – т. 57, № 1, – с.146.
4. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами. 3е изд., испр. и доп. М.: КДУ, – 2005. – 456 с.
5. Moutevelis E. and Woolfson D. J. Mol. Biol. – 2009. – V. 385. – P. 726–732.
6. <http://www.rcsb.org/>; H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. –2000. Nucleic Acids Research, – V. 28. – P. 235-242.
7. OD Testa, E Moutevelis, and DN Woolfson. Nucleic Acids Res. 2009. – V. 37, – D315-D322.

## СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА «ThT – АМИЛОИДНЫЕ ФИБРИЛЛЫ». ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ГКР

Маскевич А.А., Лавыш А.В., Степура В.И., Кивач Л.Н.,  
Маскевич С.А.

*Гродненский госуниверситет им. Я. Купалы, Гродно, Беларусь,  
amaskevich@grsu.by*

Широкое применение тиофлавина Т (ThT) для детекции амилоидных фибрилл (АФ) предполагает знание способов встраивания в белковую матрицу молекул тиофлавина Т, определяемых их структурой в адсорбированном состоянии. Информативными для изучения структуры молекулярных комплексов являются методы колебательной спектроскопии, в особенности спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) [1].

Для изучения структурно-конформационных состояний адсорбированных молекул ThT и их связи с физико-химическими свойствами поверхности получены спектры ГКР красителя с использованием широкого набора ГКР-активных субстратов: гидрозолы серебра, тонкие серебряные пленки (ТСП) различной массовой толщины и топографии поверхности, модифицированные слоями полиэлектролитов. Данные ГКР-активные субстраты характеризуются также различным уровнем проявления электромагнитных и химических механизмов усиления ГКР, зависящим от длины волны возбуждения [2]. Связывание ThT с поверхностью серебряных наночастиц осуществляется посредством атома серы тиазолового кольца молекулы [3] так, что длинная ось молекулы расположена параллельно, а короткая – перпендикулярно поверхности. Плоскости колец располагаются практически перпендикулярно металлической поверхности, при этом сохраняется нативная конформация молекулы. Интенсивность колебательных полос определяется вероятностью возбуждения локализованных плазмонов на поверхности серебряных наночастиц и электронных состояний с переносом заряда комплекса ThT- $Ag_{\text{коллоид}}$ .

При добавлении АФ в раствор ThT, содержащий коллоиды серебра происходит уменьшение интенсивности всех колебательных полос спектра ГКР (рисунок 1). При этом относительно высокую интенсивность сохраняют колебательные полосы  $533$ ,  $701$  и  $1594 \text{ см}^{-1}$ . Наибольшие изменения в спектре ГКР красителя имеют место при возбуждении  $532 \text{ нм}$ , при этом происходит увеличение относительной интенсивности колеба-

тельной полосы  $744\text{ см}^{-1}$ , а также значительное уменьшение интенсивности полосы  $797$  и  $1400\text{ см}^{-1}$ . Основной вклад в образование последних вносят маятниковые колебания метильных групп  $\rho(\text{CH}_3)_{\text{C}_9, \text{C}_{19}}$ , связанных с атомами азота  $\text{N}_8$ ,  $\text{N}_{18}$  и деформационные колебания  $\delta(\text{C}_5\text{N}_8\text{C}_9)$  и  $\delta(\text{C}_{10}\text{N}_8\text{C}_9)$ . Это позволяет предположить, что при встраивании в структуру фибрилл участвуют метильные группы, связанные с атомами азота  $\text{N}_8$  и  $\text{N}_{18}$ .

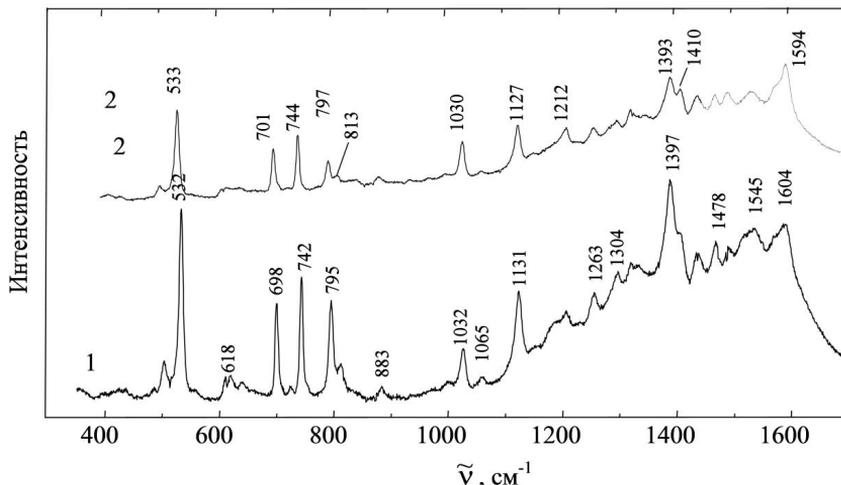


Рисунок 1 – Спектр ГКР ThT в цитратном золе в отсутствие (1), и при добавлении амилоидных фибрилл (2). Концентрация красителя  $3 \cdot 10^{-6}$  моль/л, длина волны возбуждения  $532\text{ нм}$

На основании полученных результатов предложена схема встраивания ThT в бороздки АФ и связывания с металлической поверхностью серебряного гидрозоля (рисунок 2), в соответствии с которой ThT встраивается в фибриллы так, что атомы азота  $\text{N}_8$  и  $\text{N}_{18}$  входят в складку, образованную  $\beta$ -листами, причем непосредственно контактируют с белком связанные с этими атомами метильные группы.

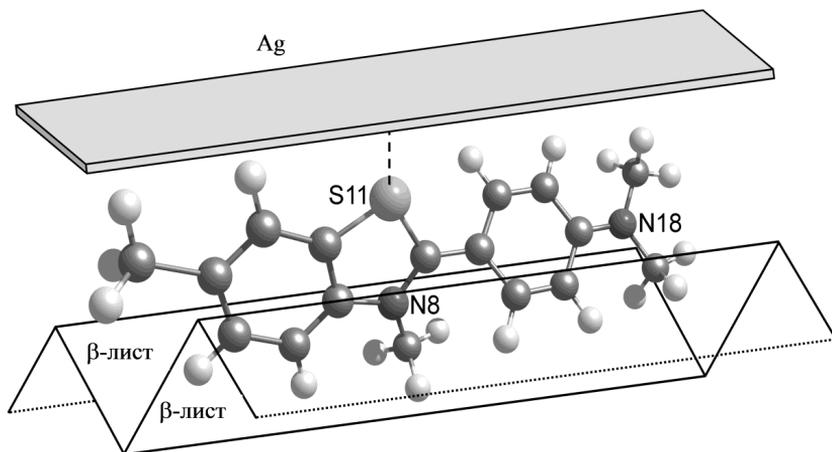


Рисунок 2 – Схема встраивания ThT в бороздки амилоидных фибрилл и связывания с металлической поверхностью серебряного гидрозоля

Слабое влияние встраивания красителя в амилоидные фибриллы на спектры ГКР можно объяснить тем, что взаимодействие молекулы с металлом и белком осуществляется посредством различных участков.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ РБ «Конвергенция» (договор А16-51), БРФФИ (договор № Ф16Р-209, № Ф16МС-21).

### Литература

1. Набиев, И. Р. Гигантское комбинационное рассеяние и его применение к изучению биологических молекул / И.Р. Набиев, Р.Г. Ефремов, Г.Д. Чуманов // Успехи физических наук. – 1988. – Т. 154, № 3. – С. 459–496.
2. Nondisturbing and stable SERS-active substrates with increased contribution of long-range component of Raman enhancement created by high temperature annealing of thick metal films / A. Feofanov [et al.] // Anal. Chem. – 1997. – Vol. 69. – P. 3731–3740.
3. Маскевич, А.А. Спектры ГКР тиофлавина Т. Проявление электромагнитных и молекулярных механизмов усиления / А.А. Маскевич [и др.] // ЖПС. – 2015. – Т. 82, № 4. – С. 497–504.

## ГЛИЦЕРИДНЫЕ ДИСПЕРСИИ С ПИРИДОКСИНОМ И ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТОЙ ДЛЯ ПРОДУКТОВ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО НАПРАВЛЕНИЯ

**Михаловский И.С.<sup>1</sup>, Бабодей В.Н.<sup>2</sup>, Пчельникова А.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский государственный экономический университет,  
Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по  
продовольствию, Минск, Беларусь*

Обогащение масложировых продуктов полярными биологически функциональными соединениями, например, водорастворимыми витаминами представляет определенную проблему. С этой целью проводится синтез витаминов с гидрофобными участками [1,2]. Однако, любая химическая модификация коферментов приводит к изменению их физиологических свойств. В этой связи представляет значительный интерес создание низкоразмерных дисперсных систем из липидов с водорастворимыми витаминами, пригодными для включения их в неполярные среды.

В работе приведены результаты исследований по созданию коллоидной формы важнейших витаминов пиридоксина (В<sub>6</sub>), фолиевой кислоты (В<sub>9</sub>) с глицеридами ненасыщенных жирных кислот для введения их в масложировые продукты.

В процессах получения витаминных коллоидов использовали методы ультразвуковой обработки материалов. В смесь глицеридов (растительное масло) вводили водный раствор витаминов. Использовали композицию пиридоксина, фолиевой кислоты. Отношение объемов водной фазы и глицеридной среды составляло 1:200. Создавали грубую эмульсию водной фазы с витаминами в глицеридной среде с применением роторной магнитной мешалки. Затем данную эмульсию обрабатывали ультразвуком с использованием установки ИЛ100-6/1 производства ООО «Ультразвуковая техника – ИНЛАБ» (РФ) с магнитострикционным преобразователем электромагнитной энергии и водяным охлаждением. Частота ультразвуковых колебаний составляла 22 кГц, мощность 700 Вт. Диспергирование субстанции проводили в цилиндрической емкости, применяя волновод с коэффициентом передачи 1:1. Готовый коллоид водорастворимых витаминов хранили в темноте при температуре 20 °С.

Кинетику дисперсной фазы коллоида из глицеридов с витаминами исследовали с помощью спектрофлуориметрического комплекса СМ2203 производства ЗАО «Солар» (РБ). Анализировали зависимость оптиче-

ской плотности  $D$  образца коллоида от времени его инкубирования  $t$  (режим «Кинетика») в термостатируемой кварцевой кювете (оптический путь образца 1 см) при равномерном перемешивании с помощью конструктивно встроенной в кюветное отделение и программно управляемой магнитной мешалки. Интервал сканирования - 0,5 с. При этом ширина щели падающего света, устанавливаемая программно, равнялась 2 нм.

С целью выбора длины волны для изучения кинетики зарегистрировали спектры поглощения пиридоксина (1), фолиевой кислоты (2), и глицеридов ненасыщенных жирных кислот (рис. 1). Поскольку глицериды представляют собой вязкую жидкость, их спектр поглощения регистрировали без применения растворителей (кривая 1, рис 1). Видно, что на длинах волн более 700 нм отсутствуют поглощающие излучение хромофоры. Исследовали динамику изменения дисперсной фазы на длине волны 730 нм.

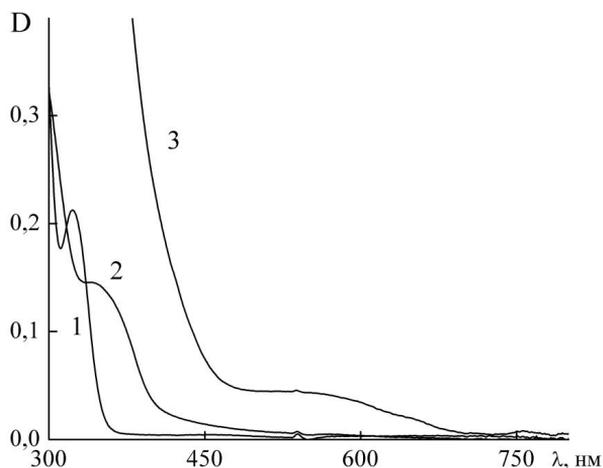


Рис. 1. Спектры поглощения пиридоксина (1), фолиевой кислоты (2), глицеридов ненасыщенных жирных кислот (3).

Начинали регистрацию кинетики относительно глицеридной среды. Затем, через 60 секунд в кюветное отделение помещали кювету с 2 мл глицерид-витаминного коллоида. Оптическая плотность скачкообразно

возрастала вследствие рассеяния света на дисперсных структурах. Продолжали регистрацию кинетики в непрерывном режиме, затем дискретно, через 2 ч, 4 ч, 6 ч и 24 ч.

Поскольку температура среды в значительной степени влияет на пространственно-временные характеристики липидных дисперсных структур все эксперименты проводили при одинаковой температуре 20 °С. В промежутках между измерениями закрытую кювету с исследуемым образцом хранили в термостате при температуре 20 °С.

Анализ кинетики агрегации дисперсной фазы (построение спектров, их математическая обработка) проводили с помощью программного пакета обработки данных Origin Pro 7.0 for Windows.

Установлено, что формирование дисперсной фазы коллоида из глицеридов характеризуется одной стадией. На ней с течением времени формируется пространственная структура глицеридных частиц с молекулами витаминов. Дисперсная структура коллоида при комнатной температуре (18 – 20 °С) сохраняется длительное время, более 7 суток, что свидетельствует о возможности создания новых технологий получения витаминных дисперсных материалов.

Таким образом, на основании полученных результатов исследований можно утверждать, что перспективным направлением создания обогащенных водорастворимыми витаминами масложировых продуктов является введение их в составе глицеридных дисперсных систем без предварительного химического модифицирования молекул витаминов.

### Литература

1. Маслорастворимое производное витамина «С» // ООО «Туше Флора» [Электронный ресурс].- 2016.- Режим доступа: [http://www.tusheflora.ru/products/active\\_components/vitamins-derivatives/nikkol-vc-ip](http://www.tusheflora.ru/products/active_components/vitamins-derivatives/nikkol-vc-ip).- Дата доступа: 10.03.2016.
2. Тетрагексилдецил аскорбат (Витамин С) // Aromarti [Электронный ресурс].- 2016.- Режим доступа: [http://aromarti.ru/tetrahexyldecyl\\_ascorbate\\_10ml.html](http://aromarti.ru/tetrahexyldecyl_ascorbate_10ml.html).- Дата доступа: 10.03.2016.
3. Михаловский И.С. Равновесные и кинетические характеристики распределения порфириновых сенсбилизаторов в биологических мембранах: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.02/ И.С. Михаловский; Белорус. гос. у-нт.- Минск, 2003.- 18 с.

## НАНОСТРУКТУРНЫЕ ДИСПЕРСНЫЕ СИСТЕМЫ ИЗ ТРИГЛИЦЕРИДОВ И АМИНОВ И ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ

Михаловский И.С.<sup>1</sup>, Матвейко Н.П.<sup>1</sup>, Самойлов М.В.<sup>1</sup>,  
Тарасевич В.А.<sup>2</sup>, Белясова Н.А.<sup>3</sup>, Мельникова Г.Б.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Белорусский государственный экономический университет,  
Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

<sup>3</sup>*Белорусский государственный технологический университет,  
Минск, Беларусь*

<sup>4</sup>*Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова НАН Беларуси,  
Минск, Беларусь*

Дисперсные формы биоцидных продуктов на основе низкоразмерных коллоидов являются наиболее оптимальными, если рассматривать области их практического применения. Это связано с низкой летучестью биоактивного соединения, содержащегося в нем, присутствием эффекта «невывсыхающего дезинфицирующего покрытия», возможностью биозащиты движущихся поверхностей, в условиях влажности [1].

В данной работе приведены результаты получения дисперсной формы антисептика на основе водных коллоидов триглицеридов ненасыщенных жирных кислот и третичного амина, а также характеристики его антимикробной активности.

Эмульсию триглицеридов олеиновой кислоты массовой долей 0,2 % в фосфатно-солевом буферном растворе (рН = 7,0) обрабатывали ультразвуком с использованием установки ИЛ100-6/1 производства ООО «Ультразвуковая техника - ИНЛАБ» (РФ). Коллоиды инкубировали 2 ч при температуре 20 °С, затем центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин в 50 мл пробирках с использованием центрифуги производства Hettich Universal 320R (ФРГ). После этого отделяли супернатант, исключая объем коллоида на поверхности, и помещали коллоид в термостат для хранения при 20 °С. Следует отметить, что дисперсная фаза такого коллоида согласно исследованиям атомно-силовой микроскопией (АСМ) представляет собой матрицу глобулярных наноструктур [2].

В триглицеридный коллоид вводили водный раствор N,N-бис-аминопропилдодециламина массовой доли 0,1 % при интенсивном и равномерном перемешивании на роторной магнитной мешалке.

С использованием АСМ установлено, что на кремниевой подложке в сухом состоянии триглицеридные структуры с амином образуют сегменты, близкие к сферической форме (рис. 1). Среднее значение линейного размера частиц не превышает 20 нм. Можно предположить, что в водной среде эти комплексы образуют глобулярные структуры.

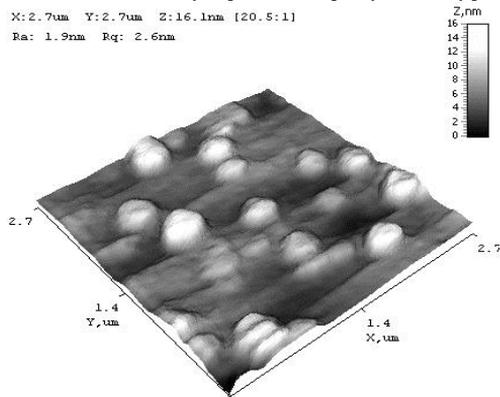


Рис. 1. АСМ-изображение триглицеридных структур с N,N-бис-аминопропилдодециламином на кремниевой подложке.

С использованием спектрофлуориметрического комплекса SM2203 «Солар» (РБ), работающего в режиме спектрофотометра исследовали также агрегативную и седиментационную устойчивость полученных липидных коллоидов на длине волны 730 нм (триглицериды и амины не поглощают данное излучение). Установлено, что введение амина в триглицеридный коллоид не приводит к деструкции дисперсной фазы.

Антимикробную активность дисперсного биоцида определяли суспензионным методом (культивирование клеток в присутствии биоцидов). Тест-культуры – санитарно-показательные бактерии *Escherichia coli* В (грамотрицательные) и *Bacillus subtilis* 168 (грамположительные), а также дрожжи *Candida tropicalis* H2. Антимикробную активность (способность обуславливать гибель клеток) оценивали фактором редукции ( $FR$ ):

$$FR = \log(K_2 / K_1)$$

где:  $K_1$  – концентрация жизнеспособных клеток после инкубирования в присутствии биоцида, КОЕ/см<sup>3</sup>;  $K_2$  – концентрация жизнеспособных клеток после инкубирования в питательной среде без биоцида, КОЕ/см<sup>3</sup>.

В таблицах 1 и 2 приведены результаты определения антибактериальной активности триглицеридных коллоидов с третичным амином. Концентрация жизнеспособных клеток после 24 ч инкубирования в питательной среде без биоцида составила: *E. coli* В –  $1,5 \cdot 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>, *Bacillus subtilis* 168 –  $2,5 \cdot 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>, *C. tropicalis* H2 –  $1,4 \cdot 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

Таблица 1. Активность дисперсного биоцида

Тест-культура	Содержание жизнеспособных клеток в среде содержащей, КОЕ/см <sup>3</sup>	
	Дисперсный биоцид с 0,001 % амина	0,001% водный раствор амина
Бактерии <i>E. coli</i> В	$1.6 \cdot 10^6$	$2.8 \cdot 10^6$
Бактерии <i>B. subtilis</i> 168	$1.5 \cdot 10^5$	$2.2 \cdot 10^5$
Дрожжи <i>C. tropicalis</i> H2	$4.8 \cdot 10^6$	$6.7 \cdot 10^6$

Таблица 2. Фактор редукции

Тест-культура	Дисперсный биоцид	Раствор амина
Бактерии <i>E. coli</i> В	0,97	0,73
Бактерии <i>B. subtilis</i> 168	2,22	2,05
Дрожжи <i>C. tropicalis</i> H2	0,46	0,32

Установлено, что экспериментальный образец дисперсного биоцида проявлял несколько более высокую антимикробную активность по сравнению с водным раствором амина (контрольным образцом).

Таким образом, на основании полученных результатов можно в дальнейшем разработать новые дисперсные формы дезинфицирующих материалов определенного функционального назначения.

### Литература

1. Михаловский И.С., Самойлов М.В., Тарасевич В.А., Кохно Н.П. Молекулярные технологии биологической защиты: векторы рынка биоцидных препаратов. Науч. труды БГЭУ. – Мн.: БГЭУ. – 2012. – С. 257–263.
2. Михаловский И.С., Мельникова Г.Б., Тарасевич В.А., Самойлов М.В. Триглицеридные наноструктуры и их пространственно-временная динамика/ Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии. Сборник научных трудов // Киев: ИМФ им. Г.В.Курдюмова. – 2010. – Т. 8, № 4, С. 861 – 868.

## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ (254 НМ) НА РАЗМЕРЫ МОЛЕКУЛ КСИГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА

Небольсина А.А., Путинцева О.В., Артюхов В.Г.

*ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет,  
Воронеж, Россия*

Гемоглобин как объект исследования является удобной моделью для изучения влияния различных агентов на белковые системы. Полностью идентифицированы первичная структура гемоглобина, взаимное расположение атомов в его молекуле. Принадлежность гемоглобина к классу олигомерных белков дает возможность определять способность молекулы к диссоциации и ассоциации, оценивать роль субъединичных контактов в проявлении функциональной активности макромолекулы в целом [2].

В настоящее время в хирургической, акушерско-гинекологической и терапевтической практике для лечения ряда заболеваний широко используется метод аутотрансфузии УФ-облученной крови (АУФОК). УФ-свет с длиной волны 254 нм обладает наиболее мощным бактерицидным действием и используются в практике АУФОК-терапии [1, 3]. Он воздействует на серосодержащие аминокислоты, вызывает их фотолиз, а также энергия его расходуется на фотосенсибилизированные химические реакции в других функционально важных группах белка. Лечебный эффект метода АУФОК связывают с усилением оксигенации крови, купированием гипоксических состояний, повышением бактерицидных и нормализацией реологических свойств УФ-облученной крови, а также стимуляцией факторов клеточного и гуморального иммунитета [1, 3].

В качестве объектов исследования использовались растворы оксигемоглобина человека ( $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л) в 0,1 моль/л фосфатном буфере (рН 7,4), полученные из крови доноров в день взятия пробы.

Оксигемоглобин выделяли методом, описанным D.L. Drabkin [5] с модификациями Л.А. Блюменфельда [4]. В основе этого метода лежит явление осмотического гемолиза предварительно отмытых от белков плазмы эритроцитов раствором хлорида натрия (0,9 %). Мембраны эритроцитов осаждали центрифугированием в течение 15 минут при скорости 12000 об/мин на центрифуге MiniSpin (Германия). Очистку гембелка осуществляли методом гель-фильтрации на носителе сефадекс G-75с использованием автоматизированного хроматографа низкого давления АКТА start (GE Healthcare, Германия). УФ-облучение образцов оксиге-

моглобина человека проводили в объеме 2 мл при помощи облучателя BIO-link-BLX, 254 нм (Vilber Lourmaet, Франция).

Определение размеров молекул оксигемоглобина человека осуществляли на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZSP (Malvern, Великобритания 2015) в лаборатории Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета.

Нами были исследованы размеры нативных и модифицированных УФ-светом (254 нм) в дозах 755 и 2265 Дж/м<sup>2</sup> растворов оксигемоглобина человека с концентрацией  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л. Результаты проведенных исследований представлены в таблице.

Таблица. Размеры молекул оксигемоглобина человека при воздействии на них УФ-излучения

Объект исследования	Размер, нм
Нативные молекулы гембелка	6,23±0,88
HbO <sub>2</sub> + УФ-облучение, 755 Дж/м <sup>2</sup>	4,52±0,33*
HbO <sub>2</sub> + УФ-облучение, 2265 Дж/м <sup>2</sup>	5,50±0,69

\* Отличия от нативного оксигемоглобина статистически достоверны (P<0,05).

Анализ данных таблицы показывает, что в нативном состоянии величина размера молекул оксигемоглобина человека составила 6,23±0,88 нм. Воздействие УФ-излучения на гембелок в дозе 755 Дж/м<sup>2</sup> привело к статистически достоверному уменьшению размера молекул до 4,52±0,33 нм. Большая доза облучения (2265 Дж/м<sup>2</sup>) к статистически достоверным изменениям не приводит.

Изменение размеров молекул оксигемоглобина человека вследствие воздействия на них ультрафиолетового излучения (254 нм) свидетельствуют о вкладе сульфгидрильных групп в изменение структуры молекулы гембелка: происходит процесс компактизации оксигемоглобина человека при дозе облучения 755 Дж/м<sup>2</sup> и практически полное восстановление его размеров при облучении гембелка в дозе 2265 Дж/м<sup>2</sup>.

### Литература

1. Александрова Н.П. Применение инфузий УФО – крови при лечении синдрома гемореологических расстройств у хирургических больных / Н.П. Александрова, Е.Б. Петухов // Ультрафиолетовое облучение крови в медицине. – Владивосток, 1987. – С. 157–158.
2. Артюхов В.Г. Олигомерные белки: структурно-функциональные модификации и роль субъединичных контактов / В.Г. Артюхов, О.В.

- Башарина, Г.А. Вашанов, М.А. Наквасина, О.В. Путинцева. – Воронеж : Изд-во ВГУ, 1997. – 264 с.
3. Атясов Н.И. Эндогенная интоксикация при АУФОК–терапии в эксперименте / Н.И. Атясов, Е.В. Рязанцев, А.Н. Беляев // Анестезия и интенсивная терапия при травме. Гипоксия, эндотоксемия и методы их коррекции: Тез. докл. X Всерос. Пленума правления общества и федерации анестезиол. и реаниматол. – Нижний Новгород, 1995. – С. 124.
  4. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода / Л.А.Блюменфельд. – М. : Сов. наука, 1957.-140 с.
  5. Drabkin D. The chrystallographic and optical properties of the haemoglobin of man in comporison with those of other species // J. Biol. Chem. – 1946. – Vol. 164, № 2. – P. 703-723.

## **НОВАЯ ПАРАДИГМА СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ. I. КАК ОРГАНИЗОВАНЫ БЕЛКОВЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАШИНЫ**

**Некрасов А.Н., Анашкина А.А.**

*ИБХ РАН, Москва, Россия ИМБ РАН, Москва, Россия*

Белки являются ключевым элементов в любых биологических системах, без их участия не протекает ни один процесс регуляции, не проходит ни одно преобразование молекул. Понимание принципов организации белков является обязательным условием осмысленного влияния на их функционирование, открывая путь для «управления» функционированием биологических систем. Сложившиеся в середине XX века представления о структурной организации белков не позволили создать методологию, позволяющую определять, какие именно изменения необходимо внести в первичную структуру белков, чтобы получить необходимые изменения в их пространственной организации и функционировании. И хотя еще в работе [1] была высказана мысль о том, что все характеристики белковых молекулярных машин «записаны» в их первичной структуре, до сих пор не удавалось выявить какую-либо организацию белка, анализируя только аминокислотные последовательности полипептидных цепей [2, 3]. Причиной такого состояния дел является существующая парадигма структурной организации белков, основанная на чисто химиче-

ском взгляде на полимерную цепь формирующую первичную структуру «белковых молекулярных машин».

В рамках этой парадигмы естественным «элементарным звеном» является аминокислотный остаток. Однако, функциональными свойствами белка обладают не любые полипептиды, а только те, которые прошли через «сито» молекулярной эволюции. Чтобы понять принципы структурной организации белковых молекулярных машин, необходимо выявить, что внесла молекулярная эволюция в полимерные цепи первичных структур белков. Для того, чтобы выявить эти особенности, нами использовалась информационная энтропия [4]. В качестве объектов исследования были использованы первичные структуры белков из различных релизов базы данных NRDB.

На рис. 1 приведена схема использованного нами метода анализа первичных структур белков. Последовательно рассматривались все аминокислотные последовательности в исследуемом наборе первичных структур белков. В аминокислотной последовательности белка длиной  $L$  задавалась позиция «якорного остатка»  $n$  в позициях от 1 до  $L-1$ . Определялась частота  $F_{ij}^k$  встречаемости пары аминокислотных остатков типа  $i$  и типа  $j$ , разделенных в последовательности  $k$  позициями. Значения изменялись от 1 до 40. Таким образом, были сформированы матрицы (размером  $20 \times 20$ ) частот встречаемости пары аминокислотных остатков  $i$  и  $j$ , характеризующие расстояние между ними  $k$ .

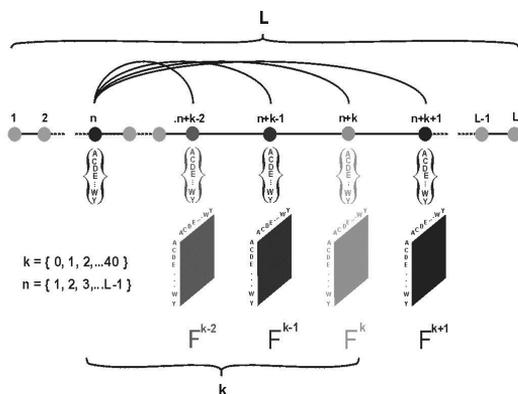


Рис.1. Схематическое представление метода анализа аминокислотных последовательностей белковых молекулярных машин.

Для определения того, как много структурной информации содержится в каждой такой матрице, использовалось уравнение (1) для расчета

информационной энтропии, предложенное в работе [4]. Для того, чтобы была возможность использовать уравнение (1) из матриц частот встречаемости аминокислотных остатков  $F_{ij}^k$  были получены матрицы вероятностей встречаемости пар аминокислотных остатков  $P_{ij}^k$ .

$$S^k = -\sum_{i=1}^{20} \sum_{j=1}^{20} P_{ij}^k \log_2 P_{ij}^k \quad (1)$$

На рис. 2А представлены значения нормированной информационной энтропии  $S^k/S^0$  как функции расстояния между аминокислотными остатками  $k$ , полученные для различных релизов (30, 60 и 90) базы NRDB. На рис. 2В из этой зависимости путем фильтрации убрана колебательная составляющая, имеющая периоды 3.6 и 2.9. Колебательная составляющая связана с наличием у белков спиралеобразных типов локальной пространственной организации.

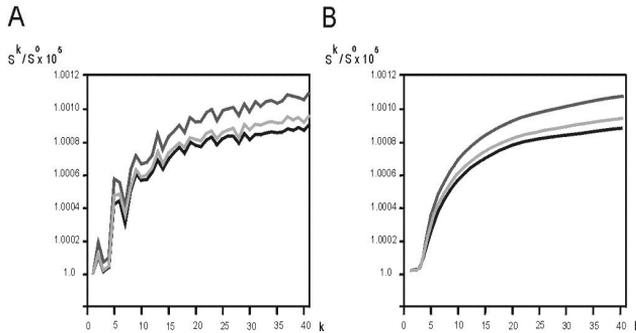


Рис.2. (А) Нормированная информационная энтропия  $S^k/S^0$  как функция расстояния между аминокислотными остатками  $k$ , полученная для релизов 30, 60 и 90 базы NRDB. (В) Нормированная информационная энтропия  $S^k/S^0$  после фильтрации колебательной составляющей.

Полученные результаты показали, что в первичных структурах белков для участков с характерной длиной в 5 остатков наблюдается постоянный и низкий уровень информационной энтропии. Этот результат позволил ввести понятие «информационной единицы». Такой подход позволил разработать метод анализа информационной структуры белка (АНИС метод), который в качестве «элементарных звеньев» белка использует «информационные единицы» и позволяет при анализе аминокислотных последовательностей белков выявлять иерархически органи-

зованные области с повышенным содержанием структурной информации (рис. 3).

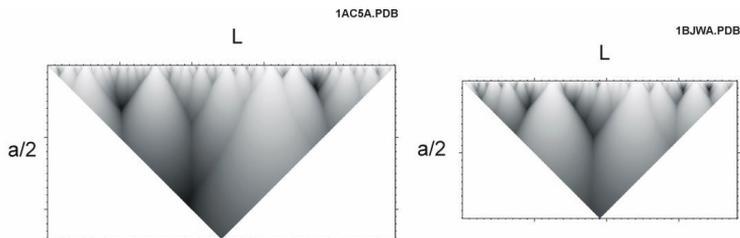


Рис. 3. Примеры расчетов информационных структур белков.  $L$  - номер остатка в последовательности.  $a/2$  - размер области, для которой оценивалось количество структурной информации.

Применение АНИС метода позволило выявить особенности структурной организации ряда ферментов и объяснить механизм их функционирования.

Работа выполнена при поддержке "Программы фундаментальных исследований Президиума РАН по стратегическим направлениям развития науки "Фундаментальные проблемы математического моделирования" по теме: Математическая модель пространственной организации природных полипептидных цепей на основе информационного контента первичной структуры" и гранта РФФИ 16-54-00219 Бел\_а.

#### Литература

1. Anfinsen, C.B. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain / C.B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela, F.H. White // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1961. – Vol. 47. – P. 1309-1314.
2. Ptitsyn, O.B. Protein structure and neutral theory of evolution / O.B. Ptitsyn, M.V. Volkenstein // J. Biomol. Struct. Dyn. – 1986. – Vol. 4. – P. 137-156.
3. Szoniec, G. Entropy of never born protein sequences / G. Szoniec, M.J. Ogorzalek // Springer-Plus - 2013.
4. Shannon, C.E. Mathematical Theory of Communication / C.E. Shannon, // A. Bell System Technical Journal – 1948. – Vol. 27. – P. 379-423.

# НОВАЯ ПАРАДИГМА СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ. II. ДИЗАЙН БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАШИН – ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

Некрасов А.Н., Зинченко А.А.

*ИБХ РАН, Москва, Россия*

Новая парадигма структурной организации белков, при которой элементарной единицей структурной организации белков является не аминокислотный остаток, а «информационная единица» (группа из 5 рядом расположенных остатков), позволила разработать метод анализа информационной структуры белков (АНИС метод) [1]. При анализе аминокислотных последовательностей белков АНИС метод позволяет выявлять иерархически организованные элементы информационной структуры белков (ЭЛИС) с повышенным содержанием структурной информации. Анализ распределения остатков, формирующих каталитический центр ряда гидролаз, по ЭЛИС высшего ранга позволил объяснить механизм функционирования этих ферментов и показать, что ЭЛИС высших рангов являются «функциональными доменами» ферментов [2]. Было показано, что у белков, имеющих четко выраженную доменную организацию, ЭЛИС высшего ранга, как правило, соответствуют структурным доменам. Это позволило предположить, что ЭЛИС высших рангов независимо формируют свою пространственную структуру и предложить метод проектирования новых рекомбинантных белков (рис. 1).

Мы предположили, что удаление из нативной аминокислотной последовательности белка фрагмента, соответствующего ЭЛИС высшего ранга, минимально нарушит нативный механизм фолдинга и позволит получить молекулярную машину с измененными характеристиками (1F). Таким образом, при необходимости изменить функциональные или физико-химические характеристики природных молекулярных машин (1A), необходимо рассчитать информационную структуру нативного белка (1B), найти фрагменты последовательности, соответствующие ЭЛИС высшего ранга (1C), а затем удалить из нативной аминокислотной последовательности молекулярной машины (1D, 1E) фрагмент, который соответствует ЭЛИС высшего ранга. Эта идеология была реализована в ряде экспериментальных работ [3, 4].

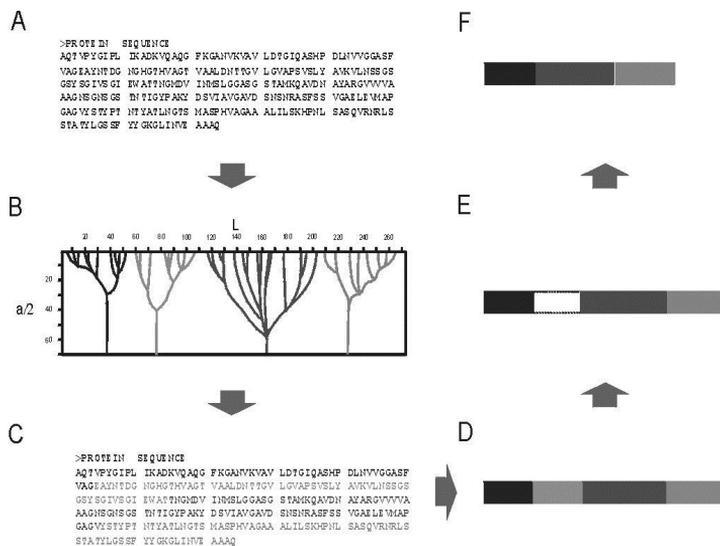


Рис. 1. Метод проектирования последовательностей новых рекомбинантных белков.

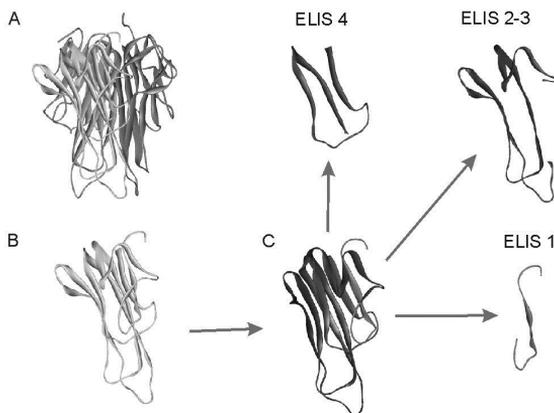


Рис. 2. (2A) Пространственная структура тримера TNF человека. (2B) Мономер TNF. (2C) Мономер TNF, на котором отмечены элементы пространственной структуры соответствующие ЭЛИС высшего ранга.

Близкий по идеологии подход был реализован в работах [5, 6], в которых выявлялся минимальный фрагмент аминокислотной последовательности молекулярной машины, обеспечивающий искомую функциональность.

На рис. 2 проиллюстрирована фрагментация молекулы фактора некроза опухоли (TNF) человека, проведенная на основе расчета информационной структуры. Выделенные на рис. 2С элементы пространственной структуры белка были выделены и очищены. Фрагмент ELIS 1 проявил активность характерную для тримера состоящего из полноразмерных молекул TNF.

При исследовании распределения ЭЛИС первого ранга в белках было показано, что аминокислотную последовательность любой белковой молекулярной машины можно представить, как совокупность сайтов трех типов: с пониженной (ADD-), повышенной (ADD+) и нормальной (NORMAL) плотностью ЭЛИС первого ранга (рис. 3). В работах [7, 8] было показано, что параметр плотности ЭЛИС первого ранга является важным фактором, определяющим формирование эффективных взаимодействий между полипептидными цепями.

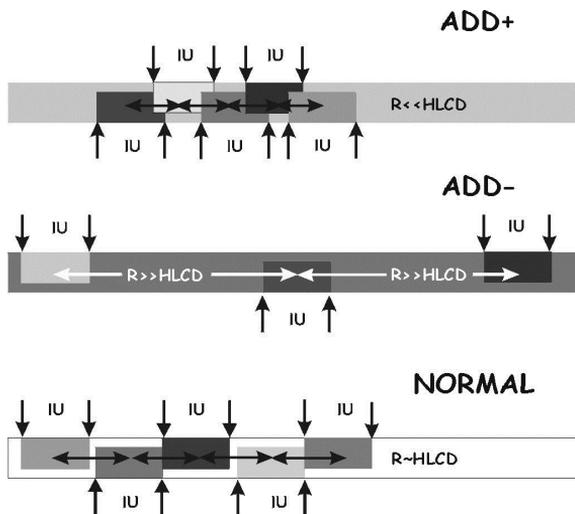


Рис. 3. Классификация сайтов по плотности ЭЛИС первого ранга.

## Литература

1. Nekrasov, A.N. A new paradigm of protein structural organization Proceedings of the 2nd International Conference Theoretical Approaches to BioInformation Systems (TABIS 2013) / A.N. Nekrasov, A.A. Anashkina, A.A. Zinchenko // Institute of Physics Belgrade, SERBIA, 2014. – 274 p. ISBN 978-86-82441-40-3.
2. A.N. Nekrasov, Hydrolases: The correlation between informational structure and catalytic sites organization / A.N. Nekrasov, A.A. Zinchenko // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2008. – Vol. 25, №5. - P. 553-561.
3. Nekrasov, A.N. The Novel Approach to the Protein Design: Active Truncated Forms of Human 1-CYS Peroxiredoxin / A.H. Некрасов [et al.] // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2007. – Vol. 24, №5. – P. 455-462.
4. Некрасов, А.Н. Применение метода анализа информационной структуры для конструирования антагониста интерлейкина-13 / А.Н. Некрасов [et al.] // Биохимия – 2009. – Том 74. – С. 493-500.
5. Шингарова, Л.Н. Получение и свойства пептидных фрагментов фактора некроза опухолей человека / Л.Н. Шингарова [et al.] // Биоорганическая химия – 2010. – Том 36, №3. – С. 327-336.
6. Каневский, Л.М. Пептидные фрагменты белка теплового шока 70 усиливают продукцию гамма-интерферона и моделируют экспрессию поверхностных маркеров в НК-клетках / Л.М. Каневский [et al.] // Медицинская иммунология – 2007. – Том 9 (2-3). – С. 142.
7. Nekrasov, A.N. Structural Features of the Interfaces in Enzyme-Inhibitor Complexes / A.N. Nekrasov, A.A. Zinchenko // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2010. – Vol. 28, №1. – P. 85-96.
8. Alekseeva, L. Cryptic B-cell epitope identification through informational analysis of protein sequences / L. Alekseeva [et al.] // Vaccine – 2007. – Vol. 25(14). – P. 2688-2697.

## КОМПЬЮТЕРНЫЙ ДИЗАЙН ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИ-ВИЧ АГЕНТОВ, БЛОКИРУЮЩИХ CD4-СВЯЗЫВАЮЩИЙ УЧАСТОК БЕЛКА GP120 ОБОЛОЧКИ ВИРУСА

Николаев Г.И.<sup>1</sup>, Кашин И.А.<sup>2</sup>, Тузиков А.В.<sup>1</sup>, Андрианов А.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Объединенный институт проблем информатики Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь, andrianov@iboch.bas-net.by*

Для терапии ВИЧ-инфекции в клинической практике используются лекарственные препараты, терапевтическое действие которых основано на блокаде различных этапов репликационного цикла ВИЧ-1. Совместное использование этих препаратов формирует основу для высокоактивной антиретровирусной терапии, которая значительно повысила выживаемость многих пациентов, инфицированных ВИЧ. Однако одной из главных проблем является высокая генетическая изменчивость ВИЧ-1, которая приводит к выработке устойчивости (резистентности) к определенному лекарству через некоторое время после начала его применения. Кроме того, токсичность анти-ВИЧ препаратов, их взаимодействие между собой, появление и передача резистентных штаммов приводят к необходимости поиска новых антивирусных агентов с новыми механизмами действия.

Внедрению ВИЧ-1 в макрофаги и Т-лимфоциты предшествует связывание белка gp120 оболочки вируса с первичным рецептором CD4 клеточной мембраны, а также с хемокиновыми рецепторами CCR5 и/или CXCR4, взаимодействие с которыми активирует процесс слияния мембран, ведущий к проникновению генома вируса в клетки-мишени. Проникновение ВИЧ-1 в клетку-хозяина представляет собой перспективную мишень для разработки новых анти-ВИЧ агентов, способных вмешиваться в ранние стадии жизненного цикла вируса. К преимуществам этих соединений можно отнести создание ими препятствия проникновению вируса в целевые клетки и уменьшение числа латентных резервуаров ВИЧ, а также возможность использования для профилактики ВИЧ-инфекции.

В настоящей работе осуществлен компьютерный дизайн новых потенциальных ингибиторов проникновения ВИЧ-1, “нацеленных” на функционально консервативный участок оболочки вируса, ответственный за его связывание с первичным рецептором CD4 клетки-мишени.

Методами молекулярного докинга проведена оценка нейтрализующей активности сконструированных соединений с последующим отбором молекул, наиболее перспективных для синтеза и тестирования на противирусную активность.

Решение этой задачи выполнено с помощью разработанного нами алгоритма для компьютерного конструирования потенциальных лекарственных препаратов на основе данных о структуре молекулярной мишени, использующего для построения наиболее вероятных структур-кандидатов биологически активных соединений реакции клик-химии. В качестве молекулярной мишени была выбрана гидрофобная полость CD4-связывающего участка белка gp120, критическая для взаимодействия вируса с остатком Phe-43 первичного рецептора CD4. При формировании исходных структурных блоков для конструирования структур-кандидатов использовали две библиотеки. Первая библиотека включала отобранные из базы данных Zinc (<http://zinc.docking.org>) небольшие молекулы с азидной или алкиновой группами и содержащие ароматический фрагмент – элемент структуры, который, согласно данным об известных ингибиторах ВИЧ, играет ключевую роль для его специфического взаимодействия с Phe-43-связывающей полостью белка gp120. Вторая библиотека содержала низкомолекулярные соединения из базы Zinc с функциональными группами, участвующими в реакции азид-алкинового циклоприсоединения – основной реакции клик-химии. На основе данных сформированных библиотек с помощью программы AutoClickChem (<http://sourceforge.net/projects/autoclickchem/>) были сконструированы соединения – потенциальные анти-ВИЧ агенты, эффективность связывания которых с белком gp120 ВИЧ-1 оценивали методами молекулярного докинга (программа QuickVina 2; <http://omictools.com/quickvina-tool>).

На рис. 1 приведена химическая структура одного из десяти лучших по энергии связывания соединений, а на рис. 2 показан структурный комплекс этой молекулы с белком gp120 ВИЧ-1. Анализ структурного комплекса показывает (рис. 2), что рассматриваемый лиганд блокирует аминокислотные остатки Val-255, Asp-368, Glu-370, Ile-371, Asn-425, Met-426, Trp-427 и Gly-473 молекулярной мишени, которые, согласно данным рентгеноструктурного анализа, принимают непосредственное участие во взаимодействии с остатком Phe-43 рецептора CD4, являющимся критическим для специфического связывания ВИЧ-1 с клеткой-мишенью. При этом ароматическое кольцо лиганда погружается внутрь полости (рис. 2), имитируя боковую цепь остатка Phe-43 молекулы CD4, что, очевидно, должно приводить к блокированию ее взаимодействия с белком gp120. Близкий механизм взаимодействия с Phe-43-связывающей

полостью белка gp120 демонстрируют и остальные соединения с низкой энергией связывания, отобранные в результате высокопроизводительного виртуального скрининга, проведенного методами молекулярного докинга.

Полученные данные позволяют рассматривать сконструированные соединения в качестве перспективных базовых структур для создания новых анти-ВИЧ агентов, способных блокировать CD4-связывающий участок белка gp120 оболочки вируса.

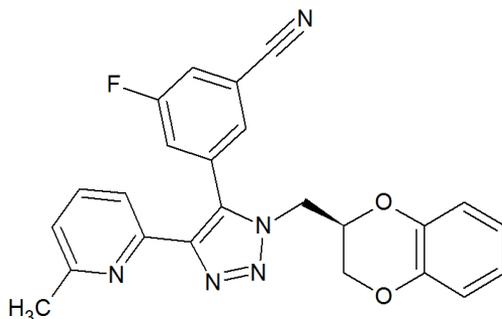


Рисунок 1 – Химическая формула соединения  $C_{24}H_{18}FN_5O_2$  – одного из лучших по энергии связывания с белком gp120 ВИЧ-1.

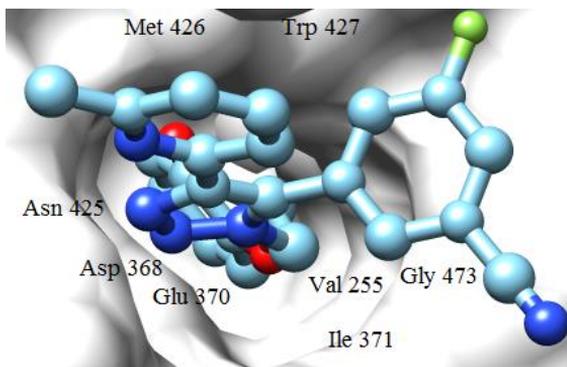


Рисунок 2 – Структурный комплекс соединения  $C_{24}H_{18}FN_5O_2$  с белком gp120 ВИЧ-1.

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (проект X15-022).

## ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ СФИНГОЛИПИДОВ И ИХ АНАЛОГОВ

Проценко К.О., Товстоган Ю.О., Бислюк Н.С.,  
Лисовская А.Г., Шадыро О.И.

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Фотоиндуцированные превращения биомолекул могут приводить к их модификации, деструкции и, как следствие, к изменению биологической функции. Из наиболее изученных фотоиндуцированных превращений липидов является процесс их пероксидного окисления, в который вовлекаются остатки ненасыщенных жирных кислот глицерофосфолипидов [1]. Сведений о фотохимических превращениях сфинголипидов в литературе практически нет, хотя эти вещества являются одними из основных компонентов эпидермиса кожи и, следовательно, подвергаются прямому и косвенному воздействию УФ-излучения.

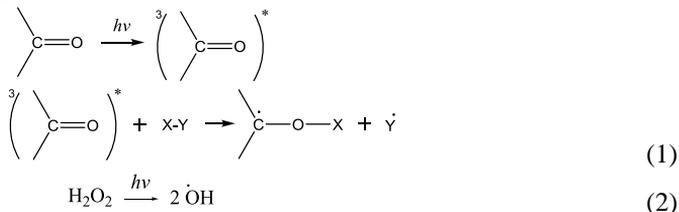
Ранее в наших работах было показано [2], что фотолиз водных дисперсий ацилсодержащих сфинголипидов (сфингомиелин, церамиды, цереброзиды) сопровождается образованием 2-гексадеценаля. Этот процесс включает стадию фотораспада по Норришу типа I с образованием и последующей фрагментацией азотцентрированных радикалов по С-С-связи исходных соединений. В то же время для лизосфинголипидов, у которых содержится свободная аминогруппа, характерны реакции С-С-деструкции при действии гамма излучения и хлорноватистой кислоты [3]. В ходе таких свободнорадикальных процессов С-С-деструкции сфинголипидов образуется 2-гексадеценаль, который является биоактивным веществом, может давать аддукты с молекулами ДНК и взаимодействовать с цитоскелетом клетки [4].

Значимость установленных процессов повреждения сфинголипидов и биоактивных продуктов их деструкции послужила основанием для установления иных путей реализации такого рода реакций.

В настоящей работе изучены фотосенсибилизируемые превращения серинола, который выступает как низкомолекулярная модель полярной части липидов. В качестве фотосенсибилизирующих добавок были использованы пероксид водорода и ацетон.

Известно, что при облучении органических веществ в растворе возникают триплетные молекулы, причем выход их сравнительно высок. Высокая эффективность экзотермического переноса энергии и относительно большое время жизни триплетных состояний обуславливают ши-

рокое распространение и важное значение фотосенсибилизированных реакций. В качестве фотосенсибилизаторов используют карбонильные соединения, имеющие высокие квантовые выходы триплетных возбужденных состояний, способных взаимодействовать с молекулами окружающей среды:



Пероксид водорода был выбран в качестве источника ОН-радикалов, т.к. способен поглощать УФ-излучение и подвергаться гомолитической деструкции с разрывом О-О-связи, давая активные ОН-радикалы (2).

На рисунке 1 представлены квантовые выходы основных карбонильных продуктов фотолиза 0,1М деаэрированных растворов сериола в присутствии добавок пероксида водорода (с=0,01 М) и ацетона (с=0,01 М).

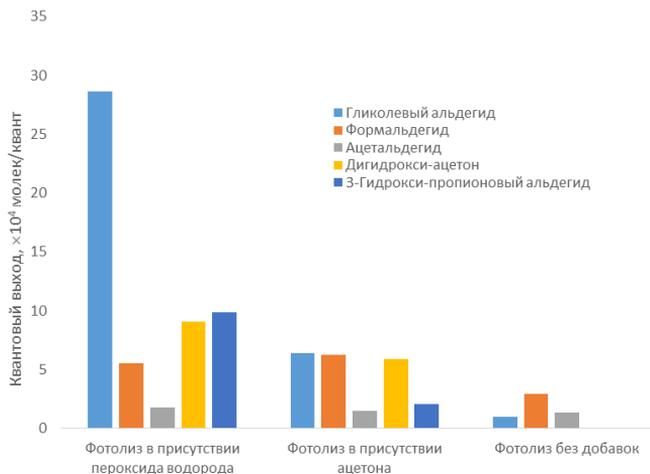
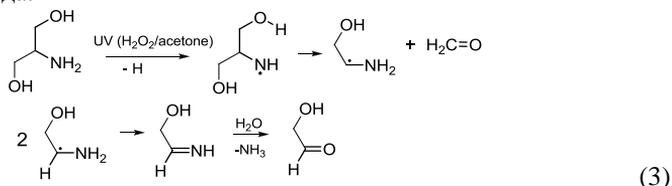
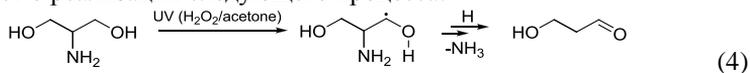


Рисунок 1 – Квантовые выходы (Ф) основных карбонильных продуктов фотолиза деаэрированных водных 0,1М растворов сериола с добавками ацетона и пероксида водорода

Из рисунка 1 видно, что квантовые выходы гликолевого альдегида и формальдегида увеличиваются в присутствии ацетона и пероксида водорода. Эти продукты являются аддуктами реакции С-С-деструкции, которая реализуется через стадию образования азотцентрированных радикалов с последующей их фрагментацией по схеме (3). При чем наибольший квантовый выход гликолевого альдегида наблюдался в присутствии пероксида водорода.



В ходе фотосенсибилизированных превращений серинола также происходит образование 3-гидроксипропионового альдегида, что свидетельствует о реализации следующего процесса:



Таким образом, нами было показано, что при фотолизе водных растворов серинола в присутствии пероксида водорода и ацетона увеличиваются квантовые выходы продуктов С-С-деструкции исходного субстрата. При этом добавка пероксида водорода увеличивает выходы деструкции серинола в большей степени. Это свидетельствует о том, что ОН-радикалы, образующиеся при фотолизе пероксида водорода, способны индуцировать процесс фотораспада серинола эффективнее, чем карбонилсодержащие фотосенсибилизаторы.

Результаты этой работы могут способствовать расширению знаний в области дальнейших исследований свободнорадикальных повреждений сфинголипидов, что, в свою очередь, может способствовать более полному пониманию происхождения заболеваний, связанных с активацией свободнорадикальных превращений в живых организмах.

### Литература

1. Girotti A.W. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2001. – V. 63. – P. 103–113.
2. Lisovskaya A.G., Shadyro O.I., Edimecheva I.P. // Photochem. Photobiol. 2012. – V. 88. – P. 899–903.
3. Shadyro O., Lisovskaya A., Semenkova G., Edimecheva I., Amaegberi N. // Lipid insights. 2011. – V. 8. – P. 1–9.
4. Kumar A., Byun H.-S., Bittman R., Saba J. // Cell. Signal. 2011. – V. 23. –P. 1144–1152.

# КОНКУРЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ СПИН-МЕЧЕНОЙ ЖИРНОЙ КИСЛОТЫ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ И КЛАСТЕРАМИ НАНОЧАСТИЦ ШУНГИТОВОГО УГЛЕРОДА

Рожков С.П., Горюнов А.С.

*ФГБУН Институт биологии Карельского научного центра РАН,  
Петрозаводск, Россия*

При взаимодействии растворимого белка с наноструктурами возникает целый ряд физиологически потенциально значимых эффектов: от окислительно-восстановительных до структурных. Среди них – влияние на связывание и обмен лигандов, что представляет интерес как с биомедицинской, так и природоохранной точек зрения. Сывороточный альбумин (СА), участвуя в транспорте жирных кислот (ЖК) в плазме крови, отличается неполным и переменным насыщением ЖК центров их связывания на белке. Изучение взаимодействия СА с таким малоизученным, но все более широко применяемым в различных технологиях наноматериалом, как водная нанодисперсия шунгитового углерода (ShC), представляет интерес для выяснения возможностей использования ShC для воздействия на перенос ЖК. Одной из наиболее информативных и непосредственных возможностей такого исследования является наблюдение методом ЭПР спин-зонда за динамическим поведением спин-меченной ЖК, вводимой в соответствующие системы.

В работе использовали гидрофобный спин-зонд на основе стеариновой ЖК 5-DOXIL (5DSA). Зонд вводили в стабильные водные дисперсии наночастиц ShC с исходной концентрацией углерода 0,1 мг/мл. Дисперсии, приготовленные по методике [1], охарактеризованные методами спектрофотометрии UV-Vis, рамановского рассеяния, динамического светорассеяния, были получены от фирмы Карбон-релиз. Средний размер нанокластеров ShC - 50 нм при нейтральных значениях pH (Nanosizer NanoZS, Malvern). Спектры регистрировались на радиоспектрометре ЭПР Bruker EMX с термостатируемой ячейкой резонатора ( $\pm 0.2$  °C) в диапазоне температур от 7 до 60 °C. Амплитуда модуляции 1 Гс и СВЧ мощность 12,6 мВт не вызывали насыщения и искажения сигнала. Параметр анизотропии определяется отношением интенсивностей низкополевых и высокополевых компонент к центральной, а время корреляции  $\tau^{\text{эфф}}$  - отношением низкополевых и высокополевых компонент с учетом ширины линий  $\Delta H$  [2].

Спин-зонд растворялся в хлороформе, хлороформ выпаривался и на пленку наносилась дисперсия ShC, либо раствор сывороточного альбумина быка (САБ). При этом часть зонда переходила в дисперсию нанокластеров ShC или СА. В отсутствие ShC или белка зонд в раствор не переходил. В результате в спектре с ShC наблюдаются три узких линии с различной амплитудой компонент, отражающих быстрое анизотропное вращение зонда, что соответствует спектру зонда 5DSA в изотропной фазе жидкого кристалла [3]. Параметр анизотропии изменялся с температурой практически линейно от 0,3 до 0,9, а параметр порядка не превышал значения 0,15. Это указывает на быстрое вращение кольца с NO группой, вокруг молекулярной оси  $y$ , перпендикулярной NO связи радикала и  $p_z$  орбитали атома азота, с временем корреляции  $\tau_{\perp}$  [3].

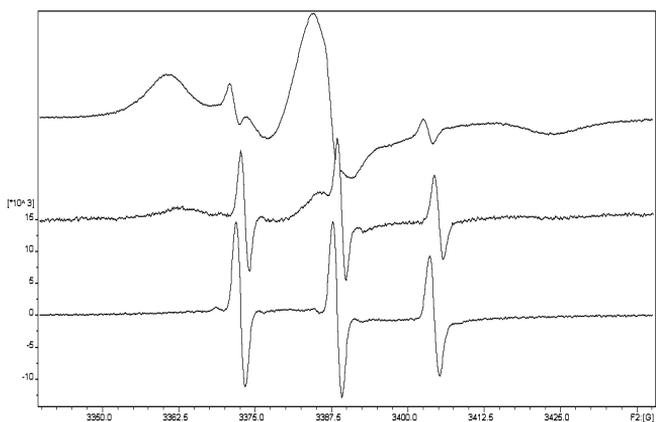


Рисунок - Экспериментальные спектры ЭПР дисперсий, содержащих спиновый зонд 5DSA. Сверху вниз: САБ; САБ+ShC; ShC.

На рисунке представлены спектры ЭПР 5DSA в комплексе с САБ, в смешанной дисперсии САБ+ShC и в дисперсии с ShC. Оказалось, что нанокластеры ShC и молекулы САБ способны конкурировать за адсорбцию 5DSA: при избытке в дисперсии САБ, 5DSA преимущественно сорбируется на САБ, но с ростом концентрации ShC идет перераспределение зонда в сторону его сорбции на кластерах ShC (средний спектр на рисунке).

Константа изотропной сверхтонкой структуры  $2a_0$ , равная расстоянию между крайними острыми компонентами спектра, свидетельствует,

что более полярным является окружение зонда, сорбированного на САБ, а наименее полярным - в системе САБ+ShC. Вероятно, это обусловлено тем, что молекулы САБ, образуя корону на кластерах ShC, экранируют микроокружение зонда от взаимодействия с растворителем.

Зависимости амплитуды низкопольной компоненты спектра ЭПР 5DSA от мощности СВЧ ведут себя одинаково в образцах с ShC и с САБ, но различаются в ShC+САБ (сильнее насыщение), указывая на обмен между двумя спиновыми подсистемами в САБ+ShC, вероятно, в связи с образованием белковой короны.

Анализ температурной зависимости  $1/\tau^{\text{эф}}$  зонда показывает, что для систем с САБ и ShC кривые имеют выраженную сигмоидную форму. Это может быть связано с фазовым переходом типа жидкость-жидкость в этих системах в диапазоне физиологических температур [1,4]. Для системы САБ+ShC эта зависимость - линейная, что указывает на отсутствие фазового перехода в смешанной системе САБ+ShC.

Таким образом, по данным ЭПР спин-зонда средство 5DSA к ShCNP, обладающему большой удельной поверхностью [1], высокое. При этом обмен белком между короной ShCNP и раствором обуславливает обратимый перенос ЖК между САБ и ShC, чему также способствовало бы частичное разворачивание конформации САБ, наблюдающееся по разным данным при взаимодействии с другими наноструктурами.

### Литература

1. Rozhkova N.N. Natural graphene-based shungite nanocarbon / N.N. Rozhkova, S.P. Rozhkov, A.S. Goryunov // Carbon Nanomaterials Sourcebook: Graphene, Fullerenes, Nanotubes, and Nanodiamonds. Vol.1. / Ed. K.D.Sattler, Boca Raton. - London, New York: CRC Press Inc. (Taylor & Francis Group), 2016. - P.151-174.
2. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М.: Наука. - 1974. – 256 с.
3. Arcioni A. Electron Spin Resonance study of order and dynamics in a nematic liquid crystal containing a dispersed aerosol / A. Arcioni, C. Bacchiocchi, L. Grossi [et al.] // J. Phys. Chem. B – 2002. – V.106. – P.9245-9251.
4. Rozhkov S.P. Thermodynamic study of protein phases formation and clustering in model water-protein-salt solutions / S.P. Rozhkov, A.S. Goryunov // Biophys. Chem. – 2010. - V.151. - P.22-28.

# ДИНАМИКА РЕЛАКСАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В МОЛЕКУЛАХ ПОРФИРИНОВ С ПРОСТРАНСТВЕННО ИСКАЖЕННЫМ И ЧАСТИЧНО ЭКРАНИРОВАННЫМ МАКРОЦИКЛОМ

Сагун Е.И., Ивашин Н.В., Панарин А.Ю.

*Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Интерес к исследованию фотофизических свойств порфиринов, их структурных аналогов и супрамолекулярных комплексов обусловлен возможностью использования таких систем для моделирования процессов переноса энергии и электрона в фотосинтетических комплексах и создания на их основе искусственных систем преобразования световой энергии. Для молекул порфиринов характерна склонность к агрегации при высоких концентрациях за счет  $\pi$ - $\pi$  и кулоновских взаимодействий, а также формирования водородных связей. Это приводит к заметному изменению спектрально-люминесцентных и фотофизических характеристик и снижает эффективность их использования в ряде важных практических приложений. Один из возможных способов предотвращения агрегации состоит в искажении плоского строения порфиринового макроцикла путем введения на его периферии объёмных заместителей различного типа. В этом случае можно ожидать уменьшения энергии связывания макроциклов за счет ослабления их межмолекулярных взаимодействий.

В данной работе приведены результаты экспериментального и теоретического исследования спектрально-люминесцентных и фотофизических свойств, а также процессов взаимодействия с молекулярным кислородом заслонённых  $\beta$ -алкилзамещённых порфиринов (CP), у которых два *пара*-метоксифенильных кольца в противоположных *мезо*-положениях макроцикла связаны в *орто*-положении между собой экранирующим мостиком ( $-OCH_2$ )-Ph-( $CH_2O$ -).

С этой целью были исследованы [1] исходный порфирин pCP (незаслонённый структурный аналог) и ряд заслонённых порфиринов 1,3Ph-CP, 1,4Ph-CP и 1,4MePh-CP (см. Рисунок), полученных на его основе, синтез и очистка которых были проведены в Ивановском государственном химико-технологическом университете.



Таблица. Фотофизические свойства S<sub>1</sub>- и T<sub>1</sub>-состояний и квантовые выходы образования синглетного кислорода исследованных соединений

Порфирин	V <sub>Соре</sub> , нм	Q <sub>x</sub> , нм	Синглетное состояние				Триплетное состояние			γ <sub>Δ</sub>
			Φ <sub>фл.</sub>	τ <sub>S</sub> , нс	τ <sub>S</sub> <sup>0</sup> , нс	k <sub>S</sub> , ×10 <sup>10</sup> , М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>	τ <sub>T</sub> , нс	(τ <sub>T</sub> <sup>0</sup> ) <sub>i</sub> , мкс	k <sub>T</sub> , ×10 <sup>9</sup> , М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>	
nCP	411	630	0.07	11.8	15.8	1.3	325	τ <sub>1</sub> = 75.5 τ <sub>2</sub> = 402.0	1.7	0.77
1,3Ph-CP	421	644	0.05	9.1	10.9	1.0	415	τ <sub>1</sub> = 9.8 τ <sub>2</sub> = 71.5	1.3	0.58
1,4Ph-CP	419	640	0.07	11.2	14.1	1.0	460	τ <sub>1</sub> = 66.9 τ <sub>2</sub> = 241.0	1.2	0.67
1,4MePh-CP	418	641	0.08	11.3	14.0	0.9	445	τ <sub>1</sub> = 55.1 τ <sub>2</sub> = 200.5	1.2	0.69

Обнаружено, что молекулы заслоненных порфиринов обладают достаточно высокими значениями квантовых выходов генерации синглетного кислорода γ<sub>Δ</sub> (Табл.). Вместе с тем, в случае соединения 1,3Ph-CP, для которого характерно наименьшее значение времени жизни T<sub>1</sub>-состояния (τ<sub>1</sub> = 9.8 мкс), квантовый выход генерации синглетного кислорода γ<sub>Δ</sub> минимальный в ряду исследованных порфиринов. Показано, что минимальное значение квантового выхода генерации синглетного кислорода γ<sub>Δ</sub> в этом случае обусловлено значительным ростом вероятности безызлучательной T<sub>1</sub> → S<sub>0</sub> дезактивации.

Показано, что константы скорости тушения возбужденных S<sub>1</sub>- и T<sub>1</sub>-состояний молекулярным кислородом k<sub>S</sub> и k<sub>T</sub> у всех исследованных стерически заслонённых порфиринов близки между собой и слабо зависят от структурных особенностей экранирующего молекулярного фрагмента. В то же время, следует отметить, что они заметно меньше (на ~ 30 - 40%) от таковых для исходной незаслонённой молекулы nCP (см. Таблицу).

Методами теории функционала плотности рассчитана структура исследуемых соединений в основном и нижнем триплетном состояниях, электронные переходы и колебательные состояния, а также матричные элементы прямого спин-орбитального взаимодействия. Проведены расчеты структуры возможных димерных форм исследованных порфиринов.

Показано, что искажение порфиринового макроцикла по типу рифления слабо влияет на энергию связывания порфириновых макроциклов

в димере и этот эффект не может предотвратить агрегацию. Вместе с тем экранирование макроцикла фенильным кольцом уменьшает вероятность образования олигомерных структур, что с учетом установленных фотофизических свойств исследованных соединений может быть использовано в фотохимических приложениях, в которых требуются повышенные концентрации порфиринов. Полученные данные указывают на перспективность использования такого типа модификаций порфиринов при разработке новых препаратов для ФДТ и сенсорной диагностики кислорода.

Авторы благодарят БРФФИ (№Ф15-039) за финансовую поддержку.

### Литература

1. Н.В. Ивашин, Е.Е. Щупак, А.Ю. Панарин, Е.И. Сагун. // Оптика и спектроскопия. – 2015. – Т. 118. – № 6. – С. 913-923.

## РАДИКАЛРЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА КУРКУМИНА И РОДСТВЕННЫХ ЕМУ СОЕДИНЕНИЙ

**Самович С.Н.<sup>1,2</sup>, Коваленко В.Н.<sup>1</sup>, Шадыро О.И.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*  
<sup>2</sup>*НИИ ФХП Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь*

Куркумин и родственные ему соединения, характеризующиеся полифункциональностью, представляют значительный интерес с точки зрения структурного многообразия и широкого спектра фармакологической активности в сочетании, как правило, с умеренной токсичностью [1]. Такие соединения должны эффективно влиять на вероятность протекания как реакции пероксидации биологически важных веществ, так и на их свободнорадикальную фрагментацию, протекающую с участием углеродцентрированных радикалов. Информацию о радикалрегуляторных свойствах куркумина и родственных ему соединений можно получить, изучая их влияние на образование конечных продуктов радиолитического этанола, при  $\gamma$ -облучении которого в качестве основных интермедиатов образуются  $\alpha$ -гидроксиэтильные радикалы ( $\alpha$ -ГЭР). Известно, что  $\alpha$ -ГЭР образуются в печени при биохимических превращениях этанола и могут вступать в реакции, приводящие к различным повреждениям внутриклеточных компонентов [2]. Поэтому изучение реакций тестируемых соединений с  $\alpha$ -ГЭР может способствовать установлению молекулярных ме-

ханизмов, обеспечивающих формирование гепатопротекторных свойств этих растительных добавок.

В настоящей работе изучено влияние куркумина (I), ванилиде-нацетона (II), зингерона (III), *транс*-4-(4-гидроксифенил)бут-3-ен-2-она (IV) и кетона малины (V) (рис. 1) на радиационно-индуцированные превращения деаэрированного и оксигенированного этанола, а также свободнорадикальные превращения соединений (I–V). Выбранные условия позволили изучить взаимодействие куркумина и родственных ему соединений (I–V) с пероксидными и  $\alpha$ -гидроксиалкильными радикалами.

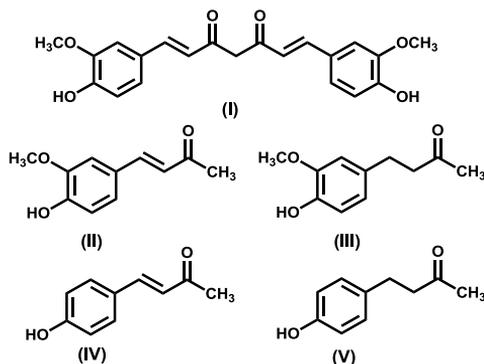
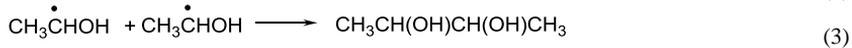
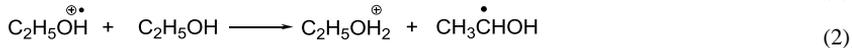


Рис. 1 – Структурные формулы тестируемых соединений

При  $\gamma$ -облучении деаэрированного этанола основными интерме-диатами являются  $\alpha$ -гидроксиэтильные радикалы ( $\alpha$ -ГЭР), которые в отсут-ствие добавок расходуются в бирадикальных реакциях рекомбинации (3) и диспропорционирования (4) с образованием бутандиола-2,3 (БД) и аце-тальдегида (АА) соответственно.

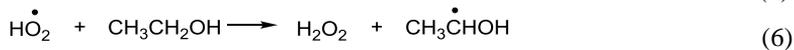
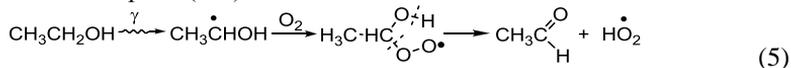


Установлено, что наиболее выраженная активность в реакциях с  $\alpha$ -ГЭР наблюдается для куркумина (I), ванилиденацетона (II) и *транс*-4-(4-гидроксифенил)бут-3-ен-2-она (IV) – для веществ, имеющих в своей структуре систему сопряженных  $>\text{C}=\text{C}<$  и  $>\text{C}=\text{O}$  связей. В присутствии

указанных добавок происходит практически полное подавление образования продукта рекомбинации  $\alpha$ -ГЭР – БД, а также увеличение радиационно-химических выходов АА в среднем в 1,2 раза. Одновременно наблюдается существенное расхождение веществ (**I**, **II**, **IV**), что свидетельствует об их эффективном вовлечении в радиационно-химические процессы при облучении в деаэрированном этаноле. Соединения (**I**, **II**, **IV**) способны ингибировать реакции рекомбинации и диспропорционирования  $\alpha$ -ГЭР за счет окисления и присоединения соответствующих углеродцентрированных радикалов, в результате чего образуются стабильные молекулярные продукты превращения куркумина и его производных, идентифицируемые методом масс-спектрометрии.

Гидрирование  $>C=C<$  связи, сопряженной с ароматическим кольцом, приводит к некоторому снижению реакционной способности зингерона (**III**) и кетона малины (**V**) по отношению к  $\alpha$ -ГЭР, поскольку реакция присоединения радикальных интермедиатов в данном случае не реализуется. При радиоллизе в деаэрированном этаноле уменьшение выходов БД в присутствии соединений (**III**, **V**) происходит в 1,4 раза, получено незначительное радиационно-химическое расхождение самих добавок. Общим свойством радиационной химии этанола с тестируемыми соединениями (**I–V**) является то, что в их присутствии происходит заметное увеличение выходов АА (в среднем в 1,3 раза), что указывает на окислительные свойства рассматриваемых веществ.

В окисгенированных условиях  $\alpha$ -ГЭР быстро взаимодействуют с кислородом с образованием гидроксиэтилпероксидных и  $HO_2^\bullet$  радикалов, дальнейшие превращения которых приводят к образованию АА и пероксида водорода (ПВ).



При радиоллизе куркумина и родственных ему соединений (**I–V**) в насыщенном кислородом этаноле наблюдается уменьшение выходов как АА, так и ПВ, которое может быть обусловлено восстановлением пероксидных радикалов указанными соединениями. Низкие величины выходов расхождения добавок могут свидетельствовать о возможности регенерации радикалов тестируемых веществ до исходных соединений.

Таким образом, при оценке радикалрегуляторных свойств тестируемых соединений (**I–V**) установлено, что, взаимодействуя с  $\alpha$ -ГЭР и пе-

роксидными радикалами по различным механизмам, куркумин и родственные ему соединения способны эффективно ингибировать радиационно-индуцированные превращения деаэрированного и оксигенированного этанола. Выявленные свойства позволяют рассматривать исследуемые вещества в качестве перспективных регуляторов процессов свободнорадикальной фрагментации биологически важных соединений.

### Литература

1. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin / T. Ak, I. Gulcin // *Chemico-Biological Interactions*. – 2008. – №174. – P. 27–37.
2. Alcohol, oxidative stress and free radical damage / E. Albano // *Proc. Nutr. Soc.* – 2006. – Vol. 65, № 3. – P. 278–290.

## ВЛИЯНИЕ БЕНЗОХИНОНОВ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ОКИСЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

**Самович С.Н.<sup>1,2</sup>, Куриленко А.А.<sup>1</sup>, Едимечева И.П.<sup>2</sup>,  
Шадыро О.И.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*НИИ ФХП Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь*

Хиноны, как известно, являются активными участниками важнейших биохимических окислительно-восстановительных процессов, что во многом определяет интерес к изучению их свойств [1,2]. Поскольку в такого рода реакциях образуются активные формы кислорода (АФК), изучению взаимодействия последних с хинонами уделялось большое внимание [2]. Высокая реакционная способность хинонов по отношению к АФК определяет их способность защищать биологически важные вещества от свободнорадикального повреждения. Данных же о влиянии хинонов на окисление органических соединений различного строения недостаточно.

В настоящей работе изучено влияние ряда бензохинонов: 1,4-бензохинон (I), метил-1,4-бензохинон (II), 2,5-диметил-1,4-бензохинон (III), 2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон (тимохинон) (IV), 2-третбутил-1,4-бензохинон (V), 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон (VI) на радиационно-индуцированные превращения насыщенного кисло-

родом этанола, а также кондуктометрическим методом исследовано влияние указанных добавок на окислительную устойчивость метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК), выделенных из льняного масла.

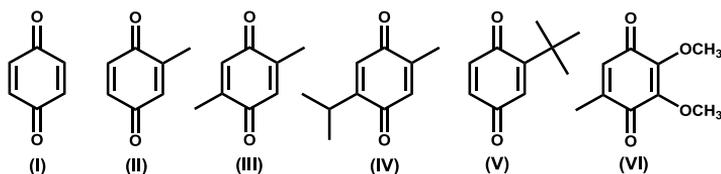
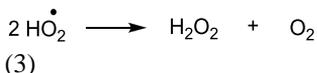
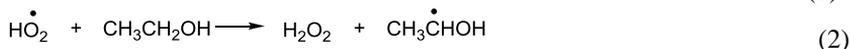
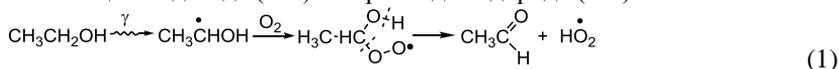


Рис. 1 – Структурные формулы тестируемых соединений.

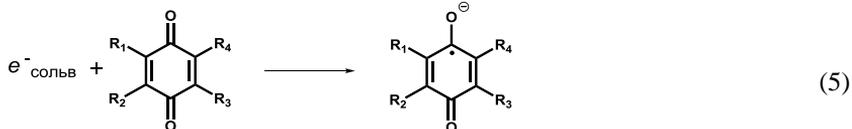
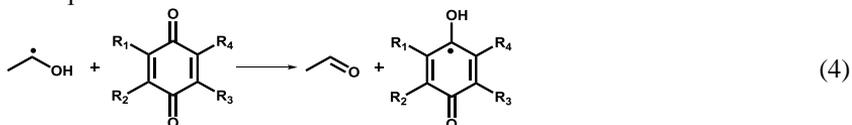
Радиационно-химические превращения этанола детально изучены [3]. Основные радикальные интермедиаты –  $\alpha$ -гидроксиэтильные радикалы ( $\alpha$ -ГЭР) – образуются в системе с радиационно-химическим выходом 5,5 частиц/100эВ. В окисгенированных условиях  $\alpha$ -ГЭР быстро взаимодействуют с кислородом с образованием гидроксиэтилпероксидных и  $\text{HO}_2^\bullet$  радикалов, дальнейшие превращения которых приводят к образованию ацетальдегида (АА) и пероксида водорода (ПВ).



Установлено, что тестируемые бензохиноны (I–VI) значительно ингибируют радиационно-индуцированное окисление этанола, о чем свидетельствует снижение выходов АА на 42–58% и ПВ в среднем в 3,3 раза в их присутствии. Наиболее выраженные антирадикальную активность проявили 1,4-бензохинон (I) и тимохинон (IV). Стоит подчеркнуть, что для всех бензохинонов ингибирующий эффект выражен в большей степени в отношении образования ПВ, нежели АА.

Известно [4], что при взаимодействии хинонов с углеродцентрированными радикалами с высокой вероятностью реализуется реакция окисления последних. Следовательно, наблюдаемые антиоксидантные свойства бензохинонов (I–VI), вероятно, обусловлены реакцией окисления ими материнских радикалов субстрата, в данном случае –  $\alpha$ -ГЭР (4), и реакцией взаимодействия добавок с сольватированными электронами (5). Очевидно, что реализация реакции (5), как и реакции окисления  $\alpha$ -ГЭР

(4), будет вносить вклад в повышение выходов АА, что и наблюдается в эксперименте.



где  $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4 = \text{-H, -CH}_3, \text{-CH}(\text{CH}_3)_2, \text{-C}(\text{CH}_3)_3, \text{-OCH}_3$

Наблюдаются относительно невысокие выходы расходования веществ (I–VI), что говорит о возможности регенерации соответствующих семихиноновых радикалов добавок.

Необходимо отметить, что ингибиторный эффект при окислении этанола практически не зависит от количества и положения алкильных и алкоксильных групп в структуре производных 1,4-бензохинона (I–VI).

МЭЖК, выделенные из льняного масла, были выбраны нами в качестве субстрата для пероксидного окисления вследствие высокого содержания в их составе полиненасыщенных жирных кислот (60–80 %). Установлено, что добавление к МЭЖК 1,4-бензохинона (I) и его производных (II–VI) в концентрации 0,02 % приводит к увеличению индукционного периода окисления субстрата в среднем в 1,5 раза. Это указывает на способность тестируемых соединений увеличивать окислительную устойчивость МЭЖК. Показано, что влияние тестируемых бензохинонов на окисление МЭЖК носит концентрационно-зависимый характер: значения индукционного периода возрастают в среднем в 1,3 раза с увеличением концентрации бензохинонов (I–VI) в 2,5 раза относительно исходного значения.

Кондуктометрическим методом изучено влияние 1,4-бензохинона (I) и его производных (II–VI) на процентное содержание метиловых эфиров линоленовой кислоты (C18:3) в зависимости от времени протекания процесса окисления. Установлено, что все тестируемые соединения проявляют антиокислительную активность, среди которых наиболее выраженные наблюдались для 1,4-бензохинона (I), метил-1,4-бензохинона (II) и 2-третбутил-1,4-бензохинона (V).

Таким образом, полученные результаты подтверждают наличие у 1,4-бензохинона (I) и его производных (II–VI) антиоксидантных свойств. Способность изученных соединений ингибировать процессы окисления

этанола и МЭЖК можно использовать при поиске новых регуляторов свободнорадикальных реакций окисления.

### Литература

1. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // 3rd. ed. – New York: Oxford Univ. Press, 2004. – 936 p.
2. Radiation chemistry of quinones / T. Mukherjee // Radiation chemistry: present status and future trends / Elsevier; ed. C.D. Jonah, B.S.M. Rao. – Amsterdam, 2001. – P. 323–328.
3. The radiolysis of alcohols / G.R. Freeman // Kinetics of nonhomogeneous processes: a practical introduction for chemists, biologists, physicists, and material scientists / G.R. Freeman ; edited by G.F. Freeman. – New York : Wiley-Interscience, 1987. – P. 73–101.
4. Quinones as free-radical fragmentation inhibitors in biologically important molecules / O.I. Shadyro [et al.] // Free Rad. Res. – 2002. – Vol. 36. – P. 859–867.

## РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ УРАЦИЛА И ТИМИНА С $\alpha$ -ГИДРОКСИЭТИЛЬНЫМИ РАДИКАЛАМИ

**Свердлов Р.Л.<sup>1</sup>, Бараев В.А.<sup>2</sup>, Демидчик Т.А.<sup>1</sup>, Шадыро О.И.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,  
swerdlov@mail.ru*

<sup>2</sup>*НИИ ФХП БГУ, Минск, Беларусь*

Считается, что нуклеиновые кислоты (НК) являются основными мишенями при действии ионизирующих излучений на организм. Поэтому большое внимание уделялось исследованию реакционной способности радикальных продуктов радиолитического распада воды по отношению к азотистым основаниям (АО) НК. Показано, что ОН-радикалы взаимодействуя с АО гидроксилируют их, присоединяясь по кратным связям  $-C_5=C_6-$  пиримидинов и  $-N_7=C_8-$  пуринов [1, 2]. Такого типа процессы приводят к мутациям и гибели клеток, что во многом определяет формирование радиотерапевтического эффекта при облучении злокачественных опухолей. В то же время известно, что многие раковые клетки размножаются в условиях гипоксии [3], при которой велика вероятность образования углеродцентрированных органических радикалов под действием  $\gamma$ -облучения. Как взаимодействуют органические радикалы с АО изучено недостаточно.

Поэтому установление закономерностей и механизма взаимодействия АО НК с углеродцентрированными органическими радикалами позволит проводить более эффективную терапию опухолей. В настоящей работе представлены результаты сравнения реакционной способности урацила и тимина по отношению к углеродцентрированным органическим радикалам. Для этого было исследовано взаимодействие урацила и тимина с  $\alpha$ -гидроксиэтильными радикалами ( $\alpha$ -ГЭР), которые образуются при радиационно-индуцированных превращениях деаэрированных и насыщенных закисью азота растворов 1 моль/л этанола при pH 7.

Приготовление водно-этанольных растворов (1 моль/л) и их деаэрирование аргоном осуществлялось по методике, описанной в работе [4]. Для приготовления растворов, насыщенных закисью азота, вместо аргона использовали закись азота по аналогичной методике. Концентрации тестируемых соединений составляли  $10^{-3}$  моль/л. Облучение растворов осуществляли  $\gamma$ -квантами изотопа  $^{60}\text{Co}$  на установке МРХ- $\gamma$ -25М. Мощность дозы –  $0,187 \pm 0,005$  Гр/с. Диапазон поглощенных доз составлял 0,06 – 0,67 кГр. Качественный и количественный анализ продуктов радиационно-индуцированных превращений деаэрированного и насыщенного закисью азота водного раствора этанола проводили газохроматографическим методом как в работе [4]. Концентрации добавок до и после облучения определяли спектрофотометрически на приборе Specord S600. Определение продуктов взаимодействия АО с  $\alpha$ -ГЭР осуществляли при помощи жидкостного хроматографа с масс-спектрометрическим детектированием LCMS-2020. Радиационно-химические выходы (G) образования ацетальдегида (АА), бутандиола-2,3 (БД) и расходования тестируемых соединений рассчитывали на линейных участках зависимости концентрации веществ от поглощенной дозы с использованием метода наименьших квадратов.

При действии ионизирующего излучения в деаэрированном водном растворе этанола происходит образование  $\alpha$ -ГЭР, которые в отсутствие добавок расходуются в бирадикальных реакциях с образованием АА и БД [5]. Насыщение растворов закисью азота позволяет исключить влияние сольватированных электронов на процесс взаимодействия исследуемых веществ с  $\alpha$ -ГЭР. Сольватированные электроны будут количественно превращаться в ОН-радикалы, приводя к увеличению G (АА) и (БД), в сравнении с G, наблюдаемыми для растворов деаэрированных аргоном. В обоих случаях мерой способности исследуемых соединений взаимодействовать с  $\alpha$ -ГЭР является изменение радиационно-химических выходов образования АА и БД, а также разложения исследуемых соединений.

Согласно данным, представленным в таблице, в деаэрированном водном растворе этанола урацил и тимин ингибировали образование БД, при этом в большей мере для урацила и в меньшей – для тимина, наблюдался рост G (AA). АО подвергались существенной конверсии, причем радиационно-химический выход разложения урацила был почти в два раза больше, чем у тимина. Масс-спектрометрически для урацила и тимина были зарегистрированы продукты присоединения одного  $\alpha$ -ГЭР. Наблюдаемые в деаэрированном этаноле эффекты указывают на способность исследуемых веществ присоединять и окислять  $\alpha$ -ГЭР. Кроме того, рост G (AA) может быть обусловлен взаимодействием АО с сольватированными электронами.

Таблица – Влияние урацила и тимина на радиационно-химические выходы продуктов радиолитиза деаэрированных и насыщенных закисью азота водных растворов этанола

Тестируемое соединение	Радиационно-химический выход (G), молекула/100 эВ		
	Ацетальдегид	Бутандиол-2,3	Разложение добавки
1 моль/л растворы этанола, насыщенные аргоном			
Без добавок	0,30 ± 0,05	1,73 ± 0,08	-
Урацил	1,01 ± 0,06	0,20 ± 0,05	-7,97 ± 0,27
Тимин	0,44 ± 0,05	0,03 ± 0,01	-4,40 ± 0,21
1 моль/л растворы этанола, насыщенные закисью азота			
Без добавок	2,71 ± 0,27	1,84 ± 0,12	-
Урацил	3,03 ± 0,14	0,28 ± 0,05	-4,74 ± 0,71
Тимин	1,28 ± 0,10	0,24 ± 0,05	-4,26 ± 0,07

При переходе к растворам насыщенным закисью азота наблюдается изменение влияния добавок на образование AA и БД. В присутствии урацила в пределах ошибки эксперимента G (AA) не изменяется в сравнении с системой без добавок, в то время как G (БД) снижается более чем в 5 раз. В отличие от урацила, в присутствии тимина происходит снижение как G (AA), так и G (БД). Это указывает на его более высокую реакционную способность по отношению к  $\alpha$ -ГЭР в сравнении с урацилом. При этом вещества разлагаются в близкой степени, а в качестве продуктов регистрируются как аддукты одного, так и двух  $\alpha$ -ГЭР.

Совокупность данных указывает на более высокую реакционную способность АО тимина по отношению к углеродцентрированным орга-

ническим радикалам в сравнении с урацилом. Это позволяет предположить, что ДНК будут более подвержены модифицирующему действию при радиотерапии как за счет взаимодействия с продуктами радиолиза воды, так и в результате реакций с органическими радикалами.

### Литература

1. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine / B.Halliwell, J.M.C.Gutteridge. – 3rd. ed. – New York: Oxford Univ. Press, 2004. – 936 p.
2. Von Sonntag C. Free-radical-induced DNA Damage and its repair / C.Von Sonntag. – Berlin: Springer-Verlag, 2006. – 523 p.
3. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm / Z. Ivanovic // Journal of Cellular Physiology. – 2009. – V. 219, № 2. P. 271-275.
4. Влияние витаминов группы В на радиационно-индуцированные превращения гидроксилсодержащих органических соединений / С.Д. Бринкевич [и др.] // Химия высоких энергий. – 2011. – Т. 45, № 5. – С. 414-419.
5. Пикаев А.К. Современная радиационная химия. Радиолиз газов и жидкостей / А.К. Пикаев; под ред. В.И. Спицына. – Москва: Наука, 1986. – 439 с.

### ВЛИЯНИЕ ИМИДАЗОЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ $\alpha$ -ГИДРОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ УГЛЕРОДЦЕНТРИРОВАННЫХ РАДИКАЛОВ ЭТАНОЛА И ГЛИЦЕРО-1-ФОСФАТА

Свердлов Р.Л.<sup>1</sup>, Скребкова А.С.<sup>1</sup>, Лишик О.И.<sup>2</sup>,  
Кузовков П.В.<sup>1</sup>, Шадыро О.И.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>СП ООО «Фармлэнд», Минск, Беларусь

<sup>3</sup>НИИ ФХП БГУ, Минск, Беларусь

Глицерофосфолипиды (ГФЛ) являются одним из основных компонентов биомембран. В результате свободнорадикальных (СР) превращений происходит химическая модификация структуры ГФЛ, которая обуславливает нарушение целостности биомембран, изменяя их проницаемость для внутри- и внеклеточных компонентов. Основными механиз-

мами СР повреждения ГФЛ являются перекисное окисление остатков ненасыщенных жирных кислот и фрагментация  $\alpha$ -гидроксилсодержащих углеродцентрированных радикалов ( $\alpha$ -ГУР) глициринового участка молекулы [1, 2]. Последний процесс наиболее интенсивно протекает в условиях гипоксии. В работе [2] было показано, что в результате СР фрагментации ГФЛ, протекающей через стадию образования и последующего распада  $\alpha$ -ГУР, образуются фосфатидные кислоты (ФК), регулирующие пролиферацию клеток. Таким образом, интенсификация СР фрагментации в совокупности с гипоксией будут способствовать выживанию клеток и повышать вероятность их размножения, что крайне нежелательно для онкозаболеваний. Перспективными радиосензитизаторами при радиотерапии опухолей считаются производные имидазола, в частности метронидазол и темозоломид, которые повышают радиочувствительность гипоксических опухолевых тканей [3]. Радиосензитизирующее действие нитроимидазолов может быть связано с предотвращением ими образования ФК в результате взаимодействия с  $\alpha$ -ГУР ГФЛ. Для установления способности имидазола и его производных ингибировать СР фрагментацию ГФЛ нами было изучено их влияние на превращения

$\alpha$ -ГУР этанола и глицеро-1-фосфата (Г1Ф), которые образуются при действии ионизирующего излучения на их деаэрированные водные растворы при pH 7.

В работе использовалась динатриевая соль глицеро-1-фосфата (гексагидрат) фирмы «Fluka» 98 % чистоты. Чистота исследуемых соединений – имидазола, 2-меркапто-1-метилимидазола, гистамина, метронидазола и темозоломида составляла не менее 99 % (Sigma-Aldrich). Приготовление деаэрированных водных растворов Г1Ф при pH 7 осуществлялось по методике, описанной в работе [4]. Концентрация Г1Ф составляла  $10^{-1}$  моль/л. Приготовление водно-этанольных растворов (1 моль/л) и их деаэрирование осуществлялось аналогично методике, описанной в работе [5]. Концентрации тестируемых соединений составляли  $10^{-3}$  моль/л. Облучение растворов осуществляли  $\gamma$ -квантами изотопа  $^{60}\text{Co}$  на установке МРХ- $\gamma$ -25М. Мощность дозы –  $0,187 \pm 0,005$  Гр/с. Диапазон поглощенных доз составлял 0,2 – 1,4 кГр. Концентрацию неорганического фосфата (НФ) на фоне органического определяли реagentно-спектрофотометрически с использованием методики, подробно описанной в [4]. Качественный и количественный анализ продуктов радиационно-индуцированных превращений деаэрированного водного раствора этанола проводили газохроматографическим методом как в работе [5]. Концентрации добавок до и после облучения определяли спектрофото-

метрически на приборе Specord S600. Радиационно-химические выходы (G) образования НФ, ацетальдегида (АА), бутандиола-2,3 (БД) и расщепления тестируемых соединений рассчитывали на линейных участках зависимости концентраций веществ от поглощенной дозы с использованием метода наименьших квадратов.

Радиолиз водного раствора этанола при рН 7 приводит к образованию простых  $\alpha$ -ГУР –  $\alpha$ -гидроксиэтильных радикалов ( $\alpha$ -ГЭР), которые далее в процессах рекомбинации и диспропорционирования превращаются в БД и АА, соответственно [6]. Характер влияния тестируемых соединений на величину и соотношение радиационно-химических выходов БД и АА определяется реакционной способностью и механизмом взаимодействия исследуемых соединений с  $\alpha$ -ГЭР. Нами было установлено, что в присутствии имидазола, 2-меркапто-1-метилимидазола и гистамина происходит значительное снижение G (БД) и 2-4 кратное увеличение G (АА) относительно наблюдаемых для раствора этанола без исследуемых веществ, что указывает на их способность окислять  $\alpha$ -ГЭР. В присутствии метронидазола и темозоломида наблюдается 5-9 кратное возрастание G (АА) и снижение G (БД) практически до нуля. Представленные данные указывают на высокую реакционную способность метронидазола и темозоломида по отношению к  $\alpha$ -ГЭР, а высокий G (АА) при полном отсутствии БД указывает на то, что добавки окисляют  $\alpha$ -ГЭР до АА.

НФ является главным продуктом радиолиза Г1Ф в деаэрированных водных растворах при рН 7. Как и в случае ГФЛ радиационно-индуцированное дефосфорилирование Г1Ф протекает преимущественно в результате фрагментации  $\alpha$ -ГУР и гидролиза фосфоэфирной связи [7]. Подавление процесса дефосфорилирования в присутствии исследуемых веществ при соотношении концентрации органического фосфата и добавки 100:1 происходит преимущественно за счет взаимодействия с  $\alpha$ -ГУР Г1Ф. Высокая степень подавления дефосфорилирования (~2,5 раза) наблюдалась в присутствии метронидазола, который, как нами было показано при изучении радиолиза растворов этанола, эффективно ингибирует превращения одних из простейших представителей  $\alpha$ -ГУР –  $\alpha$ -ГЭР, окисляя последние. Поэтому подавление дефосфорилирования в присутствии метронидазола вероятнее всего происходит в результате окисления исследуемым веществом  $\alpha$ -ГУР ГФ до того как они успеют фрагментировать.

Полученные данные позволяют заключить, что метронидазол является наиболее перспективным ингибитором фрагментации  $\alpha$ -ГУР ГФЛ среди исследованных производных имидазола и может регулировать об-

разование ФК при  $\gamma$ -облучении раковых клеток, что важно для создания оптимальных условий при радиотерапии опухолей.

### Литература

1. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. – Oxford: University Press, 2007. – 851 p.
2. Formation of phosphatidic acid, ceramide, and diglyceride on radiolysis of lipids: identification by MALDI-TOF mass spectrometry / O.I. Shadyro [et al.] // Free Rad. Biol. Med. – 2004. – Vol. 36, № 12. – P. 1612-1624.
3. Wardman P. Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy / P.Wardman // Clinical Oncology – 2007. - Vol. 19, № 6. – P. 397-417.
4. Бринкевич С.Д. Влияние кофермента Q0, аскорбиновой кислоты и ее гликозида на радиационно-индуцированное дефосфорилирование органических фосфатов в водных растворах / С.Д. Бринкевич, О.И. Шадыро // Химия высоких энергий. – 2009. – Т. 43, № 6. – С. 491-495.
5. Влияние витаминов группы В на радиационно-индуцированные превращения гидроксилсодержащих органических соединений / С.Д. Бринкевич [и др.] // Химия высоких энергий. – 2011. – Т. 45, № 5. – С. 414-419.
6. Freeman G.R. Radiation chemistry of ethanol: A review of data on yields, reaction rate parameters, and spectral properties of transients. Washington: NBS. 1974.
7. Reaction of hydroxyl radicals with alkyl phosphates and the oxidation of phosphatoalkyl radicals by nitro compounds / M.N. Schuchmann [et al.] // Int. J. Radiat. Biol. – 1995.- Vol. 68, № 2. – P. 121-131.

## АНТИТЕЛА, МЕЧЕННЫЕ КОМПЛЕКСОНАТОМ ЕВРОПИЯ, И ФЛУОРИМЕТРИЯ С РАЗРЕШЕНИЕМ ВО ВРЕМЕНИ В ИММУНОАНАЛИЗЕ АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА

Серченя Т.С., Золотарь Н.Ф., Куприенко О.С., Свиридов О.В.

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Иммунофлуориметрический анализ с разрешением во времени основан на применении иммунореагентов, меченных хелатом редкоземельного элемента (лантанида:  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ). Комплексы лантанидов с органическими лигандами характеризуются долгоживущей флуоресценцией с высоким квантовым выходом и большим стоксовым сдвигом. Это позволяет обеспечить высокую чувствительность анализа путем флуориметрии с отложенной во времени основного сигнала, когда фоновая короткоживущая флуоресценция практически отсутствует. Благодаря этим уникальным флуоресцентным свойствам лантанидных комплексов, иммуноанализ на их основе находит широкое применение в биохимических исследованиях и клинико-диагностической практике. Одним из признанных ранних показателей поражения сосудистой системы человека является наличие микроколичеств альбумина в моче [1,2]. Цель данной работы состояла в получении меченных комплексонатом европия поликлональных антител к альбумину человека и установлении характеристик синтезированных конъюгатов в лантанидном иммунофлуориметрическом анализе.

Для синтеза конъюгатов антител применяли  $\text{Eu}^{3+}$ -комплексонаты  $\text{N}^1$ -[2-(*n*-сукцинимидилкарбокси)бензоиламино)этиламида] и  $\text{N}^1$ -[6-(*n*-сукцинимидилкарбокси)бензоиламино)гексиламида] диэтилтриаминпентауксусной кислоты (реагенты 1 и 2, соответственно), полученные как описано ранее [3]. Эти реагенты различаются длиной алифатического участка  $\text{C}_2$  и  $\text{C}_6$ , соединяющего две функционально значимые части, а именно комплексонат, определяющий уровень флуоресцентного сигнала, и *N*-сукцинимидный эфир, активный в отношении аминокрупп белка и определяющий образование устойчивой амидной связи. Для конъюгирования использовали поликлональные антитела (Ат) к альбумину человека, которые были получены и охарактеризованы ранее [4] и являются одним из специфических реагентов в составе конъюгата с пероксидазой хрена в разработанном наборе «ИФА-Микроальбумин» для определения микроколичеств альбумина в моче методом иммуноферментного анализа. Схема синтеза конъюгатов Ат с комплексонатом  $\text{Eu}^{3+}$  представлена на

рисунке 1А. Очистку полученных конъюгатов осуществляли методом гель-фильтрации на колонке с Superose-12 в установке для быстрой жидкостной хроматографии белков (FPLC). Из профиля хроматографии видно (рисунок 1Б), что происходит эффективное отделение конъюгата Ат-лантанидохелат (пик 1) от несвязавшегося комплексоната (пик 2).

В спектрах поглощения полученных конъюгатов Ат-лантанидохелат отсутствует выраженный пик при 280 нм в отличие от спектра немодифицированного Ат, что обусловлено включением в белок в составе комплексоната  $\text{Eu}^{3+}$  остатка п-фталевой кислоты, характеризующейся поглощением в области 240-260 нм (рисунок 1В).

Удельное содержание  $\text{Eu}^{3+}$  в составе синтезированных конъюгатов определяли с использованием калибровочных растворов с точными концентрациями  $\text{Eu}^{3+}$  в диапазоне 0,01–2 нМ и рассчитывали степень мечення лантанидохелатом как мольное соотношение  $\text{Eu}^{3+}/\text{Ат}$ . Для конъюгатов № 1 и № 2 эти соотношения оказались очень близкими и составили соответственно 9,7 и 10,9 (таблица).

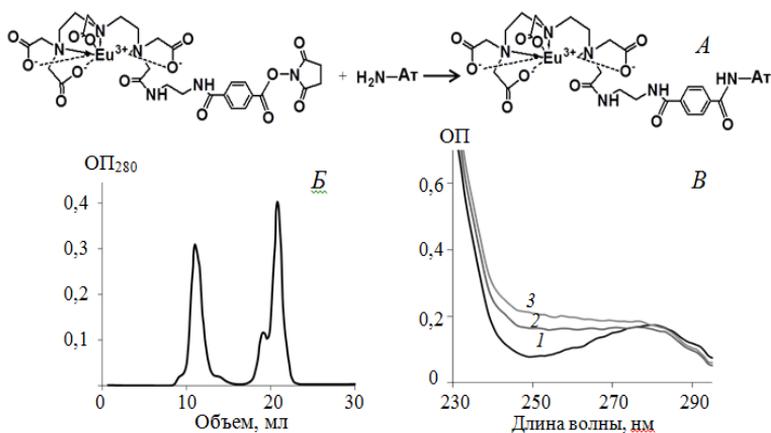


Рисунок – Получение конъюгатов антител с комплексонатом  $\text{Eu}^{3+}$ .  
 А – Схема синтеза, Б – Профиль хроматографии на Superose-12,  
 В – Спектры поглощения Ат (1) и конъюгатов №1 (2) и №2 (3).

С целью возможного практического применения синтезированных конъюгатов исследована их флуоресцентная активность и иммунохимические свойства. В соответствующей тест-системе в качестве базовых компонентов применяли иммуносорбент с иммобилизованным альбумином человека и калибровочные пробы с точным содержанием альбумина в диапазоне 0, 0,2–300 мг/л ( $B_0, B_1-B_7$ ). Принцип анализа основан на кон-

курентном распределении меченых Ат между альбумином, иммобилизованным в лунках микропланшета, и альбумином в растворах калибровочных проб. Связавшийся с твердой фазой конъюгат Ат-лантанидохелат выявляли путем внесения раствора, который обеспечивает диссоциацию комплексогена и усиленную флуоресценцию высвободившегося  $\text{Eu}^{3+}$ . Измерение флуоресценции проводили при возбуждении 320 нм и регистрации сигнала при 615 нм с временем задержки 0,4 мс с помощью микропланшетного флуориметра DELFIA 1234 Wallac Oy (Финляндия). Оценивали связывание синтезированных конъюгатов с твердофазным альбумином в отсутствие антигена в растворе и рассчитывали ингибирование этого взаимодействия в присутствии альбумина в концентрациях 0,2 мг/л ( $B_1$ ) и 300 мг/л ( $B_7$ ). Полученные результаты представлены в таблице.

Таблица – Иммунофлуориметрические характеристики конъюгатов

Конъюгат Ат- $\text{Eu}^{3+}$	Степень мечения, моль $\text{Eu}^{3+}$ / моль Ат	Связывание в пробе $B_0$ , отн. ед. флуоресценции	Ингибирование связывания, %	
			$B_1/B_0$	$B_7/B_0$
№ 1	9,7	615 000	88,3	4,7
№ 2	10,9	602 000	89,1	5,7

Установлено, что оба синтезированных конъюгата сохраняют иммунохимические свойства исходных Ат и характеризуются высокой удельной флуоресцентной активностью. Таким образом, полученные конъюгаты поликлональных антител к альбумину человека с комплексоном европия могут найти применение в качестве компонента новой диагностической тест-системы для определения микроколичеств альбумина в моче человека.

### Литература

1. Mancía, G. [et al] // Eur. Heart. J. 2013. V. 34, N 28. P. 2108-2109.
2. Кобалава, Ж.Д. [и др] // Российский кардиологический журнал. 2013. Т. 102, № 4. С. 95-103.
3. Куприенко, О. С. [и др] // Биоорганическая химия. 2015. Т. 41, № 6. С. 675-685.
4. Серченя, Т.С. [и др] // Метаболический синдром: эксперимент, клиника, терапия: материалы Межд. симпозиума, Гродно, 23-25 октября 2013 г. / Ред. П.С. Пронько [и др.]. – Гродно: ГрГМУ, 2013. – С. 234-238.

**СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ  
БИОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫХ МОЛЕКУЛ,  
СОДЕРЖАЩИХ  $\alpha,\beta$ -АМИНОСПИРТОВЫЕ ГРУППИРОВКИ,  
ПРИ ДЕЙСТВИИ АКТИВНЫХ ФОРМ ХЛОРА**

Сладкова А.А.<sup>1,2</sup>, Лисовская А.Г.<sup>1,2</sup>, Едимечева И.П.<sup>2</sup>,  
Семенкова Г.Н.<sup>1</sup>, Шадыро О.И.<sup>1,2</sup>

*БГУ, Минск, Беларусь, [sladkova-an@yandex.ru](mailto:sladkova-an@yandex.ru)  
НИИ ФХП БГУ, Минск, Беларусь, [ag.lisovskaya@gmail.com](mailto:ag.lisovskaya@gmail.com)*

Роль свободнорадикальных процессов в биосистемах может быть как положительной (например, участие в защите организма от патогенов и редокс-регуляции биохимических реакций), так и отрицательной, заключающейся в модификации и деструкции важных биомолекул. Ранее нами показано, что в радиационно-индуцированном повреждении ряда биологически активных соединений в водных растворах наряду с процессами окисления важную роль играют реакции свободно-радикальной фрагментации с участием углерод- и азотцентрированных радикалов. Так, установлено, что при действии  $\gamma$ - и УФ-излучений на водные растворы ряда  $\alpha,\beta$ -аминоспиртов, аминокислот и сфинголипидов происходит C–C-деструкция, которая включает стадию образования азотцентрированных радикалов исходных веществ [1-3]. Еще одним способом генерации азотцентрированных радикалов биомолекул могут служить активные хлорирующие агенты. К активным формам хлора (АФХ) относят хлорноватистую кислоту (НОСl), которая образуется в организме в результате двухэлектронного окисления хлорида, катализируемого ферментом миелопероксидазой. Известно, что НОСl, взаимодействуя с аминогруппами различных соединений, способна образовывать хлорамины, которые неустойчивы и распадаются с образованием N-центрированных радикалов [4]. В то же время данные о реализации свободнорадикальных превращений биомолекул, опосредованных генерацией АФХ, которые приводят к разрыву углеродного скелета, в литературе описаны мало.

В настоящей работе изучены свободнорадикальные процессы с участием биомолекул, содержащих  $\alpha,\beta$ -аминоспиртовые группировки (лизосфинголипидов, треонина и глюкозамина (рисунок 1)) при действии на них эффективного хлорирующего реагента НОСl в водных растворах.

Показано, что при действии НОСl на водные растворы треонина в качестве основного карбонильного продукта образуется ацетальдегид –

результат деструкции аминокислоты с элиминированием боковой цепи. С увеличением концентрации  $\text{HOCl}$  возрастает количество образовавшегося за определенное время реакции ацетальдегида. Концентрация продукта С–С-деструкции увеличивается также с возрастанием времени воздействия хлорноватистой кислоты.

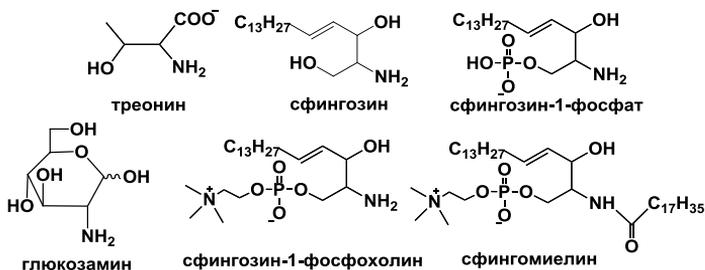
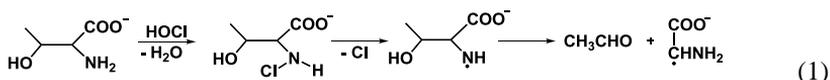
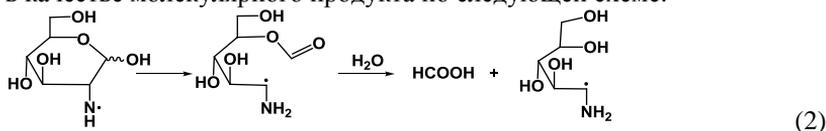


Рисунок 1 – Объекты исследования

Схема предполагаемой реакции включает стадии образования неустойчивых хлораминнов, азотцентрированных радикалов треонина и их последующую деструкцию:



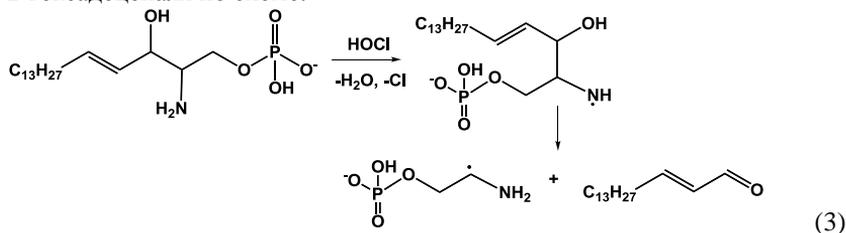
Аналогичный процесс деструкции может обеспечивать разрыв С–С-связи в глюкозамине, а гидролиз образовавшихся углеродцентрированных радикалов приводит к появлению муравьиной кислоты в качестве молекулярного продукта по следующей схеме:



И, действительно, нами показана возможность  $\text{HOCl}$ -индуцированного образования муравьиной кислоты из глюкозамина.

В работе также исследован состав продуктов, образующихся в результате реакции  $\text{HOCl}$  с водными дисперсиями сфинголипидов, такими как сфингозин, сфингозин-1-фосфат, сфингозин-1-фосфохолин и сфингомиелин. Показано, что при добавлении  $\text{HOCl}$  к водным деаэрированным дисперсиям лизосфинголипидов образуются их хлорпроизводные, которые неустойчивы и дальнейшее отщепление атома хлора приводит к образованию азотцентрированных радикалов исходных липидов. Такого

рода радикалы легко распадаются с разрывом С–С связи и образованием 2-гексадеценаля по схеме:



Анализ конечных продуктов взаимодействия HOCl с деазиривованными водными дисперсиями сфингомиелина показал наличие хлораминов липида, между тем 2-гексадеценаль не был обнаружен.

Проведены исследования реализации процессов деструкции лизосфинголипидов в присутствии фермента миелопероксидазы при соблюдении условий, в которых этот фермент функционирует по галогенирующему циклу и катализирует образование HOCl. Установлено, что HOCl, генерируемая в галогенирующем цикле миелопероксидазы, приводит к разрушению лизосфинголипидов с образованием 2-гексадеценаля. Рассмотренные экспериментальные данные позволили заключить, что хлорноватистая кислота, продуцируемая в галогенирующем цикле миелопероксидазы, способна индуцировать свободнорадикальную С–С-деструкцию лизосфинголипидов.

Таким образом, в работе установлена возможность реализации нового пути свободнорадикальной С–С-деструкции биомолекул, в структуру которых входят  $\alpha,\beta$ -аминоспиртовые группировки, при действии на них активных форм хлора.

Выполнено при поддержке БРФФИ (договор № X14M-013).

### Литература

1. Radiation-induced destruction of hydroxyl-containing amino acids and dipeptides / Sladkova A.A. [et al.] // Radiat. Phys. Chem. 2012. – Vol. 81, – № 12. – P. 1896-1903.
2. A new mechanism for photo- and radiation-induced decomposition of sphingolipids / Lisovskaya A.G. [et al.] // Lipids. 2011. – Vol. 46. – P. 271-276.
3. Destruction of amino alcohols and their derivatives on radiolysis and photolysis in aqueous solutions / Sladkova A.A. [et al.] // Rad. Phys. Chem. 2014. – V. 96. – P. 229-237.

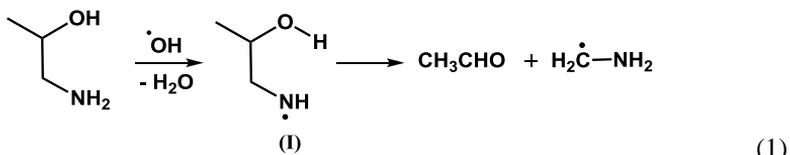
4. Hawkins, C.L. Reaction of HOCl with amino acids and peptides: EPR evidence for rapid rearrangement and fragmentation reactions of nitrogen-centred radicals / C.L. Hawkins, M. J. Davies // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. 1998. – Vol. 998. – P. 1937–1945.

**ВЛИЯНИЕ РЯДА ПРОИЗВОДНЫХ КУМАРИНА,  
БЕНЗОЙНОЙ И КОРИЧНОЙ КИСЛОТ  
НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНУЮ ДЕСТРУКЦИЮ  
1-АМИНО-2-ПРОПАНОЛА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ**

**Сладкова А.А., Лойко В.О., Трушко В.А., Шадыро О.И.**

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,  
sladkova-an@yandex.ru*

Различные свободнорадикальные процессы играют важную роль при функционировании биосистем. В связи с этим представляет интерес установление механизмов гомолитических превращений биологически важных молекул, которые могут протекать в норме и при патологии, и способов регулирования таких превращений. Аминогруппа входит в состав многих биомолекул. Ранее нами было установлено, что  $\alpha,\beta$ -аминоспиртовый фрагмент таких биологически важных соединений, как гидроксилсодержащие аминокислоты, пептиды, сфинголипиды, аминоксахара предопределяет их способность подвергаться свободнорадикальной деструкции с разрывом углеродного скелета при действии различных инициаторов ( $\gamma$ -радиации, УФ-света, активных форм хлора) на исходные вещества. Ключевой стадией данного процесса является образование и последующий распад с разрушением углеродного скелета азот-центрированных радикалов аминокислотсодержащих биомолекул [1–3]. Удобной моделью для изучения гомолитических процессов C–C-деструкции биомолекул, содержащих  $\alpha,\beta$ -аминоспиртовый фрагмент, являются водные растворы аминокислот. В частности, при  $\gamma$ -облучении растворов 1-амино-2-пропанола – аналога треонина и содержащих остаток этой аминокислоты пептидов – генерируются OH-радикалы, способные индуцировать протекание реакций в соответствии со следующей схемой:



Процесс (1) деструкции углеродного скелета аминок спирта преимущественно реализуется в щелочных растворах, в которых аминогруппа 1-амино-2-пропанола не протонирована и свободна для атаки электрофильного ОН-радикала. Присутствие кислорода в растворах слабо влияет на вероятность данного процесса, поскольку азотцентрированные радикалы сами являются окислителями. В то же время наличие веществ, обладающих восстановительными свойствами, может приводить к уменьшению количества радикалов (I) в системе.

В настоящей работе исследованы закономерности образования конечных продуктов радиолитического деаэрированных щелочных и нейтральных водных растворов 1-амино-2-пропанола в отсутствие и в присутствии ряда природных фенольных соединений – кумаринов, производных бензойной и коричной кислот (рис. 1).

Гидроксibenзойные и гидроксикоричные кислоты широко представлены в растениях, поэтому являются важным компонентом питания животных и человека. Они обладают выраженным антиоксидантным действием и во многих окислительных системах по своей активности превосходят токоферолы и убихиноны [4]. Эскулетин и фраксетин можно отнести к производным гидроксикоричных кислот. К настоящему времени известно, что они могут обладать различной биологической активностью, в том числе гепато- и нейропротекторной [5].

Основным молекулярным продуктом деструкции азотцентрированных радикалов 1-амино-2-пропанола по схеме (1) является ацетальдегид, по величине радиационно-химического выхода которого можно судить о реализации данного процесса в различных условиях. В настоящей работе установлено влияние исследуемых соединений (рис. 1) ( $c=10^{-3}$  моль/л) на радиационно-химические выходы данного альдегида.

Показано, что в присутствии большинства добавок выходы ацетальдегида снижались в 4 ÷ 5 раза. Исключение составляют кумарин (I), бензойная (VIII) и коричная кислоты (IV), которые не содержат в своем составе фенольной группы. Эти добавки почти не изменяли либо незначительно снижали выход ацетальдегида в сравнении с системой без добавок. Кроме ацетальдегида были определены другие карбонильные продукты радиационно-индуцированного превращения 1-амино-2-пропанола (2-гидроксипропионовый альдегид, формальдегид, пропионовый альде-

гид и ацетон), к образованию которых могут приводить нескольких многостадийных процессов с участием как азот-, так и углеродцентрированных радикалов аминспирта, поэтому корреляция выходов этих продуктов с присутствием добавки менее выражена. Также были рассчитаны выходы разложения исследуемых добавок.

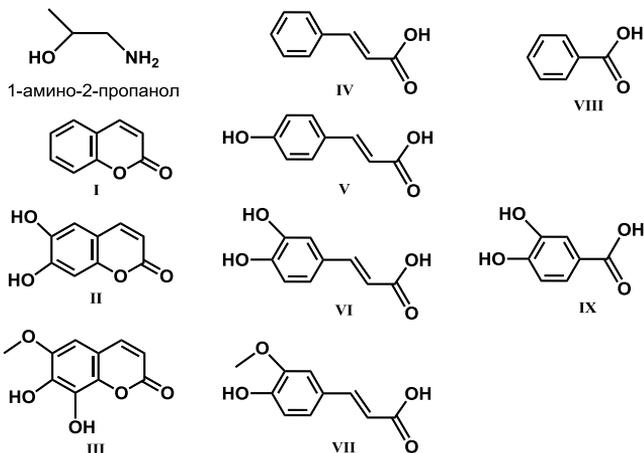


Рисунок 1 – Объекты исследования

(I – кумарин; II – эскулетин; III – фраксетин; IV – коричная кислота; V – кумаровая кислота; VI – кофейная кислота; VII – ферулловая кислота; VIII – бензойная кислота; IX – протокатеховая кислота)

Полученные данные указывают на способность производных кумарина, бензойной и коричной кислот, содержащих одну или две гидроксильные группы в бензольном кольце, блокировать деструкцию азотцентрированных радикалов 1-амино-2-пропанола. Фраксетин и протокатеховая кислота в наибольшей степени ингибировали образование продукта C–C-деструкции аминспирта.

Совокупность экспериментальных данных позволяет рассматривать фенольные производные кумарина, бензойной и коричной кислот как перспективный класс соединений для поиска ингибиторов деструкции углеродного скелета биомолекул, содержащих  $\alpha,\beta$ -аминоспиртовый фрагмент.

## Литература

1. Radiation-induced destruction of hydroxyl-containing amino acids and dipeptides / Sladkova A.A. [et al.] // Radiat. Phys. Chem. – 2012. – Vol. 81, № 12. – P. 1896–1903.
2. A new mechanism for photo- and radiation-induced decomposition of sphingolipids / Lisovskaya A.G. [et al.] // Lipids. – 2011. – Vol. 46. – P. 271–276.
3. Free radical destruction of amine-containing biomolecules / Sladkova A.A. [et al.] // The FEBS Journal. – 2014. – V. 281 (Suppl. 1. – Abstracts: CSIV-04 – Modelling biological processes. – P. 624–625.
4. Antioxidant activity of polyphenolics in diets: Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen / Kono Y. [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1997. – Vol. 1335. – P. 335–342.
5. Radiation-chemical transformations of coumarins in ethanolic solutions / Samovich S.N. [et al.] // Rad. Phys. Chem. – 2014. – Vol. 100. – P. 13–22.

### СПЕКТРОСКОПИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГИДРОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ БИОМОЛЕКУЛ

Толсторожев Г.Б.<sup>1</sup>, Бельков М.В.<sup>1</sup>, Шадыро О.И.<sup>2</sup>,  
Майер Г.В.<sup>3</sup>, Артюхов В.Я.<sup>3</sup>, Базыль О.К.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup> *Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

<sup>3</sup> *Томский государственный университет, Томск, Россия*

Системное исследование оптико-физических характеристик и квантово-химический анализ электронного строения биологически активных органических соединений относится в настоящее время к актуальным проблемам молекулярной биофизики и биофотоники.

К фармакологически активным гидроксилсодержащим органическим соединениям относятся аминифенолы (АФ), у которых к бензольному кольцу присоединены гидроксильные группы и аминогруппы с различными функциональными фрагментами [1].

Установление особенностей электронной структуры и спектроскопических свойств аминифенолов представляется важным и актуальным в

плане выяснения детальных механизмов влияния этих соединений на свободнорадикальные биохимические процессы в живых организмах и, главное, для создания реальных условий их практического использования в медицине в качестве лекарственных препаратов.

Тип заместителя (фенил-, карбонил-, сульфон- производные) определяет направленность (анти-герпес, анти-грипп, анти-ВИЧ) и эффективность антивирусной активности аминифенолов.

В настоящее время достаточно актуальным является также вопрос, как обеспечить при введении гидроксилсодержащих соединений в инфицированные биологические системы формирование антивирусного эффекта без повреждения функционирования самих клеток.

Особое место здесь занимают оптико-физические подходы, которые могут способствовать получению наиболее адекватной информации о структуре биологически активных соединений и достижению наиболее оптимального фармакотерапевтического эффекта.

Комплексное использование спектрально-люминесцентных и ИК спектроскопических экспериментальных методов, а также теоретических квантово-химических расчетов позволяет существенно расширить и углубить представления о тех физико-химических свойствах молекул, которые формируют устойчивый антивирусный эффект, дают возможность выявлять конкретные особенности и закономерности в проявлении гидроксилсодержащими ароматическими соединениями эффективного фармакологического действия.

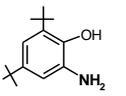
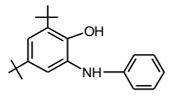
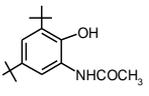
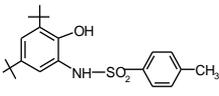
При этом главная задача проводимых исследований гидроксилсодержащих биомолекул состоит в установлении взаимосвязи «электронная структура – спектроскопические свойства – фармакологическая функция».

Проведение экспериментальных и теоретических исследований по выявлению спектроскопических признаков, которые определяют фармакологическую эффективность биомолекул, оказывается возможным, поскольку заранее имеется информация о фармакологической активности биомолекул из биохимических экспериментов на культурах клеток, это отмечено в [1].

В данной работе экспериментально выявляются эмпирические корреляции между люминесцентными свойствами, ИК Фурье спектрами, фармакологическим действием гидроксилсодержащих соединений. С использованием теоретических квантово-химических расчетов устанавливаются структурные конфигурации биомолекул с разными типами водородных связей.

Были изучены незамещенные молекулы аминифенола, а также фенил-, карбонил-, сульфон- замещенные аминифенолы. Предварительные биохимические эксперименты показали, что фенил- производные активны против вируса герпеса, карбонил- производные – против гриппа А, сульфон- замещенные – против ВИЧ инфекции. В таблице 1 представлены структурные формулы основных объектов исследования: 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенол (АФ I), 2-гидрокси-3,5-ди-трет-бутил-N-фениланилин (АФ II), 3,5-ди-трет-бутил-2-гидрокси-N-фенил-ацетамид (АФ III), 3,5-ди-трет-бутил-2-гидрокси-N-метан-сульфонамид (АФ IV).

Таблица 1

			
АФ I	АФ II	АФ III	АФ IV

Для выявления спектральных особенностей биологически активных АФ исследовали электронные спектры поглощения и флуоресценции, квантовые выходы и длительности свечения, а квантово-химические расчеты электронного строения АФ проводили методом частичного пренебрежения дифференциальным перекрыванием с оригинальной спектроскопической параметризацией [1].

Результаты. Синтезированы новые типы молекул из класса аминифенолов, которые проявляют высокую эффективность в подавлении вирусов герпеса, гриппа, ВИЧ-инфекции и ряда других заболеваний.

Разработаны аналитические оптико-физические технологии анализа электронной структуры молекул аминифенолов для диагностики эффективности фармакологических препаратов в медицинских применениях.

Выявлены эмпирические корреляции между электронной структурой, люминесцентными свойствами, ИК Фурье спектрами и фармакологическим действием биологически активных аминифенолов.

Экспериментально установлены конкретные спектроскопические признаки фармакологической эффективности изучаемых соединений. Так, образование в аминифенолах внутримолекулярных водородных связей сопровождается повышением их антивирусной активности.

В ряду фармакологически активных молекул фенил-, карбонил-, и сульфон- производных аминифенола образуются внутримолекулярные водородные связи типа O–H...N, O–H...O=C и O–H...O=S.

Квантово-химические расчеты электронной структуры биомолекул показали, что имеет место прямая взаимосвязь между образованием внутримолекулярных водородных связей и ростом электронной плотности (-) на атомах кислорода гидроксильной группы.

Продемонстрирована высокая информативность, надежность и достоверность системного спектроскопического анализа и квантово-химических расчетов биомолекул для тестирования и прогнозирования фармакологической эффективности новых гидроксилсодержащих лекарственных препаратов класса аминифенолов для практических применений в биомедицине.

### Литература

1. Толсторожев Г. Б. Спектроскопические свойства фармакологически активных фенолов / Г. Б. Толсторожев [и др.] // Оптика и спектроскопия. – 2012. – Т. 112, № 5. – С. 783-790.

## СИНТЕЗ И *IN SILICO* МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПРЕГНЕНОЛОНА С ЦИТОХРОМАМИ P450 CYP17A1 И CYP11A1

**Фалетров Я.В.<sup>1,2</sup>, Панада Я.В.<sup>2</sup>, Завадская О.А.<sup>1</sup>, Хорецкий М.С.<sup>2</sup>, Фролова Н.С.<sup>1</sup>, Рудая Е.В.<sup>1,2</sup>, Шкуматов В.М.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*НИИ Физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь,*  
<sup>2</sup>*Химический факультет БГУ, Минск, Беларусь*

Цитохром P450 CYP17A1 является ключевым ферментом биосинтеза 17 $\alpha$ -гидроксистероидов и андрогенов посредством реакций 17-гидроксилирования и расщепления связи C17-C20 прегненолона, соответственно. Ингибиторы CYP17A1 (абиратерон и аналоги) зарекомендовали себя как лекарства для терапии резистентного рака предстательной железы. В других случаях нарушение стероидогенеза на данном уровне ведет к нежелательным эффектам. Цитохром P450 CYP11A1 является белком, катализирующим первую стадию стероидогенеза – превращение холестерина в прегненолон. Ингибирование CYP11A1 рассматривается в основном как побочное действие лекарств, кроме фармакотерапии некоторых типов врожденной гиперплазии надпочечников [1].

Азидо- и алкиновые производные стероидов активно используются в настоящее время для исследования процессов транспорта и превраще-

ния стероидов в связи с развитием методов «клик-химии», позволяющей селективно модифицировать данные производные флуоресцирующими группами. По описанным в литературе методикам нами получены стероиды 16 $\beta$ -азидо-17 $\alpha$ -гидрокси-прегн-5-ен-3 $\beta$ -ол-20-он (16-АГП5) [2] и 20 $\alpha$ / $\beta$ -(пропаргиламино)-прегн-5-ен-3 $\beta$ -ол-20-он (20ПАП5) [3] с выходами ~50 %. Молекулярные массы синтезированных соединений подтверждены методами масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS) и электронным ударом (EI-MS): 20ПАП5: ESI-MS:  $m/z$  356 [M+H]<sup>+</sup>, IE-MS:  $m/z$  355 (M<sup>+</sup>, 6 %), 340 ([M-15]<sup>+</sup>, 50 %), 314 (40 %); 16-АГП5: ESI-MS:  $m/z$  389,2 [M+NH<sub>2</sub>OH-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, IE-MS:  $m/z$  345 [M-N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 327 [M-N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. Эти соединения можно рассматривать как структурные аналоги прегненолона, поэтому для начальной оценки их биологических свойств было решено оценить их способность связываться в активных центрах CYP11A1 и CYP17A1 методами *in silico*. Данные о таких взаимодействиях, согласно нашим данным, в литературе не описаны.

Моделирование при помощи программ Autodock 4.2 [4] и Autodock Vina показало, что 16-АГП5 и 20 $\beta$ H-изомер 20-ПАП5 способны эффективно связываться вблизи гема CYP17A1 (расчетные величины энергий связывания составили -8,9 [2] и -9,8 ккал/моль, соответственно). Геометрические параметры локализации данных стероидов подразумевает также возможность 17 $\alpha$ -гидроксилирования 16-АГП5 и окисления по N20 20-ПАП5 (рисунки 1 и 2, соответственно). Важно отметить, что в последнем случае возможно формирование пропиоальдегида – активного электрофила, потенциально способного ковалентно модифицировать N-атоми гема или аминокислот активного центра CYP17. Более того, моделирование взаимодействия обоих изомеров 20-ПАП5 с CYP11A1 (код pdb 3MZS) показал аффинное связывание (E<sub>св</sub> -(11-12) ккал/моль) в положении, стерически не позволяющем окисление N20.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности экспериментальных исследований 16-АГП5 и 20-ПАП5 в качестве субстрата и ингибитора CYP17A1.

Работа выполнена при финансовой поддержке задания ГПНИ «Химические технологии и материалы».

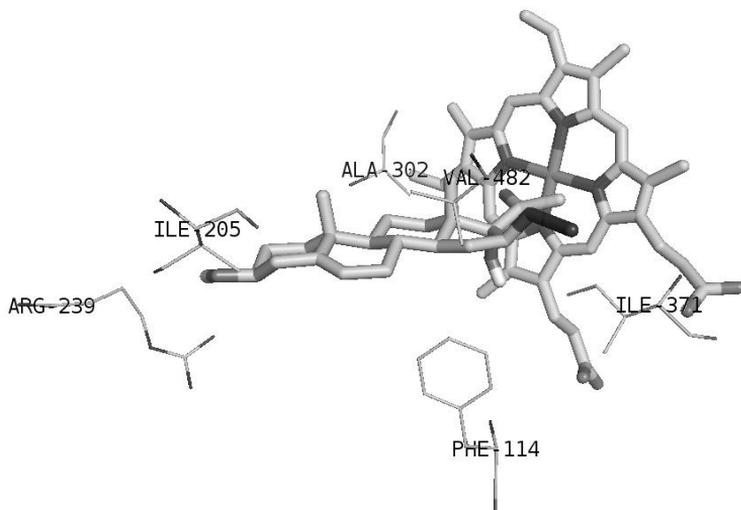


Рисунок 1. Модель локализации 16-АП15 (показан жирными линиями) вблизи гема в активном центре CYP17 (код pdb 3RUK)

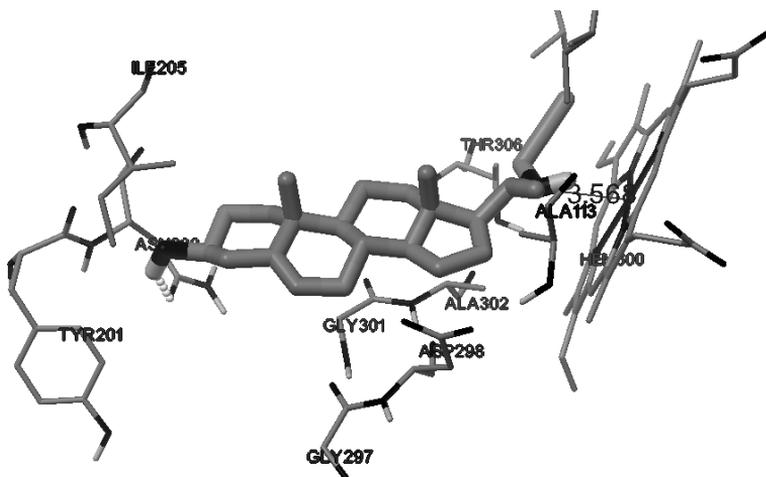


Рисунок 2. Модель локализации 20-ПА15 (показан жирными линиями) вблизи гема в активном центре CYP17 (код pdb 3RUK)

## Литература

1. Новикова, Л.А. От структуры и функции ферментов биосинтеза стероидов к новым генно-инженерным технологиям / Л.А. Новикова, Я.В. Фалетров, И.Е. Ковалева, Ш. Мауерсбергер, В.Н. Лузиков, В.М. Шкуматов // Успехи биол. химии. 2009. Т. 49. С. 159–208.
2. Panada J. U., Faletrov Y. V. Shkumatov V. M. Synthesis and in silico evaluation of 16 $\beta$ -azido pregnenolone analogue as a clickable substrate for steroidconverting enzymes // SDRP J. Computat. Chem. Mol. Model. 2016. Vol.1, № 2. epub ahead to print.
3. Porta E. O. Click chemistry decoration of amino sterols as promising strategy to developed new leishmanicidal drugs // Steroids. 2014. Vol. 79. P. 28-36.
4. Faletrov Y. V., Bialevich K. I., Edimecheva I. P., Kostsin D. G., Rudaya E. V., Slobozhanina E. I., Shkumatov V. M. 22-NBD-cholesterol as a novel fluorescent substrate for cholesterol-converting oxidoreductases // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 2013. Vol. 134. P. 59–66

## СИНТЕЗ И *IN SILICO* ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИПТОФАНА И ПРОЛИНА

**Фалетров Я.В.<sup>1,2</sup>, Рудая Е.В.<sup>1,2</sup>, Клыковская Д.Г.<sup>2</sup>, Пирогова В.В.<sup>2</sup>,  
Завадская О.А.<sup>1</sup>, Хорецкий М.С.<sup>2</sup>, Фролова Н.С.<sup>1</sup>, Шкуматов В.М.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*НИИ Физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь,*

<sup>2</sup>*Химический факультет БГУ, Минск, Беларусь*

Аминокислоты являются эссенциальными участниками множества важных биологических процессов, биологическими предшественниками ряда биорегуляторов и структурными компонентами белков и некоторых других биомолекул. Следовательно, химически-модифицированные аминокислоты обладают потенциалом в качестве «молекулярных инструментов» для регуляции или мониторинга этих процессов. Нами были синтезированы флуоресцирующие 7-нитробензофуразан-4-ильные (NBD) производные L- $\alpha$ -аминокислот (АК) пролина, триптофана, аланина и глутаминовой (NBD-Pro, NBD-Trp, NBD-Ala и NBD-Glu) посредством конъюгации NBD-Cl с растворами данных АК согласно [1] с выходами 50-60 %. Структура данных соединений частично подтверждена их опти-

ческими и масс-спектрометрическими свойствами, представленными в таблице 1.

Таблица 1 – свойства синтезированных производных АК

Соединение	NBD-Trp	NBD-Pro [2]	NBD-Ala	NBD-Glu [2]
$\lambda$ abs, нм* <sup>#</sup>	280, 330, 460	340, 470	340, 470	340, 470
$\lambda$ em, нм	560	550	560	560
$\lambda$ ex, нм	315, 410 <sup>##</sup>	340, 470	340, 470	340, 470
M, а.е.м.	367	278	252	310
m/z ион и их интерпретация	366 [M-H] <sup>-</sup> 733 [2M-H] <sup>-</sup> 368 [M+H] <sup>+</sup>	279 [M+H] <sup>+</sup> 391 [M+tfa-H] <sup>-</sup>	251 [M-H] <sup>-</sup>	309 [M-H] <sup>-</sup>

\*  $\lambda$  abs,  $\lambda$  em и  $\lambda$  ex – длины волн максимумов поглощения, эмиссии и возбуждения флуоресценции этанольных растворов полученных производных, соответственно; M - молекулярная масса; m/z – соотношение масса/заряд; tfa – трифторуксусная кислота, AcN – ацетонитрил. <sup>#</sup> оптические спектры были записаны на спектрофлуориметре Солар СМ 2203 (РБ) при ширинах щелей 5 нм; масс-спектры записаны на Shimadzu LCMS2020 (Япония) в условиях ионизации электрораспылением как описано [3]. <sup>##</sup> может быть обусловлена примесями согласно [4].

Отметим, что в отличие от других исследованных NBD-производных АК, в случае образца полученного NBD-Trp не происходит флуоресценции при облучении УФ светом лампы с максимумом излучения при 365 нм, а также регистрируется расхождение максимумов поглощения и возбуждения флуоресценции при 560 нм (Таблица 1). Слабая флуоресценция NBD-Trp обусловлена близким расположением NBD- и индольного флуорофоров (~0,6 нм) в его структуре [4, 5].

Для биоинформатической *in silico* оценки биологических свойств данных соединений было проведено компьютерное моделирование их взаимодействий с некоторыми белками (докинг), реализующими рецепцию/превращение АК-предшественников или их метаболитов, как описано в работе [4]. В частности, в качестве белков-мишеней были выбраны индоламин 2,3-диоксигеназа человека (код pdb 5ETW), осуществляющая катаболизм Trp и ответственная за регуляцию функций иммунной системы [7] и пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназа дрожжей (код pdb 4OE4), осуществляющая катаболизм Pro и обуславливающая вирулентность опасного патогена грибкового *Cryptococcus neoformans* [8].

Показано, что индольный фрагмент NBD-Trp способен локализоваться вблизи гема 5ETW (рисунок 1).

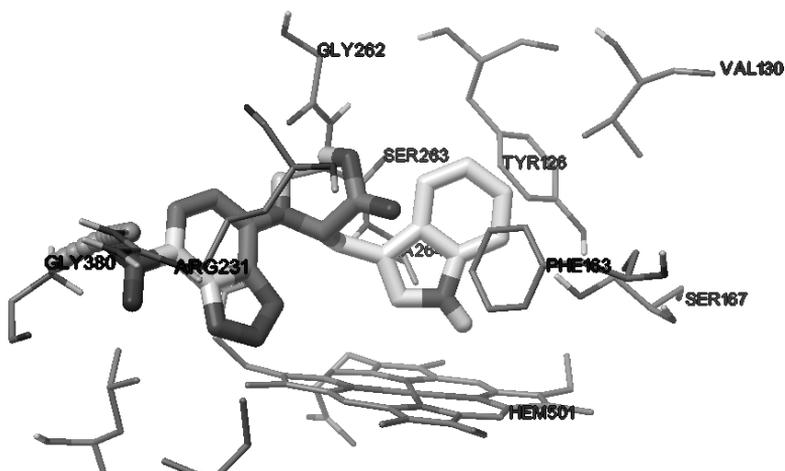


Рисунок 1. Модель субстратоподобной локализации NBD-Trp (показан жирными линиями) в активном центре индоламин 2,3-диоксигеназы

Расчетные величины энергий связывания ( $E_{св}$ ) для NBD-Trp и Trp составили -8,90 и -5,85 ккал/моль, соответственно, что указывает на возможность эффективной конкуренции между NBD-Trp с данным природным субстратом за взаимодействие с данным ферментом. Разрушение индольного фрагмента будет способствовать увеличению квантового выхода флуоресценции [4]. Аналогично,  $E_{св}$  для NBD-Pro, NBD-Glu и Pro (предшественника природного субстрата) в активном центре 4OE4 составили -7,01, -5,96 и -5,93 ккал/моль, соответственно. NBD-Ala проявлял меньшую аффинность (большие  $E_{св}$ ) к активным центрам этих ферментов. При инкубации NBD-Pro с клетками дрожжей *Yarrowia lipolytica*, культивируемых на богатой питательной среде, наблюдалось уменьшение концентрации данного соединения на 40 % в течение 24 ч инкубации при начальной концентрации 20 мкМ, что свидетельствует о возможности его утилизации клетками дрожжей.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности экспериментальных исследований данных NBD производных в качестве флуоресцирующих субстратов ферментов метаболизма АК.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант X15ИНД 003) и задания ГПНИ «Химические технологии и материалы».

## Литература

1. Kuru E. et al. Synthesis of fluorescent D-amino acids and their use for probing peptidoglycan synthesis and bacterial growth *in situ* // Nature Protocols. – 2015. – Vol. 10. – P. 33–52.
2. Фалетров Я. В., Хорецкий М. С., Завадская О. А., Рати Б., Фролова Н. С., Рудая Е. В., Шкуматов В. М. Синтез флуоресцентно-меченых аминокислот – потенциальных антималярийных агентов // Вестник БГУ. –2016. (в печати).
3. Faletrov Y. V., Bialevich K. I., Edimecheva I. P., Kostsin D. G., Rudaya E. V., Slobozhanina E. I., Shkumatov V. M. 22-NBD-cholesterol as a novel fluorescent substrate for cholesterol-converting oxidoreductases // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. – 2013. – Vol. 134. – P. 59–66.
4. Watanabe N., Toyo'oka T., Imai K. HPLC electrochemical fluorometric detection of amino acids including tryptophan using 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-оха-1,3-diazole // Biomed Chromatogr. – 1987. – Vol. 2. – P. 99-103.
5. Albani J.R. New insights in the interpretation of tryptophan fluorescence : origin of the fluorescence lifetime and characterization of a new fluorescence parameter in proteins: the emission to excitation ratio // J Fluoresc. 2007. – Vol. 17. – P. 406-417.
6. Mbongue J.C. *et al.* The Role of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Immune Suppression and Autoimmunity // Vaccines (Basel). – 2015. – Vol. 3. – P. 703–729.
7. Lee I. R. *et al.* Reactive oxygen species homeostasis and virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* requires an intact proline catabolism pathway // Genetics. – 2013. – Vol. 194. – P. 421–433.

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ГИСТИДИН-СОДЕРЖАЩИХ ДИПЕПТИДОВ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

Юркова И.Л., Шендикова Е.Н.

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,  
yurkovail@bsu.by*

Активные формы кислорода (АФК) ( $\text{HO}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HClO}$ ) в биосистемах играют ключевую роль в развитии многих патологических процессов, а также в сигнальной трансдукции. АФК идентифицируют

прямым методом (ЭПР) или косвенно с помощью химических зондов, в том числе флуоресцентных. Метод флуоресцентных зондов базируется на том, что взаимодействие АФК с определенными органическими веществами приводит либо к снижению их собственной флуоресценции, либо к образованию флуоресцирующих продуктов [1]. Метод флуоресцентных зондов позволяет не только детектировать АФК в различных системах, но и служит простым инструментом для получения информации об антиоксидантных свойствах различных соединений.

Целью данной работы было исследование антиоксидантных свойств гистидин-содержащих дипептидов (ГСД) (карнозин, Кар;ансерин, Анс;глицил-гистидин, Гли-Гис) и составляющих их аминокислот с помощью терефталевой кислоты (ТФ).

ТФ является специфичным и высокочувствительным детектором радикалов  $\text{HO}^\cdot$  ( $< 0,5$  пикоМ), она не реагирует с другими активными частицами ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). ТФ взаимодействует с  $\text{HO}^\cdot$  ( $k_v = 4,4 \cdot 10^9 \text{M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ) с образованием только одного моно-гидроксилированного изомера, 2-гидрокси-терефталата (2-ГТФ). Данный продукт является стабильным и в отличие от ТФ обладает флуоресценцией ( $\lambda_{\text{воз}} = 315$  нм,  $\lambda_{\text{эм}} = 427$  нм). В соответствии со стехиометрией реакции концентрация радикалов  $\text{HO}^\cdot$  прямо пропорциональна интенсивности флуоресценции 2-ГТФ. Антирадикальные свойства тестируемых веществ оценивали по их способности конкурировать с ТФ за взаимодействие с  $\text{HO}^\cdot$ , что приведет к снижению концентрации 2-ГТФ и, следовательно, уменьшению интенсивности флуоресцентного сигнала. Радикалы  $\text{HO}^\cdot$  генерировали с помощью системы  $\text{Cu}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$ . Изменение интенсивности флуоресценции в присутствии тестируемых соединений в сравнении с контролем (ТФ + компоненты редокс-системы) являлось мерой оценки их антиоксидантных свойств.

Установлено, что флуоресцентный сигнал в системе  $\text{ТФ} - \text{Cu}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$  резко снижается при добавлении Гли-Гис (рис. 1). Данный дипептид уменьшает интенсивность флуоресценции в  $\sim 41$  раз. Эффект Кар и Анс был слабее, флуоресценция в их присутствии снижалась примерно в четыре и пять раз, соответственно. Действие ГСД сравнивали с влиянием  $\text{NaN}_3$ , эффективного акцептора  $\text{HO}^\cdot$ . Азид натрия ослабляет флуоресценцию системы в  $\text{ТФ} - \text{Cu}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$  в  $\sim 7$  раз. Антиоксидантные свойства ГСД могут быть обусловлены как их непосредственным взаимодействием с радикалами  $\text{HO}^\cdot$ , так и способностью влиять на образования активных частиц посредством взаимодействия с ионами металла.

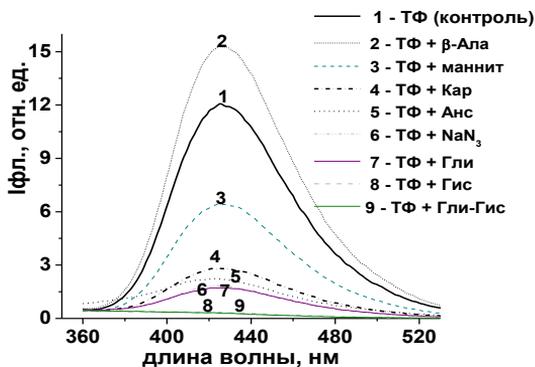
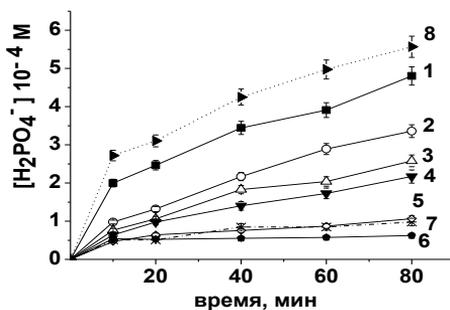


Рисунок 1 – Спектр флуоресценции 2-НО-ТФ, образующегося при действии системы  $\text{Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$  (0,1/1мМ) на 10 мМраствор терефталевой кислоты в присутствии (2 мМ)различных соединений

Из аминокислот глицин и гистидин ослабляют флуоресценцию системы  $\text{ТФ-Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$  в 7 и 34 раза, соответственно.  $\beta$ -Аланинповышаетфлуоресценцию в 1,3 раза, что указывает на его способность усиливать каталитические свойства ионов меди (II). Согласно данным работы [2] комплекс  $\text{Cu}^{2+}/\beta$ -аланин способствует разложению гидропероксида, что будет приводить к увеличению скорости образования радикалов  $\text{HO}^\cdot$ .

Данные, полученные с помощью флуоресцентного зонда, о способности ГСД и аминокислот регулировать уровень радикалов $\text{HO}^\cdot$  в системе  $\text{ТФ-Cu}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$  согласуются с их действием на свободнорадикальную фрагментацию глицеро-1-фосфата (ГФ), индуцированную смесью  $\text{CuSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2\text{-аскорбат}$  (рис. 2).Протекторное действие ГСД на дефосфорилирование ГФ увеличивалось в ряду Кар – Ала – Гли-Гис (в 2,5; 4,3 и 5,8 раз, соответственно).  $\beta$ -Аланин активирует фрагментацию ГФ с разрывом фосфоэфирной связи в  $\sim 1,2$  раза, гистидин уменьшает интенсивность флуоресценции в 5 раз. В соответствии с полученными данными протекторные свойства ГСД обусловлены главным образом остатком гистидина, который оказывал большее ингибирующее действие, чем Кар. Согласно данным работы [3] Кар имеет более низкую константу связывания с катионами  $\text{Cu}^{2+}$  ( $1,1 \text{ M}^{-1}$ , pH 7,84), чемL-гистидин ( $71 \text{ M}^{-1}$ , pH 7,84).



1 – без добавок, в присутствии: 2 – 1 мМ Кар, 3 – 5 мМ Кар, 4 – 10 мМ Кар, 5 – 10 мМ Анс, 6 – 10 мМ Гли-Гис, 7 – 5 мМ Гис, 8 – 5 мМ  $\beta$ -Ала

Рисунок 2 – Влияние ГСД и аминокислот на накопление фосфат-аниона в водном 100 мМ растворе ГФ, инкубированном с  $\text{CuSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ -аскорбат (0,5/10/0,5 мМ) при 37 °С

Так, применение флуоресцентного зонда позволяет получить предварительную оценку анти- и прооксидантных свойств соединений в условиях металл-опосредованного генерирования радикалов  $\text{HO}^\cdot$ .

### Литература

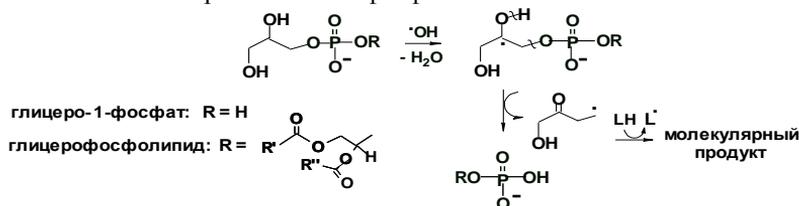
1. Gomes A., Fernandes E., Lima J. L.F.C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2005. – Vol. 65. – P. 45 – 80.
2. Lin T.Y., Wu C.H. Activation of hydrogen peroxide in copper(II)/amino acid/ $\text{H}_2\text{O}_2$  systems: Effects of pH and copper speciation // J. Catalysis – 2005. – Vol. 232, № 1. – P. 117–126.
3. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and Pathophysiology of carnosine // Physiol Rev. – 2013. – Vol.93. – P. 1803–1845.

# ЦИСТЕИН- И ГИСТИДИН-СОДЕРЖАЩИЕ ДИПЕПТИДЫ В РЕГУЛИРОВАНИИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ФОСФОПРОИЗВОДНЫХ ГЛИЦЕРИНА

**Юркова И.Л., Шендикова Е.Н.**

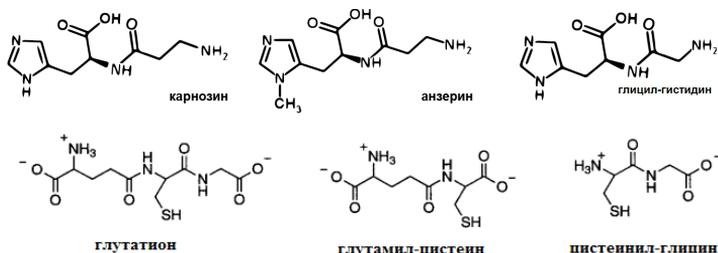
*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,  
yurkovail@bsu.by*

Активные формы кислорода чрезмерно образуются при нарушении в клетках баланса оксиданты/антиоксиданты и могут вызывать деструкцию биомолекул [1]. В результате взаимодействия радикалов HO<sup>•</sup> с биологически активными фосфопроизводными глицерина последние подвергаются свободнорадикальной фрагментации с разрывом фосфоэфирных связей [2]. В частности, фрагментация глицерофосфолипидов протекает в полярной части бислоистой мембраны и приводит к образованию фосфатидной кислоты, фрагментация глицерофосфатов сопровождается накоплением неорганического фосфата:



Для защиты организма от окислительного стресса применяют широкий спектр антиоксидантов (АО), которые могут предотвращать образование свободных радикалов или акцептировать их [1]. К основным классам природных АО наряду с каротиноидами и фенольными соединениями относятся пептиды [1, 3]. В последние десятилетия огромное внимание уделяют изучению биологической активности пептидов, выделенных из натуральных продуктов или полученных путем ферментативного гидролиза и/или микробиологической ферментации пищевых белков [3]. Биоактивные пептиды рассматривают как потенциальные компоненты для разработки эффективных нутрицевтиков, косметических средств и функциональной пищи [3]. Антиоксидантные эффекты биоактивных пептидов интенсивно исследуются, но молекулярные механизмы их действия до конца не ясны [3].

Целью данной работы было изучение влияния гистидин-содержащих ( $\beta$ -аланил-L-гистидин, глицил-гистидин,  $\beta$ -аланил-3-метил-L-гистидин) и цистеин-содержащих ( $\gamma$ -L-глутамил-L-цистеин, цистеинил-глицин,  $\gamma$ -L-глутамил-L-цистеинил-глицин) пептидов на протекание свободнорадикальной фрагментации глицеро-1-фосфата (ГФ) и димиристоилфосфатидилглицерина (ДМФГ).



Свободнорадикальную фрагментацию ГФ оценивали по накоплению фосфат-анионофотоколориметрически, а ДМФГ – по образованию димиристоилфосфатидной кислоты (ДМФК) методом ВЭТСХ. Свободнорадикальные реакции в системах инициировали путем их  $\gamma$ -облучения или термостатирования при 37 °С с системами  $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^{2+})/\text{H}_2\text{O}_2$ /аскорбат, генерирующими радикалы  $\text{HO}^\bullet$ .

Установлено, что в случае  $\text{Fe}^{2+}$ -опосредованной фрагментации ГФ действие как гистидин-, так и цистеин-содержащих дипептидов (ГСД и ЦСП) выражено не однозначно. Из ГСД  $\beta$ -аланил-L-гистидин ингибирует процесс в 1,4 раза, глицил-гистидин – активируют в 3 раза,  $\beta$ -аланил-3-метил-L-гистидин не проявляет значительных про- или антиоксидантных свойств. В этих условиях анти- или прооксидантное действие ЦСП в сравнении с ГСД проявляется в меньшей степени.  $\gamma$ -L-глутамил-L-цистеин слабо ингибирует (в 1,2 раза), а цистеинил-глицин (в 1,2 раза) и L-глутамил-L-цистеинил-глицин (в 1,3 раза) активируют фрагментацию. Результаты по влиянию свободных аминокислот на фрагментацию ГФ указывают на важную роль в анти- и прооксидантном действии ГСД и ЦСП наличия пептидной связи.

Показано, что в случае  $\text{Cu}^{2+}$ -опосредованной фрагментации ГФ все исследованные ГСД и ЦСП ингибируют процесс. Эффект ГСД возрастает в ряду  $\beta$ -аланил-L-гистидин,  $\beta$ -аланил-3-метил-L-гистидин, глицил-гистидин (в 2,5; 4,3; 5,8 раз, соответственно). Протекторные свойства ГСД проявляются при более низких концентрациях, чем в случае ионов железа, и обусловлены главным образом остатком гистидина. Эффект

цистеин-содержащих пептидов возрастает в ряду: Цис-Гли, глутатион, Глу-Цис (в 1,5; 3,4; 3,9 раза, соответственно), его сопоставление с действием свободных аминокислот подтверждает важную роль пептидной связи и структурного дескриптора Глу-Цис в этом.

Выявлено, что в случае радиационно-иницируемой фрагментации ГФ все исследованные ГСД и ЦСД оказывают радиопротекторный эффект в концентрационно-зависимой манере. Влияние ГСД на процесс максимально в деаэрированных средах (в  $\sim 1,7$  раза) и снижается с увеличением концентрации  $O_2$  в системе. ЦСП ингибируют процесс в деаэрированных средах примерно в 2,5 раза, в отличие от ГСД они также оказывали защитное действие и в системах, насыщенных кислородом. Сравнение данных по влиянию пептидов и входящих в их состав свободных аминокислот указывает на важную роль цистеина в радиопротекторном действии ЦСП.

Установлено, что  $\beta$ -аланил-L-гистидин обладает мембранозащитным действием *in vitro*, снижая степень свободнорадикальной деструкции фосфатидилглицерина в полярной части мембраны. При этом дипептид в дозо-зависимой манере ингибирует  $Cu^{2+}$ -индуцированную фрагментацию более эффективно (в 2 раза), чем  $Fe^{2+}$ -опосредованный процесс (в 1,4 раза). Дипептиды Цис-Гли и Глу-Цис подавляют радиационно-иницируемую фрагментацию фосфатидилглицерина в модельных мембранах, снижая выход продукта деструкции в 1,7-1,9 раза.

Так, все исследованные ГСД и ЦСД эффективно подавляют радиационно-иницируемую и  $Cu^{2+}$ -опосредованную фрагментацию, но в присутствии ионов железа могут активировать процесс. Из всех исследованных дипептидов  $\beta$ -аланил-L-гистидин и  $\gamma$ -L-глутамил-L-цистеин являются наиболее универсальными в антиоксидантном действии. Совокупность полученных данных указывает на то, что механизм действия ГСД и ЦСД на свободнорадикальную фрагментацию фосфопроизводных глицерина обусловлен балансом их радикал-акцепторных, восстановительных и комплексообразующих свойств.

### Литература

1. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge Free radicals in biology and medicine – Oxford: University press, 2012. 851 p.
2. I.L. Yurkova Free-radical reactions of glycerolipids and sphingolipids// Russian Chemical Reviews. 2012. V. 81, № 2. P. 175-190.
3. Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals / ed. Y. Mine, E. Li-Chan, B. Jiang. – Wiley-Blackwell, 2010. 436 p.

# МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

## siRNA COMPLEXATION BY CARBOSILANE DENDRON MICELLES

**Apartsin E.<sup>1</sup>, Buyanova M.<sup>1</sup>, Gutiérrez C.<sup>2</sup>, Venyaminova A.<sup>1</sup>,  
F.J. de la Mata<sup>2</sup>, R. Gómez<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,  
Novosibirsk, Russia*

<sup>2</sup>*Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica,  
Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Spain*

Nucleic acid therapy is an emerging field of modern medicine. Therapeutic nucleic acids, in particular, siRNA, are widely studied as prospective drugs for targeted modulation of gene expression. However, the problem of efficient intracellular delivery of siRNA is still a challenge. To overcome it, as well as to protect therapeutic oligonucleotides during the transfection, supramolecular delivery systems (micelles and liposomes) are used.

Amphiphilic dendritic molecules are novel and promising precursors for the supramolecular assemblies. The examples reported [1, 2] evidence high efficiency of siRNA delivery by micelles and liposomes made of dendrons bearing fatty acid residues, with particles being biocompatible and biodegradable.

In this work, siRNA delivery systems based on micelle-forming carbosilane dendrons are designed. First, a series of cationic carbosilane dendrons of generation 1-3 bearing hexanoic (HAGn) and palmitic (PAGn) acid moieties in focal point (fig.1) was synthesized and characterized.

The presence of aliphatic fragment along with cationic groups gives the amphiphilicity to the molecules provoking the association in the micelles in water solutions. The critical micelle concentration (CMC) values in PBS were estimated for HAGn and PAGn dendrons by standard technique using pyrene as a fluorescent marker. The ratio of intensities of the two peaks in the fine structure of fluorescence ( $I_{373}/I_{383}$ ) was measured. The CMC values found are presented in fig 2.

The ability of cationic micelles to bind siRNA was then tested. As a model, pro-apoptotic siRNA Mcl-1 was used. The siRNA was mixed with cationic micelles in different charge ratio, and the samples were analyzed by agarose gel electrophoresis. The free siRNA was visualized by staining with ethidium bromide.

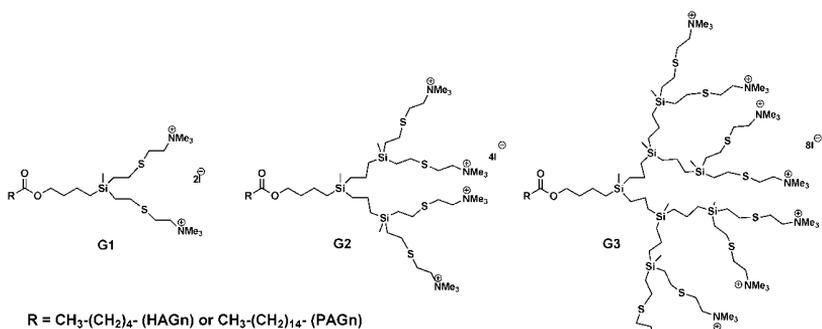


Figure 1 – Structures of pyrene-modified carbosilane dendrons

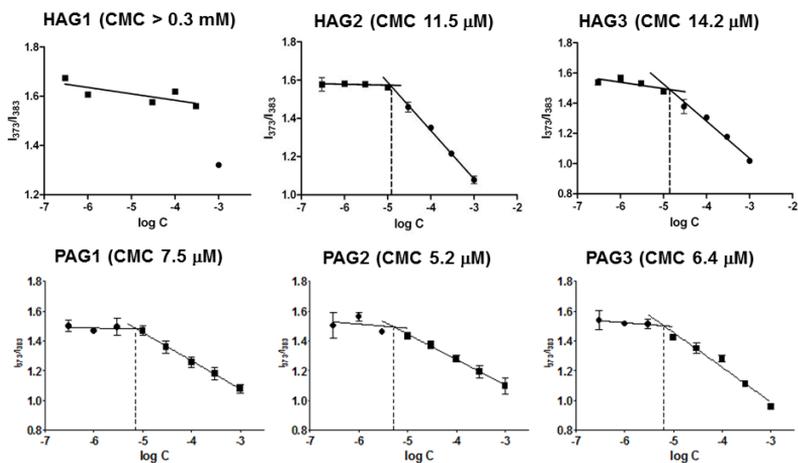


Figure 2 – Estimation of the CMC values of the carbosilane dendrons in PBS

The dendrons have been found to bind siRNA in different manner. Among the samples of HAGn, the positive dendritic effect on the binding ( $G1 << G2 < G3$ ) is clearly identified. The PAGn dendrons do not exhibit large difference in the siRNA binding, the siRNA is bound at charge ratio of 2. These observations correlate with the dynamics of CMC values found and suggest that the siRNA binding by dendrons is the result of micelle formation. Hexanoic acid moieties cannot cause micelle formation as efficiently as palmitic acid moieties, that results both in higher CMC values in the case of HAGn and in the inefficient siRNA binding by HAG1 and HAG2.

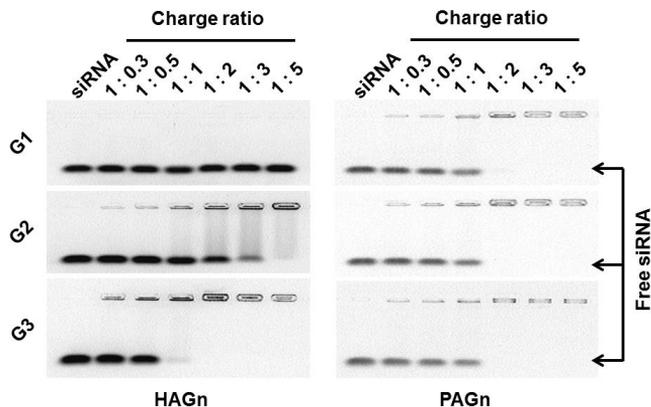


Figure 3 – siRNA binding by carbosilane dendron micelles

The results obtained can serve as a platform for the design of the supra-molecular constructions for the siRNA delivery.

This work was supported by RFBR grant No.16-33-60152\_mol\_a\_dk, by the Scholarship of the President of the Russian Federation (grant No. 882.2016.4) and by Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme Fellowship within the 7th European Community Framework Programme, project No. PIRSES-GA-2012-316730 NANOGENE.

### References

1. Yu T., Liu X., Bolcato-Bellemin A.L., Wang Y., Liu C., Erbacher P., Qu F., Rocchi P., Behr J.P., Peng L. An amphiphilic dendrimer for effective delivery of small interfering RNA and gene silencing in vitro and in vivo // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2012. – V. 51. – N. 34. – P. 8478-8484.
2. Liu X., Zhou J., Yu T., Chen C., Cheng Q., Sengupta K., Huang Y., Li H., Liu C., Wang Y., Posocco P., Wang M., Cui Q., Giorgio S., Fermiglia M., Qu F., Pricl S., Shi Y., Liang Z., Rocchi P., Rossi J.J., Peng L. Adaptive amphiphilic dendrimer-based nanoassemblies as robust and versatile siRNA delivery systems // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2014. – V. 53. – N. 44. – P. 11822-11827.

# CARBON NANOTUBES DECORATED WITH CATIONIC CARBOSILANE DENDRONS AND THEIR HYBRIDS WITH siRNA

**Apartsin E.<sup>1</sup>, Gutiérrez C.<sup>2</sup>, Buyanova M.<sup>1</sup>, Venyaminova A.<sup>1</sup>,  
F.J. de la Mata<sup>2</sup>, R. Gómez<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,  
Novosibirsk, Russia*

<sup>2</sup>*Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica,  
Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Spain*

Carbon nanotubes (CNTs) are extensively used as carriers nucleic acid therapeutics, including small interfering RNA (siRNA) [1]. A versatile approach commonly used to construct hybrids of siRNA with single-walled and multi-walled carbon nanotubes (SWCNTs and MWCNTs) presumes the electrostatic interactions between nucleic acid backbone and cationic groups on the CNT surface. Cationic SWCNTs and MWCNTs can be easily obtained by grafting of amino-bearing compounds to CNT surface. The use of dendritic compounds to functionalize CNTs is highly promising due to the increase of the surface charge that leads to more efficient siRNA binding and better biocompatibility of hybrid constructions [2]. Due to their structure and properties, carbosilane dendrimers are prospective carriers for siRNA [3, 4]. In this work, multicomponent hybrid nanoparticles for siRNA delivery built of CNTs and carbosilane dendritic molecules were designed.

A series of cationic carbosilane dendrons of generations 1 to 3 bearing pyrene residues in focal point (fig. 1) has been synthesized and characterized. Pyrene is known as a good anchor group to immobilize macromolecules on the CNT surface. Meanwhile, cationic groups of dendrons can bind siRNA in the complex with nanoparticles.

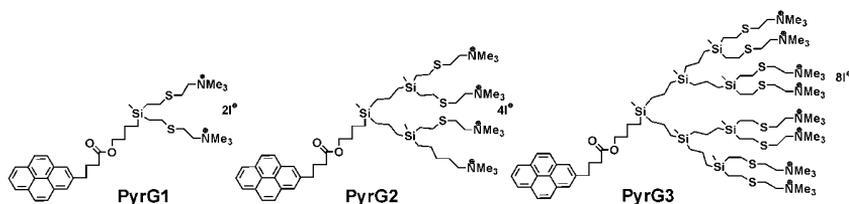


Figure 1 – Structures of pyrene-modified carbosilane dendrons

Cationic SWCNTs and MWCNTs have been obtained by grafting of diamines to the carboxy-modified CNTs as described in [5, 6]. Amino-modified CNTs were non-covalently functionalized with pyrene-modified cationic carbosilane dendrons (fig. 2). To quantify the affinity of dendrons to CNTs and to estimate the density of functionalization, the isotherms of adsorption were plotted. The quantity of dendron adsorbed was calculated from the data on pyrene fluorescence quenching upon its adsorption onto the CNTs [6].

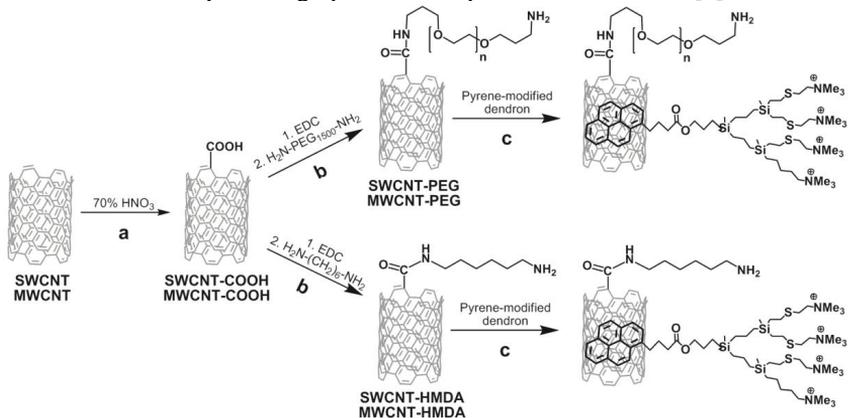


Figure 2 – Scheme of CNT functionalization

Dendron-decorated CNTs are able to bind siRNA efficiently. As shown on fig. 3, SWCNTs bind siRNA better, than MWCNTs. The positive dendritic effect on siRNA binding ( $G1 < G2 < G3$ ) has been also observed. The formation of hybrid nanoparticles can be observed by TEM.

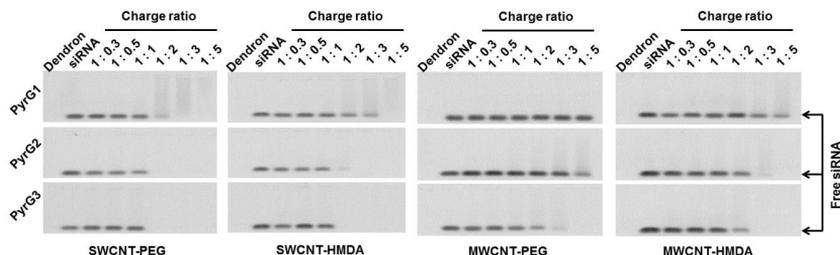


Figure 3 – siRNA binding by dendron-decorated CNTs

The obtained data suggest that both SWCNTs and MWCNTs decorated with pyrene-modified cationic carbosilane dendrons can be prospective carriers for therapeutic nucleic acids, including siRNA.

This work was supported by RFBR grant No.16-33-60152\_mol\_a\_dk, by the Scholarship of the President of the Russian Federation (grant No. 882.2016.4) and by Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme Fellowship within the 7th European Community Framework Programme, project No. PIRSES-GA-2012-316730 NANOGENE.

### References

1. Apartsin E.K., Buyanova M.Yu., Novopashina D.S., Venyaminova A.G. Hybrids of siRNA with carbon nanotubes as RNA interference instruments / Karachevtsev V.A. (ed.). *Nanobiophysics: fundamentals and applications* // Singapore: Pan Stanford Publishing. 2015. P. 33-57.
2. Al-Jamal K., Toma F., Yilmazer A., Ali-Boucetta H., Nunes A., Herrero M., Tian B., Eddaoudi A., Al-Jamal W., Bianco A., et al. (2010) Enhanced cellular internalization and gene silencing with a series of cationic dendron-multiwalled carbon nanotube:siRNA complexes // *FASEB J.* – 2010. – V. 24. – P. 4354-4365.
3. Ionov M., Lazniewska J., Dzmitruk V., Halets I., Loznikova S., Novopashina D., Apartsin E., Krasheninina O., Venyaminova A., Milowska K., Nowacka O., Gomez Ramirez R., de la Mata F.J., Majoral J.-P., Shcharbin D., Bryszewska M. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (A). Mechanisms of interaction // *Int. J. Pharm.* – 2015. – V. 485. – N. 1-2. – P. 261-269.
4. Dzmitruk V., Szulc A., Shcharbin D., Janaszewska A., Shcharbina N., Lazniewska J., Novopashina D., Buyanova M., Ionov M., Klajnert-Maculewicz B., Gómez Ramirez R., Mignani S., Majoral J.-P., Muñoz-Fernández M.A., Bryszewska M. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (A). Efficiency of pharmacological action // *Int. J. Pharm.* – 2015. – V. 485. – N. 1-2. – P. 288-294.
5. Apartsin E.K., Novopashina D.S., Nastaushev Yu.V., Venyaminova A.G. Fluorescently labeled single-walled carbon nanotubes and their hybrids with oligonucleotides // *Nanotechnol. Russ.* – 2012. – V. 7. – N. 3-4. – P. 99-109.
6. Apartsin E.K., Buyanova M.Yu., Novopashina D.S., Ryabchikova E.I., Filatov A.V., Zenkova M.A., Venyaminova A.G. Novel multifunctional hybrids of single-walled carbon nanotubes with nucleic acids: synthesis and interactions with living cells // *ACS Appl. Mater. Interfaces* – 2014. – V. 6. – N. 3. – P. 1454-1461.

# COMBINATION OF ANTICANCER SHORT RNA COCKTAILS WITH NANOMATERIALS AS A NOVEL TOOL TO TREAT CANCER CELLS

**Dzmitruk V.<sup>1</sup>, Ionov M.<sup>2</sup>, Gomez-Ramirez R.<sup>3</sup>, F.J. de la Mata<sup>3</sup>, Bryszewska M.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Biophysics and Cell Engineering of NASB, Akademicheskaja 27, Minsk 220072, Belarus. E-mail: dmitrul.olga@gmail.com*

<sup>2</sup>*Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorskast. 141/143, 90-236, Lodz, Poland*

<sup>3</sup>*Departamento Química Inorgánica, Universidad de Alcalá de Henares, CIBER-BBN Alcalá de Henares, Spain*

Gene therapy is one of the most effective ways to treat tumor. One of the new directions of gene therapy is the suppression of malignancy arising in normal cells. During transformation, normal cells start to propagate uncontrollably, losing the ability to undergo apoptosis, thus resulting in malignancies formation. The regulation of apoptosis in cells is implemented by the family of Bcl-2 proteins [1], which is divided into pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins. The group of apoptosis inhibitors include Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A-1 and Mcl-xL. Anti-apoptotic proteins expression can be blocked at post-translational level by means of RNA interference (RNAi) – a process of selective gene silencing. RNAi effectors – siRNA (small interfering RNA) or microRNA are able by means of cellular machinery to arrest or cleave mRNA, responsible for the key cancer protein expression [2].

A major limit of such gene therapy application is effective delivery of nucleic acids siRNA into the target cells [3]. Naked nucleic acids undergo degradation by endogenous enzymes and are unable to penetrate cellular membranes owing to their large size and high negative charge density. Specific and effective delivery of genetic material can be provided by a wide range of viral and non-viral delivery systems. The viral systems are more effective but they are too costly and provide some critical side-effects such as high immunogenicity and carcinogenicity in vivo. Synthetic (non-viral) systems are comparatively less effective but more flexible and safer [4]. Among large number of nanosynthetic materials dendrimers are highlighted for gene delivery due to their monodispersity, predetermined tree-like structure, stability, low viscosity and the large number of charged end groups. Dendrimers are synthetic polymers with a diameter of 3–10 nm. Cationic dendrimers can complex with nucleic acids by self-assembly, making complexes called “dendriplexes” [5].

In current research study different dendrimers were tested in terms to perform delivery system for different RNAi effectors. Their efficiency to contain survival rate of cancer cell lines were evaluated by applying mixtures of different RNAs as well as a singleshort RNA.

Here we represent experimental results on dendriplexes formed by 3 chemically different groups of dendrimers: PAMAM, carbosilane and phosphorous-containing, complexed with small RNAs designed against anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1. The dendriplexes were characterized by such techniques as fluorescence analysis, zeta potential, dynamic light scattering (DLS), circular dichroism (CD), and transmission electron microscopic (TEM). Gel electrophoresis in the presence of RNase-A allowed us to answer a fundamental question as to whether dendrimers protect siRNA from degradation by nucleases. We also used a dendriplex disassociation assay involving a polyanionic agent–heparin – to check their ability to release siRNAs and monitor their structure after disassociation [6].

It was revealed all dendrimers form stable complexes with small acting RNAs by self-assembling in up to 1µm in size. In contrast to others phosphorous dendrimers are insensitive to heparin impact thus indicating not only electrostatic interaction within the dendriplex.

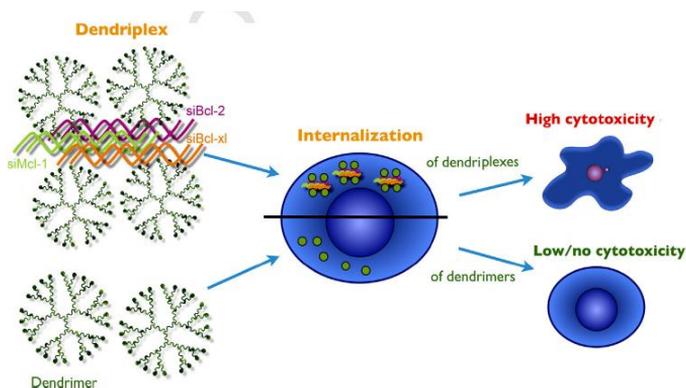


Figure 1 – A schematic representation of the mode of action of dendriplexes, including cocktail of different siRNAs (reprinted from [6])

The findings on complex formation show the potential of dendrimers as carriers of anticancer siRNA into cancer cells, thereby creating an alternative non-viral delivery system for BCL family siRNAs to target cells in gene therapy [6].

Cytotoxicity studies on HeLa (monolayer cervical cancer) and HL-60 (suspension promyelocytic T-leukemia) cell lines first showed up synergism of siRNAs action, targeted against different anti-apoptotic proteins, to be very effective when delivered by cationic dendrimers (figure 1), while anticancer action of each single siRNA was much less or even insignificant (as it was for HL-60). In our experiments the cytotoxicity of siRNA/dendrimer complexes has a dual nature based on three mechanisms: apoptosis, autophagy and necrosis, siRNA induced apoptosis and dendrimers themselves may induce all above cell deaths depending on dendrimer's nature [7].

In summary, we report the usefulness of cationic dendrimers (PAMAM, CPD, CBD) as vectors for anticancer siRNAs. Phosphorous and PAMAM dendrimers were shown to facilitate siRNA intracellular penetration at a high rate, but revealed also high toxic effect, while carbosilane dendrimers were moderate in internalization efficacy with low toxic side effect. Both of the obtained systems can be used for gene therapy.

Acknowledgments. This work is supported by 2 grants of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research No. B15RM-060 and No. B15CO-041, a Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme Fellowship within the 7th European Community Framework Programme, project No. PIRSES-GA-2012-316730 NANOGENE.

### References

1. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins // J Cell Mol Med. – 2003. – V. 7. – P. 249-257.
2. Milhavel O., Gary D.S. and Mattson M.P. RNA interference in biology and medicine // Pharmacol Rev. – 2003. – V. 55. – P. 629-648.
3. Song E., et al. Antibody mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors // Nat Biotechnol. – 2005. – V. 23. – P. 709-717.
4. Shcharbin D., et al. How to study dendrimers and dendriplexes III. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity *in vivo* // J Control Release. – 2014. – V. 181. – P. 40-52.
5. Wang J., et al. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. AAPS J // 2010. – V. 12. – P. 492-503.
6. Ionov M., et al. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (A). Mechanisms of interaction // Int J Pharm. – 2015. – V. 485. P. 261-269.
7. Dzmirutuk V., et al. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (B). Efficiency of pharmacological action // Int J Pharm. – 2015. – V. 485. – P. 288-294.

**STUDY OF THE REACTIVITY OF CARBOSILANE  
METALLODENDRIMERS CONTAINING N-DONOR  
MONODENTATE OR N,N-CHELATING RUTHENIUM (II) ARENE  
COMPLEXES WITH DIFFERENTS BIOMOLECULES**

**Marta Maroto-Díaz<sup>1,2</sup>, Benelita T. Elie<sup>3,4</sup>, Pilar Gymez-Sal<sup>1</sup>,  
Jorge Pérez-Serrano<sup>5</sup>, Rafael Gymez<sup>1,2</sup>, Maria Contel<sup>3,4</sup>,  
and F. Javier de la Mata<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Dpto. de Q. Orgánica y Q. Inorgánica, Universidad de Alcalá,  
Campus Universitario, Alcalá de Henares, Spain*

<sup>2</sup>*Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and  
Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain*

<sup>3</sup>*Dept. of Chemistry, Brooklyn College and The Graduate Center, CUNY,  
Brooklyn, New York 11210, USA*

<sup>4</sup>*Biology PhD Program, The Graduate Center, CUNY, 365 Fifth Avenue,  
New York, NY 10016, USA*

<sup>5</sup>*Dpto. de Biomedicina y Biotecnología, Universidad de Alcalá,  
Campus Universitario.*

Since DNA replication is a key event for cell division, it is among critically important targets in cancer chemotherapy. Most cytotoxic platinum drugs form strong covalent bonds with DNA bases [1]. However, a variety of platinum compounds act as DNA intercalators upon coordination to the appropriate ancillary ligands [2]. The more thoroughly studied ruthenium anti-tumor agents have displayed differences with respect to their interactions with DNA depending on their structure [3]. In this context, we evaluated the effect of DNA interactions that could, to some extent, contribute to the observed cytotoxicity of the new metallodendrimers synthesized.

We followed the interaction of selected compounds by electrophoresis in agarose gel with *plasmid* (*pBR322*) DNA. For these compounds we also studied their interaction with *Calf Thymus* DNA (CT DNA) by circular dichroism (CD). The CD spectral technique is very sensitive to diagnose alterations on the secondary structure of DNA that result from DNA-drug interactions.

Human serum albumin (HSA) is the most abundant carrier protein in plasma and is able to bind a variety of substrates including metal cations, hormones and most therapeutic drugs. It has been demonstrated that the distribution, the free concentration and the metabolism of various drugs can be significantly altered as a result of their binding to the protein [4]. In all cases the compounds caused a concentration dependent quenching of fluorescence

without changing the emission maximum or the shape of the peak. All these data indicate an interaction of the compounds with HSA.

Cathepsin-B (Cat-B) is an abundant and ubiquitously expressed cysteine peptidase of the papain family, which has turned out to be a prognostic marker for several types of cancers [5]. Cathepsin-B seems to be involved (along with other Cathepsins) in metastasis, angiogenesis and tumor progression [6]. It has been proposed that Cat-B may be a possible therapeutic target for the control of tumor progression [7]. RAPTA-Ru compounds which inhibit Cat-B with  $IC_{50}$  in the low micromolar range can reduce the mass and number of metastases *in vivo* [8]. Therefore, we studied the inhibition of Cathepsin-B by highly cytotoxic first generation dendrimers.

Acknowledgements. CTQ2014-54004-P (MINECO) and Consortium NANODENDMED ref. S2011/ BMD-2351 (CM) to the UAH. Brooklyn College (CUNY) authors thank the National Cancer Institute (NCI) for grant 1SC1CA182844 (to M.C.). CIBER-BBN is an initiative funded by the VI National R&D&i Plan 2008–2011, IniciativaIngenio 2010, Consolider Program, and CIBER Actions and financed by the Instituto de Salud Carlos III with assistance from the European Regional Development Fund.

### References

1. J.C. Dabrowiak, *Inorg. Chim. Acta.* – 2012. – V. 393. – P. 1-2.
2. H.-K. Liu and P.J. Sadler, *Acc. Chem. Res.* – 2011. – V. 44. – P. 349-359.
3. A. Bergamo, C. Gaiddon, J.H. Schellens, J.H. Beijnen and G. Sava, *J. Inorg. Biochem.* – 2012. – V. 106. – P. 90-99.
4. A.R. Timerbaev, C.G. Hartinger, S.S. Aleksenko and B.K. Keppler, *Chem. Rev.* – 2006. – V. 106. – P. 2224-2248.
5. J.E. Koblinski, M. Ahram and B.F. Sloane, *Clin. Chim. Acta.* – 2000. – V. 291. – P. 113-135.
6. J.A. Joyce, A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraud, F.Y. Tsai, D.C. Greenbaum, J.H. Hager, M. Bogyo and D. Hanahan, *Cancer Cell.* – 2004. – V. 5. – P. 443-453.
7. R. Frlan and S. Gobec, *Curr. Med. Chem.* – 2006. – V. 13. – P. 2309-2327.
8. A. Casini, C. Gabbiani, F. Sorrentino, M.P. Rigobello, A. Bindoli, T.J. Geldbach, A. Marrone, N. Re, C.G. Hartinger, P.J. Dyson and L. Messori, *J. Med. Chem.* – 2008. – V. 51. – P. 6773-6781.

# CATIONIC CARBOSILANE DENDRIERS: INFLUENCE OF DENDRIMER FRAMEWORK AND CATIONIC CHARGE ON BIOMEDICAL APPLICATIONS

María Sánchez-Milla<sup>1,2</sup>, Elena Fuentes Paniagua<sup>1</sup>, Javier Sánchez-Nieves<sup>2</sup>, Marek Maly<sup>3</sup>, José Luis Copa Patiño<sup>4</sup>, Juan Soliveri de Carranza<sup>4</sup>, and F. Javier de la Mata<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica,  
University of Alcalá, Alcalá de Henares, España*

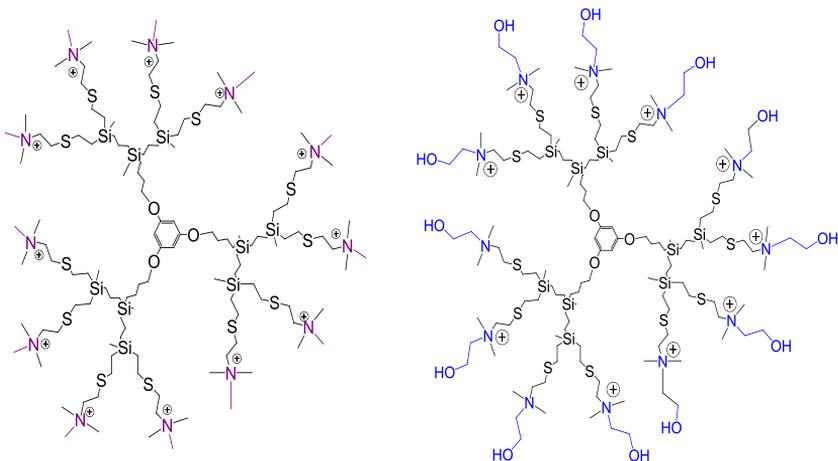
<sup>2</sup>*Centro de bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN),  
Madrid, España*

<sup>3</sup>*Faculty of Science, J. E. Purkinje University, Usti nad Labem,  
Czech Republic*

<sup>4</sup>*Departamento de Biomedicina y Biotecnología, Alcalá, Madrid*

Dendrimers are globular macromolecules with well-defined structure and multivalent surface. These characteristics give dendrimers particular and specific properties [1]. In the last years, dendrimers have found applications in different fields, highlighting their biomedical applications. In this way, dendrimers decorated with cationic moieties have been used as nucleic acids carriers for gene therapy [2] or as antibacterial agents [3]. In the first case, for example, dendrimers formed nanoconjugates with small interfering RNA (siRNA) to protect them from degradation enzymes, helping this genetic material to cross the cell membrane. In the second case, the positive charge of these macromolecules causes destabilization of bacterial membranes, killing the bacteria [4].

In this work, we present two type of cationic carbosilane dendrimers with different ammonium groups ( $-\text{NMe}_3^+$ ,  $-\text{NMe}_2(\text{CH}_2)_2\text{OH}^+$ ) and their effect on nucleic acids delivery, antibacterial activity and toxicity. The behavior of these compounds is clearly determined by the ability of carbosilane framework to establish hydrophobic interactions with RNA and cell membranes, by the charge exposure, and finally, by the possibility to formed hydrogen bonds.



## References

1. Shahi, S.R., Kulkarni, M.S., et al. Dendrimers // *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* – 2015. – V. 33. – P. 187-89.
2. de las Cuevas, N., Garcia-Gallego, S., et al. *In vitro* studies of water-stable cationic carbosilane dendrimers as delivery vehicles for gene therapy against HIV and hepatocarcinoma // *Med. Chem.* – 2012. – V. 19. – P. 5052-5061.
3. Chanawanno, K., Chantrapromma, S., et al. Synthesis, structure and *in vitro* antibacterial activities of new hybrid disinfectants quaternary ammonium compounds: pyridinium and quinolinium stilbene benzenesulfonates // *Eur. J. Med. Chem.* – 2010. – V. 45. – P. 4199-4208.
4. Wang, B., Navath, R.S., Menjoge, A.R., et al. Inhibition of bacterial growth and intramniotic infection in a guinea pig model of chorioamnionitis using PANMAN dendrimers // *Int. J. Pharm.* – 2010. – V. 395. – P. 298-308.
5. Das A.T., Brummelkamp T.R., et al. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition // *J Virol.* – 2004. – V. 78. – P. 2601-2605.

## THE IMPACT OF RUTHENIUM TERMINATED CARBOSILANE DENDRIMERS ON CELL MEMBRANES

Michlewska S.<sup>1</sup>, Gapińska M.<sup>1</sup>, Szwed A.<sup>2</sup>, Pedziwiatr-Werbicka E.<sup>2</sup>,  
Maroto-Díaz M.<sup>3</sup>, Ionov M.<sup>2</sup>, Gomez-Ramirez R.<sup>3</sup>, F.J. de la Mata<sup>3</sup>,  
Shcharbin D.<sup>4</sup>, Bryszewska M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques,  
Faculty of Biology Environmental Protection, University of Lodz,  
Banachast. 12/16, 90-237, Lodz, Poland*

<sup>2</sup>*Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental  
Protection, University of Lodz, Pomorskast. 141/143, 90-236, Lodz, Poland*

<sup>3</sup>*Departamento Química Orgánica y Química Inorgánica, Universidad de  
Alcalá de Henares, CIBER-BBN Alcalá de Henares, Spain*

<sup>4</sup>*Institute of Biophysics and Cell Engineering of NASB, Akademicheskaja 27,  
Minsk 220072, Belarus*

Nanotechnology is the most developing field of science. The new, hitherto unknown versatile nanomaterials with unique properties have been synthesized [1]. Many of them such as carbon nanotubes, mesoporous silica, dendrimers can be successfully used in medicine as drug carriers. In this field the attention of scientists has been focused on dendrimers due to their structure and monodispersity, as well as their controlled synthesis [2]. Dendrimers are branched spherical polymers. They consist of a core, and radial branching. New branches attached to the core form successive generations. At the ends of the branches there are free functional groups. The physical and chemical properties of dendrimers can be modified. It is also possible to precisely determine the shape, size and charge of formed nanoparticles. Many types of dendrimers such as amine-terminated poly (amidoamine) PAMAM, poly- (propylenimine) PPI, phosphorus, carbosilane are known [3]. The size of dendrimers is similar with some biomolecules naturally occurring in animals such as insulin, cytochrome or haemoglobin. Due to dendrimers shape and surface charge various types of substituents can be bound to them. There are many works describing the potential of dendrimers as efficient carriers of gene material or drugs. Recently the new class of dendrimers have been synthesized to improve their biomedical properties. One of the modifications aimed to increase the antitumor characteristics of dendrimers is introducing to their structure the molecules of metals such as gold, silver, titanium or ruthenium exhibiting anticancer properties [4].

In our previous work we have studied the mechanisms of interaction between dendrimers and artificial lipid membranes [5]. Here we are discussing the effect of ruthenium terminated carbosilane dendrimers on human erythrocyte cell membrane. Figure 1 shows the haemolytic activity of metallodendrimers of generations 0, 1 and 2 measured as a hemoglobin release from erythrocytes as a result of red blood cell membrane destruction.

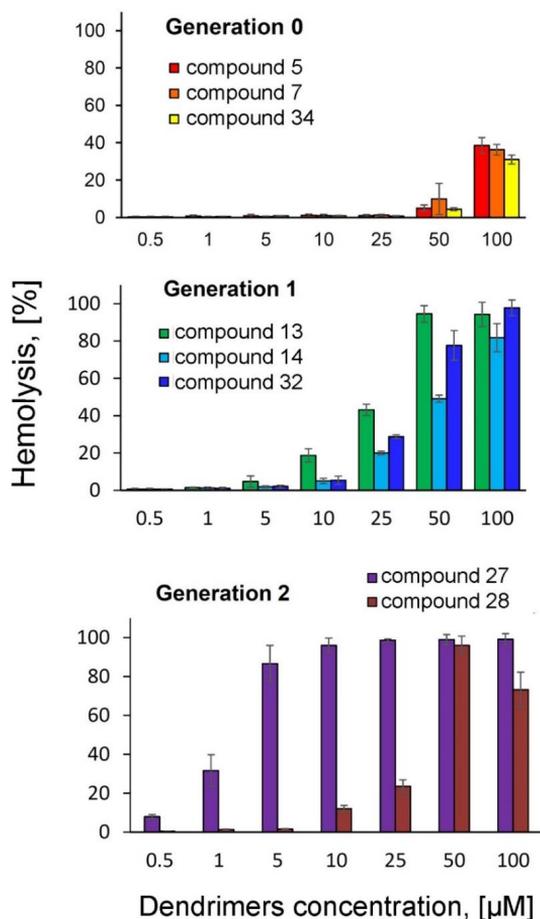


Figure 1 – Haemolysis in human erythrocytes caused by carbosilane metallodendrimers at the concentrations range from 0.5 to 100  $\mu\text{mol/L}$ . A 2 % suspension of freshly isolated human erythrocytes in 10 mmol/L PBS, pH 7.4 was incubated for 24h at 37 $^{\circ}\text{C}$  in the presence of dendrimers

Blood of healthy donors were obtained from Central Blood Bank in Lodz. The blood was anticoagulated, centrifuged and washed three times with PBS, pH=7.4. Erythrocytes were used immediately after isolation. Dendrimers at the concentration of 0.5–100  $\mu\text{mol/L}$  were added to red blood cell suspensions (2 % haematocrit) and incubated at 37 °C for 24 h with shaking. The level of hemolysis was calculated as follows:  $H (\%) = (A_{\text{sample} 540 \text{ nm}}/A_{\text{water} 540 \text{ nm}}) \times 100 \%$ , where  $H (\%)$  is the percentage of haemolysis of the erythrocytes;  $A_{\text{sample} 540 \text{ nm}}$  is the absorbance of the erythrocytes incubated with dendrimers; and  $A_{\text{water} 540 \text{ nm}}$  is the absorbance of the sample of complete haemolysis in water (100 %). The results were obtained from minimum three independent experiments ( $n=6$ ) and were shown as mean  $\pm$  standard error (SE).

Haemolysis assay was performed to test the ability of dendrimers to affect the cell membrane. All analysed dendrimers caused haemolysis. The effect mostly depended on dendrimer generation and concentration. Lowest effect have been shown for the dendrimers of generation -0 (31–38 % of haemolysis at the concentration of 100  $\mu\text{mol/L}$ ). This can be explained by the small number of active surface groups of g-0 dendrimers. In contrast, the haemolytic effect of the dendrimers of generations 1 and 2 washigher and caused massive hemolysis in a concentrations of 25–50  $\mu\text{mol/L}$ . Therefore, the g-1 and g-2 dendrimers can be regarded as haemolytic.

In summary we report that carbosilane ruthenium containing dendrimers of generation 1 and 2 are more toxic than dendrimers of generation 0.

This work was supported by a Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme Fellowship within the 7th European Community Framework Programme, project No. PIRSES-GA-2012-316730 NANOGENE.

## References

1. Ionov M., Ihnatsyeu-Kachan A., Michlewska S., Shcharbina N., Shcharbin D., Majoral J.P., Bryszewska M. Effect of dendrimers on selected enzymes-Evaluation of nano carriers // *Int. J. Pharm.* – 2016. – V. 29. – P. 247-254.
2. Kesharwani P., Banerjee S., Gupta U., Iqbal Mohd Amin M.C., Padhye S., Sarkar F.H., Iyer A.K. PAMAM dendrimers as promising nanocarriers for RNAi therapeutics // *Materials Today.* – 2015. – V. 18. – P. 565–572.
3. Conti D.S., Brewer D., Grashik J., Avasarala S., da Rocha S.R. Poly(amidoamine) dendrimer nanocarriers and their aerosol formulations for siRNA delivery to the lung epithelium // *Mol. Pharm.* – 2014. – V. 11/6. – P. 1808-1822.

4. Hashemi M., Tabatabai S.M., Parhiz H., Milanizadeh S., Amel Farzad S., Abnous K., Ramezani M. Gene delivery efficiency and cytotoxicity of heterocyclic amine-modified PAMAM and PPI dendrimers // *Mater. Sci. Eng. C. Nater Biol.* – 2016. – Appl. 1/61. – P. 791-800.
5. Ionov M., Wróbel D., Gardikis K., Hatziantoniou S., Demetzos C., Majoral J.P., Klajnert B., Bryszewska M. Effect of phosphorus dendrimers on DMPC lipid membranes // *Chem. Phys. Lipids.* – 2012. – V. 165. – P. 408-413.

### **CYTOTOXICITY OF ANTICANCER CARBOSILANE METALLODENDRIMERS IN HUMAN LEUKEMIA (HL-60) CELLS**

**Michlewska S.<sup>1</sup>, Szwed A.<sup>2</sup>, Gapińska M.<sup>1</sup>, Maroto-Díaz M.<sup>3</sup>, Ionov M.<sup>2</sup>, Gomez-Ramirez R.<sup>3</sup>, F.J. de la Mata<sup>3</sup>, Shcharbin D.<sup>4</sup>, Gabryelak T.<sup>2</sup>, Bryszewska M.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banachast. 12/16, 90-237, Lodz, Poland*

<sup>2</sup>*Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorskast. 141/143, 90-236, Lodz, Poland*

<sup>3</sup>*Departamento Química Orgánica y Química Inorgánica, Universidad de Alcalá de Henares, CIBER-BBN Alcalá de Henares, Spain*

<sup>4</sup>*Institute of Biophysics and Cell Engineering of NASB, Akademicheskaja 27, Minsk 220072, Belarus*

Cancers are now one of the biggest problems of civilization. Researchers around the world are looking for effective methods to fight tumours without damaging healthy tissues. Many of these attempts concentrate on metals such as silver, gold, platinum or ruthenium [1, 2]. Metal compounds are usually insoluble in aqueous solutions. Therefore, in order to increase their solubility in water metal molecules can be bound to carrier nanoparticles such as dendrimers. Dendrimers can be synthesized by a controlled manner and they demonstrate monodispersity. Moreover they have determined shape, size and charge. Dendrimers consist of a core and attached repetitive units (called branches) in the form of successive layers forming increasingly higher generations [3]. At the ends of branches there are free functional groups to which molecules of different metals can be attached [4].

The main objective of the present study was to determine the cytotoxicity of new synthesized ruthenium terminated metallodendrimers of generation 0 (compound 34) and generation 1 (compound 32) to the human leukemia HL-60 cells. The cytotoxicity effect of dendrimers against cancer cells was compared with their effect against normal cells (Chinese hamster B-14 cell line). HL-60 cells were grown in RPMI-1640 (Gibco) with 10 % heat-inactivated FBS (HyClone). B14 cells were grown in DMEM-Glutamax (Gibco) with 10 % heat-inactivated FBS (HyClone). Cells were routinely maintained on plastic tissue culture flasks and plates (Falcon) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % air. The cytotoxicity of dendrimers was assessed with the use of Alamar Blue assay (HL-60 cell line) and MTT assay (B14 cell line). Cells viability was calculated from formula:

$$\% \text{ viability} = (A/A_c) \times 100 \%$$

where A represents the absorbance/fluorescence of the sample, A<sub>c</sub> is the absorbance/fluorescence of control cells. The results were obtained in three independent experiments and were shown as mean ± standard deviation (SD).

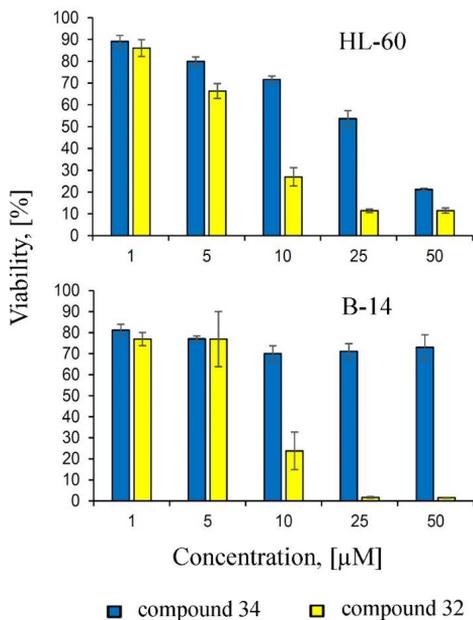


Figure 1 – Top panel – viability of HL-60 cells after 24 h incubation in the presence of metallodendrimers. Bottom panel – viability of B-14 cells after 24 h incubation in the presence of metallodendrimers

The viability of cells decreased with increasing concentrations of dendrimers. Results show that higher generation was more cytotoxic. There were no changes in viability of B14 cells in the presence of the compound 34 (g-0) in a concentration range from 1 to 50  $\mu\text{mol/L}$ , while the same dendrimer significantly decreased the viability of HL-60 cells up to 53.7 % (25  $\mu\text{mol/L}$ ) and 21.2 % (50  $\mu\text{mol/L}$ ) vs control cells (Fig. 1). Compound 32 (g-1) at the concentrations from 1 to 5  $\mu\text{mol/L}$  was not cytotoxic to both HL-60 and B14 cells, while the concentration of 10  $\mu\text{mol/L}$  drastically decreased the number of living cells up to 27 % (HL-60) and 23.7 % (B-14). The presence of this dendrimer in the cell suspension in the concentrations from 25  $\mu\text{mol/L}$  and higher reduced cell viability to 11.5 % for HL-60 and 1-2 % for B-14 cells.

In conclusion, the viability of cells depended mostly on the metallogenodendrimers generation: generation 1 was more cytotoxic than generation 0. Moreover, dendrimers of generation 1 equally reduced both normal and cancer cell viability, whereas dendrimers of generation 0 were more cytotoxic to the cancer cells.

This work was supported by a Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme Fellowship within the 7th European Community Framework Programme, project No. PIRSES-GA-2012-316730 NANOGENE.

### References

1. Ionov M., Ihnatsyey-Kachan A., Michlewska S., Shcharbina N., Shcharbun D., Majoral J.P., Bryszewska M. Effect of dendrimers on selected enzymes-Evaluation of nano carriers // *Int. J. Pharm.* – 2016. – V. 29. – P. 247-254.
2. Arteta M.Y., Berti D., Montis C., Campbell R.A., Clifton L.A., Skoda M.W., Soltwedel O., Baglioni P., Nylander T. Molecular recognition of nucleic acids by ucleolipid/dendrimer surface complexes // *Soft Matter.* – 2014. – V. 10. – P. 8401-8405.
3. Carter R., Westhorpe A., Romero M.J., Habtemariam A., Gallevo C.R., Bark Y., Menezes N., Sadler P.J., Sharma R.A. Radiosensitisation of human colorectal cancer cells by ruthenium(II) arene anticancer complexes // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – P. 20596.
4. Hashemi M., Tabatabai S.M., Parhiz H., Milanizadeh S., Amel Farzad S., Abnous K., Ramezani M. Gene delivery efficiency and cytotoxicity of heterocyclic amine-modified PAMAM and PPI dendrimers // *Mater. Sci. Eng. C. Nater Biol.* – 2016. – Appl. 1/61. – P. 791-800.

## TOXICITY OF GOLD NANOPARTICLES STABILIZED BY CATIONIC CARBOSILANE DENDRONS

**Pedziwiatr-Werbicka E.<sup>1</sup>, Peña-González C.E.<sup>2</sup>, Stasiak K.<sup>1</sup>, Ionov M.<sup>1</sup>,  
Abashkin V.<sup>3</sup>, Loznikova S.<sup>3</sup>, Gómez R.<sup>2</sup>, Sánchez-Nieves J.<sup>2</sup>,  
F.J. de la Mata<sup>2</sup>, Bryszewska M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Department of General Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorskast. 141/143, 90-236, Lodz, Poland*

<sup>2</sup>*Departamento Química Inorgánica, Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares, Spain. CIBER-BBN*

<sup>3</sup>*Institute of Biophysics and Cell Engineering of NASB, Akademicheskaja 27, Minsk 220072, Belarus*

To deliver drug to the desired site in the body is the main aim of biomedical research today. Nanotechnology based drug delivery approaches have proven some exciting results in this perspective. Nanoparticles (NPs) are a class of highly tunable nanoscale objects with wide range of applications. NPs usually exhibit size related characteristics that differ significantly from those observed in bulk materials [1]. Gold nanoparticles (AuNPs) [2] have been among the most extensively studied nanomaterials, because of their properties that include large surface-to-volume ratio, stability, excellent biocompatibility, low toxicity and ease to functionalize [3-5]. Their utilization in different applications is limited due to the aggregation processes occurring frequently in the colloidal systems of metal or semiconductor NPs. Thus, in order to prevent or slow down the aggregation, NPs are usually functionalized with a thin shell of monomeric stabilizers (thiols, carboxylates, phosphates or sulfates), synthetic and natural polymers (dextran, polyethylene glycol (PEG), polyvinylpyrrolidone, polyethylene oxide or chitosan), inorganic materials (silica), liposomes and another class of emerging molecules such as dendrimers and dendrons [1]. We are interested in possible biomedical applications of carbosilane dendritic molecules, where the scaffold is built with very apolar C-C and Si-C bonds. Since this framework is highly hydrophobic, the presence of cationic moieties on the periphery of carbosilane dendrimers makes them more water soluble. However, the duality in hydrophobicity/hydrophilicity of these systems seems to be important, because ammonium carbosilane dendrimers not only have been proved successful as non-viral vectors for gene therapy [6-8], but can cross the blood-brain barrier [9, 10]. In view of these attractive properties of carbosilane dendrimers, we have investigated the way to translate them to other macromolecular systems. Owing to the presence of a large num-

ber of terminal groups and the metal surface, drug molecules can be attached by covalent bonds or electrostatic interactions, making them suitable for gene delivery through electrostatic interactions. Nevertheless, interactions with cell compounds and compartments are non-selective, with the risk of causing cyto- and hemo-toxicity mainly due to their surface charge. Thus, we focused on 3 kinds of dendronized AuNPs and their capping dendrons (first, second and third generation) by assessing the effects on erythrocytes (hemolytic activity), platelets (aggregation) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs; lymphocyte proliferation) to clarify their potential use in drug and gene delivery systems.

Table 1. Selected data of AuNPs: a) Obtained by TEM; b) DLS; c) Obtained by TGA and elemental analysis; d) Number of -NMe<sub>3</sub><sup>+</sup> groups by NP; e) Z potential.

Nanoparticles	D (nm) <sup>a</sup>	D (nm) <sup>b</sup>	Av. MW (g mol <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	N <sup>d</sup>	ZP <sup>e</sup> (mV)
AuNP(SG <sub>1</sub> (S-NMe <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) <sub>2</sub> )	1.8	4.9	64761.64	118	+50.0
AuNP(SG <sub>2</sub> (S-NMe <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) <sub>4</sub> )	2.2	15.7	201105.70	528	+63.7
AuNP(SG <sub>3</sub> (S-NMe <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) <sub>8</sub> )	2.0	21.0	307482.90	984	+59.6

Hemolysis of human erythrocytes was determined by measuring the free hemoglobin content after incubation with dendrons HSGn(S-NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>)<sub>m</sub> and corresponding dendronized systems AuNP(SGn(S-NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>)<sub>m</sub>) at 0.05, 0.5, 1, 5, 10 and 20 μM for 2 different times: 2 h and 24 h. The concentrations of AuNPs refer to dendron concentration in AuNPs and, hence, data can be used to correlate behavior of free dendrons with those attached to nanoparticle surfaces. To investigate the effect of human serum albumin (HSA) on hemolysis caused by nanoparticles studied at 5 and 10 μM, 2 mg/ml HSA were added to the solutions prior to the treatment of red blood cells. The parameters of platelet aggregation induced by thrombin were measured for dendrons and their corresponding AuNPs at 10 μM. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were challenged with dendrons HSGn(S-NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>)<sub>m</sub> and nanoparticles AuNP(SGn(S-NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>)<sub>m</sub>) at 0.05, 0.5, 1, 5, 10 and 20 μM to see the level of induction of lymphocyte proliferation or its inhibition due to mitogen-PHA-M.

The effects of dendronized AuNPs and their dendrons on erythrocytes, platelets and peripheral blood mononuclear cells PBMCs have confirmed that the surface charges for dendrons have a significant effect on their toxicity, presenting first generation dendron with very low hemolytic values. However, the poorest values for dendronized AuNPs were clearly found for the second generation derivative AuNP(SG<sub>2</sub>(S-NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>)<sub>4</sub>). However, in the presence of

human serum albumin (HSA), the toxicity of all the systems falls below 10 % (after 2 h of treatment). Regarding platelet aggregation, only third generation dendrons produced a marked negative effect. After AuNPsdendronization, the 3 systems gave higher aggregation than thrombin. Finally, cell proliferation measurement in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) indicated that none of the dendrons and AuNPs stimulated lymphocyte proliferation. The data indicate the influence of cell size, type of interaction between dendrons or AuNPs with cell membrane, and topology of the systems employed. Regarding the hemolysis and proliferation profiles of studied nanosystems (dendron and dendronizedAuNPs) it can be concluded that they are suitable candidates for drug and gene delivery.

Acknowledgements. This work was supported project No. PIRSES-GA-2012-316730 NANOGENE, by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, grant No. M15CO-041.

### References

1. Brunetti, V.; Boucheta, L.M.; Strumia, M.C. Nanoparticle-cored dendrimers: functional hybrid nanocomposites as a new platform for drug delivery systems // *Nanoscale*. – 2015. – V. 7. – P. 3808-3816.
2. Yeh, Y.-C.; Creran, B.; Rotello, V.M. Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology // *Nanoscale*. – 2012. – V. 4. – P. 1871-1880.
3. Khlebtsov, N.; Dykman, L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies // *Chem. Soc. Rev.* – 2011. – V. 40. – P. 1647-1671.
4. Krol, S.; Macrez, R.; Docagne, F.; Defer, G.; Laurent, S.; Rahman, M.; Hajipour, M.J.; Kehoe P.G.; Mahmoudi, M. Therapeutic Benefits from Nanoparticles: The Potential Significance of Nanoscience in Diseases with Compromise to the Blood Brain Barrier // *Chem. Rev.* – 2013. – V. 113. – P. 1877-1903.
5. Levot, A.; Astruc, D. Applications of Vectorized Gold Nanoparticles to the Diagnosis and Therapy of Cancer // *Chem. Soc. Rev.* – 2012. – V. 41. – P. 242-257.
6. Ortega, P.; Bermejo, J.F.; Chonco, L.; de Jesús, E.; de la Mata, F.J.; Fernández, G.; Flores, J.C.; Gómez, R.; Serramía, M.J.; Muñoz-Fernández, M.A. Novel Water-Soluble Carbosilane Dendrimers: Synthesis and Biocompatibility // *Eur. J. Inorg. Chem.* – 2006. – P. 1388-1396.

7. Pedziwiatr-Werbicka, E.; Ferenc, M.; Zaborski, M.; Gabara, B.; Klajnert, B.; Bryszewska, M. Characterization of complexes formed by polypropylene imine dendrimers and anti-HIV oligonucleotides // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2011. – V. 83. – P. 360-366.
8. Pedziwiatr-Werbicka, E.; Shcharbin, D.; Maly, J.; Maly, M.; Zaborski, M.; Gabara, B.; Ortega, P.; de la Mata, F.J.; Gómez, R.; Muñoz-Fernandez, M.A; Klajnert, B.; Bryszewska M. Carbosilane dendrimers are a non-viral delivery system for antisense oligonucleotides: characterization of dendriplexes // *J Biomed Nanotechnol*. – 2012. – V. 8. – P. 57-73.
9. Serramía, M.J.; Álvarez, S.; Fuentes-Paniagua, E.; Clemente, M.I.; Sánchez-Nieves, J.; Gómez, R.; de la Mata, F.J.; Muñoz-Fernández, M.A. In Vivo Delivery of Sirna to the Brain by Carbosilane Dendrimer // *J. Control. Release*. – 2015. – V. 200. – P. 60-70.
10. Jiménez, J.L.; Clemente, M.I.; Weber, N.D.; Sánchez, J.; Ortega, P.; de la Mata, F.J.; Gómez, R.; García, D.; López-Fernández, L.A.; Muñoz-Fernández, M.A. Carbosilane Dendrimers to Transfect Human Astrocytes with Small Interfering Rna Targeting Human Immunodeficiency Virus // *BioDrugs*. – 2010. – V. 24. – P. 331-343.

## **RESEARCH OF ZINC OXIDE NANORODS APPLICATION AS A PLATFORM FOR IMMUNE BIOSENSORS DEVELOPMENT**

**Tamashevski A.V.<sup>1</sup>, Harmaza Y.M.<sup>1</sup>, Viter R.<sup>2</sup>, Dubovskaya L.V.<sup>1</sup>, Slobozhanina E.I.<sup>1</sup>, Volotovskii I.D.<sup>1</sup>, Ubelis A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus, Minsk*

<sup>2</sup>*National Science Center FOTONIKA-LV, University of Latvia, Riga*

Zinc oxide (ZnO) is an important wide band gap semiconductor material having a great potential of application in catalysis, sensing and nanodevices development based on its unique physical properties. Nanostructured ZnO not only possesses high surface area, good biocompatibility and chemical stability being non-toxic, but it also shows biomimetic and high electron communication features important for potential applications in biosensing [1]. However, applications of ZnO in biological or clinical testing schemes have remained largely unexplored, so far even though many biological assay systems rely on optical detection techniques. Many efforts have been recently made to construct ZnO-based biosensors with high performance [2, 3]. Aim of our work

was to test zinc oxide nanorod (ZnO NR) platforms under immobilization of monoclonal antibody using photoluminescence analysis for further immune biosensor development.

ZnO nanorods (ZnO NRs) were obtained by the gaseous-disperse synthesis. For further use of ZnO NRs, they were dispersed in 99.8 % 1-butanol (Sigma-Aldrich) to prepare 10 mg/ml alcohol solution and then ultrasonically treated for 30 min, 44 KHz. 18 mm square glass cover slips and 1–10 mg/ml ZnO nanorods stock solutions were used for the preparation of platforms. Before use, glass substrate was cleaned in 70 % ethanol and treated by the use of plasma technology in an O<sub>2</sub> atmosphere (Plasma Cleaner, Harrick Plasma). After that, ZnO NRs stock solutions were dropped on quartz substrate in a volume of 10 µl, dried at room temperature for 12 h and annealed at 300 °C in air atmosphere for 2 h. Then FITC-conjugated CD19 monoclonal antibody (Mab) was immobilized (2 h, 37 °C) on the ZnO NRs layer. Photoluminescence spectra of ZnO nanorods were detected as described by Viter et al. [3]. PL was excited using UV solid state laser LGI-21 at 0.4 mW/cm<sup>2</sup> with 337 nm excitation wavelength. The emission spectra were recorded at room temperature in the range of 370–800 nm using spectrometer HR2000+ (Ocean Optics).

The photoluminescent properties of ZnO nanostructures usually exhibit near-band-edge (NBE) emissions and the broad deep-level emission (DLE) or visible luminescence due to exciton transitions and defect emission, respectively [4]. Thus, the room temperature photoluminescence (RT PL) spectrum showed two peaks: a narrow and intense peak at 380 nm and a wide non-symmetric peak, with maximum at 520 nm. Usually the NBE/DLE ratio of ZnO nanostructures increases with improvement of the material stoichiometry [4]. Due to the expected sensing mechanism in present work we have focused on the NBE emission peak intensity as the most informative signal.

As first step, we selected the optimal ZnO nanorods concentration for platforms preparation. The following ZnO NRs concentrations were tested: 1 mg/ml; 2.5 mg/ml; 5 mg/ml; 10 mg/ml. The NBE part of the PL spectra of ZnO NRs in investigated concentrations deposited on quartz substrates was detected. It was shown that PL intensity of ZnO NRs increases from rise of nanomaterial concentration: in case of 1 mg/ml ZnO NRs it was about 12300 arb. un.; 2.5 mg/ml ZnO NRs – 14200 arb. un.; 5 mg/ml and 10 mg/ml ZnO NRs – 13000 arb. un. We can see that ZnO NRs PL intensity reaches a plateau under concentrations 5 and 10 mg/ml that indicates about ZnO NRs multilayer structure formation on a glass surface. Increase in PL intensity in case of 2.5 mg/ml ZnO NRs compared with 1 mg/ml indicates about ZnO NRs packing degree rise in present surface area, however, this leads to the not a monolayer domains formation. Thus, 1 mg/ml ZnO NRs deposited on a quartz

substrate is an optimal concentration for further platform preparation and testing, due to obtain of the homogeneous monolayers (data not shown).

Then we investigated optical properties of ZnO NR platforms after immobilization of monoclonal antibodies. In current work we used FITC conjugated CD19 antibody (FITC-anti-CD19). It is known that FITC has absorption and emission bands in visible range from 420 nm to 580 nm, but NBE part of ZnO NRs spectrum does not exhibit absorption or emission in this electromagnetic spectrum range. Testing concentrations of Mab were selected as 1.25  $\mu\text{g/ml}$ ; 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ; 6.25  $\mu\text{g/ml}$ ; 12.5  $\mu\text{g/ml}$  and 25  $\mu\text{g/ml}$ . Using photoluminescence it was found that Mab immobilization on ZnO NRs leads to an increase in RT PL intensity but this rise does not have a concentration-dependent manner. In a case of FITC-anti-CD19 immobilization at concentration of 1.25  $\mu\text{g/ml}$  the RT PL intensity of ZnO NRs was about 15500 arb.un.; at 2.5  $\mu\text{g/ml}$  – 17700 arb.un.; at 6.25  $\mu\text{g/ml}$  – 21500 arb.un. Surprisingly, after FITC-anti-CD19 immobilization at the concentrations of 12.5  $\mu\text{g/ml}$  and 25  $\mu\text{g/ml}$  the RT PL intensity of ZnO NRs was reduced to 19000 arb.un. and 18200 arb.un., respectively. The observed decrease in RT PL intensity in the case of 12.5  $\mu\text{g/ml}$  and 25  $\mu\text{g/ml}$  can be explained by the formation of double or triple biolayers of monoclonal antibodies and a subsequent crystallization that leads to the photoluminescence quenching (data not shown).

We suppose that the observed changes in ZnO NRs photoluminescence can be explained by non covalent binding of ZnO NRs with proteins (in our case fluorescein-conjugated CD19 monoclonal antibody). It is known that proteins are bound to ZnO NRs surface by several functional groups. In order to prove the formation of bonds between the ZnO NRs, deposited on a glass substrate and CD19 monoclonal antibody, the experiments with Mab fixation by the paraformaldehyde (PFA) that cross-link thiol (SH-), amine (NH<sub>2</sub>-), carboxyl (COOH-), hydroxyl (OH-) groups of protein molecules were conducted. FITC-CD19 monoclonal antibody were pretreated with 1 % PFA solution and dropped on a ZnO NR platforms. It was shown that the NBE emission of ZnO NRs is increased after immobilization of FITC-CD19 monoclonal antibody at a concentration of 6.25  $\mu\text{g/ml}$ . After fixation of Mab with PFA reduction of RT PL intensity till values corresponding to the ZnO NRs with PBS and PFA was observed. Interestingly, that RT PL intensity of ZnO NRs after PFA solution added on platform did not change compare to values corresponding to ZnO NRs with PBS.

The outcomes of these studies confirmed that ZnO NRs exhibit an optical property useful for effective monitoring of fluorescent signal from biological systems as monoclonal antibodies. Moreover, 6.25  $\mu\text{g/ml}$  is an optimal concentration of CD19 monoclonal antibody for immune biosensor development

using ZnO NRs platform because of this amount of Mab provides significant coverage of the ZnO NRs surface and formation of monolayer.

This work was supported by EC FP-7 IRSES Grant №18520 “Development of nanotechnology based biosensors for agriculture” 2013–2016.

### References

1. A highly sensitive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensor based on zinc oxide nanorod arrays film sensing interface / J. Wang [et al.] // *Analyst.* – 2010. – Vol. 135. – P. 1992–1996.
2. ZnO quantum dot labeled immunosensor for carbohydrate antigen 19-9 / B. Gu [et al.] // *Biosens. Bioelectr.* – 2011. – Vol. 26. – P. 2720–2723.
3. Application of room temperature photoluminescence from ZnO nanorods for *Salmonella* detection / R. Viter [et al.] // *IEEE Sensors J.* – 2013. – Vol. 14 (6). – P. 2028–2034.
4. Surface effects on photoluminescence of single ZnO nanowires / Z.-M. Liao [et al.] // *Phys. Let.* – 2008. – Vol. A 372. – P. 4505–4509.

### DEVELOPMENT OF MODEL FOR AN INTRATUMORAL DISTRIBUTION OF MTHPC/CYCLODEXTRIN COMPLEXES

Yakavets I.V.<sup>1,2,3</sup>, Yankovsky I.V.<sup>1,2,3</sup>, Zorin V.P.<sup>1</sup>, Bolotine L.N.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>*Belarussian State University, Minsk, Belarus*

<sup>2</sup>*CRAN, CNRS, Université de Lorraine, Nancy, France*

<sup>3</sup>*Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment that uses special drugs, called photosensitizers (PS), along with light to kill cancer cells. The distribution of anticancer drugs is an important factor in the success of treatment. The distribution of molecules into the tumor is governed by at least three phenomena: the extravasation from the blood vessels, diffusion through the extravascular tissue and interaction with intracellular targets within the tumor environment. In the present study we used multicellular spheroids to investigate the modification of intratumoral transport of PS via complexation with cyclodextrins.

Multicellular spheroids are spherical aggregates of tumor, which reflect many properties of solid tumors, such as tight junctions between epithelial cells, gradients of nutrient concentrations and cell proliferation from the exterior to the centre. By incubating spheroids in a medium that contains an anti-

cancer drug it is possible to examine the kinetics of drug penetration in tumor tissue.

The photosensitizer used in the study is 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC). It is one of the most potent second-generation clinically approved photosensitizer [1]. The main limitation of its application in PDT is a low water-solubility. To prevent mTHPC aggregation several special formulations, such as liposomes, polymer solutions and bio-conjugates were designed. An application of specialized pharmacological formulations supposes a development of new experimental techniques to control photosensitizer distribution in biological media. Cyclic oligosaccharides, cyclodextrins, are also considered as perspective formulation for tetrapyrrolic photosensitizers.

Cyclodextrins (CDs) are macrocyclic oligosaccharides that combine a hydrophobic nano-sized cavity with a hydrophilic surface. The cavity enables the partial or total incorporation of lipophilic molecules. Cyclodextrins as carriers of various drug molecules can be vehicles of photosensitizers (PS) via complexation [2]. The P. Prognon and A. Kasselouri group described efficient formation of inclusion complexes between mTHPC and CDs (Figure 1) [1].

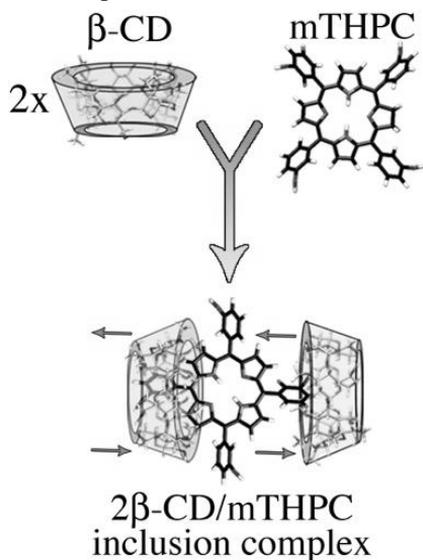


Figure 1 – The formation of inclusion complex between  $\beta$ -CDs and mTHPC

In the present current study, we analyzed the influence of methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M- $\beta$ -CD) and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (Hp- $\beta$ -CD) on the mTHPC biodistribution processes at wide range CDs concentrations. We have shown, that effect of cyclodextrins on mTHPC uptake in spheroids strongly depends on concentration and type of CDs (Figure 2). Low concentrations of CDs result in an increase of mTHPC accumulation in spheroids with a maximal uptake at 4.5  $\mu$ M for Me- $\beta$ -CD and 90.0  $\mu$ M for Hp- $\beta$ -CD. Further increase in CDs concentrations is accompanied by a gradual decrease of mTHPC uptake. Another observation is related to the increased mTHPC penetration depth into the tumor spheroids in the presence of CDs. Microscopic analysis demonstrated that the presence of CDs results in significant changes of the distribution profiles of mTHPC in spheroids.

We suggest that CDs increase a diffusion rate of mTHPC between biological transporters and cellular targets at the low concentrations (causing less than 50 % binding of CDs to mTHPC). At the same time, higher CDs concentrations that provide almost complete binding of mTHPC molecules inhibit the accumulation of mTHPC in spheroids.

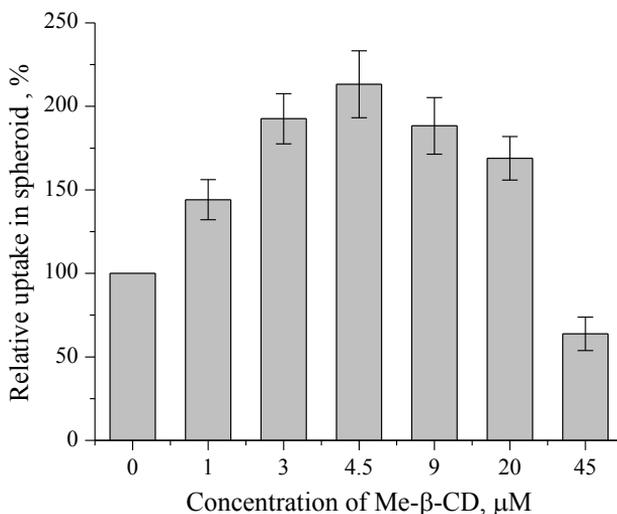


Figure 2 – The dependence of mTHPC uptake in spheroids on concentration of Me- $\beta$ -CD

The data obtained confirm the interest of CDs in mTHPC-PDT.

Acknowledgements. This study was supported by Belarussian Republican Foundation for Fundamental Research (grants M16M-049 and Ф16МВ-006), the Ministry of Education of the Republic of Belarus and French “Ligue National contre le Cancer”. We thank Biolitec Research GmbH (Jena, Germany) for providing us with mTHPC.

### References

1. Photophysical properties of glucoconjugated chlorins and porphyrins and their associations with cyclodextrins / A. Bautista-Sanchez [et al.] // J. Photochem. Photobiol. – 2005. – Vol. 81. – P. 154-162.
2. Senge, M.O. mTHPC – A drug on its way from second to third generation photosensitizer? / M.O. Senge // Photodiagn. Photodyn. Ther. – 2012. – Vol. 9. – P. 170-179.
3. Cyclodextrin carriers of positively charged porphyrin sensitizers / J. Mosinger [et al.] // Org. Biomol. Chem. – 2009. – Vol. 7. – P. 3797-3804.

## ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ФОТОРЕДУКЦИЮ МЕТГЕМОГЛОБИНА КРОВИ

Асимов М.М.<sup>1</sup>, Асимов Р.М.<sup>2</sup>, Батъян А.Н.<sup>3</sup>, Шиченко Н.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт физики имени Б.И. Степанова НАН Республики Беларусь

<sup>2</sup>Белорусский парк высоких технологий, Минск, Беларусь

<sup>3</sup>Минский государственный экологический университет  
им. А.Д.Сахарова, Минск, Беларусь

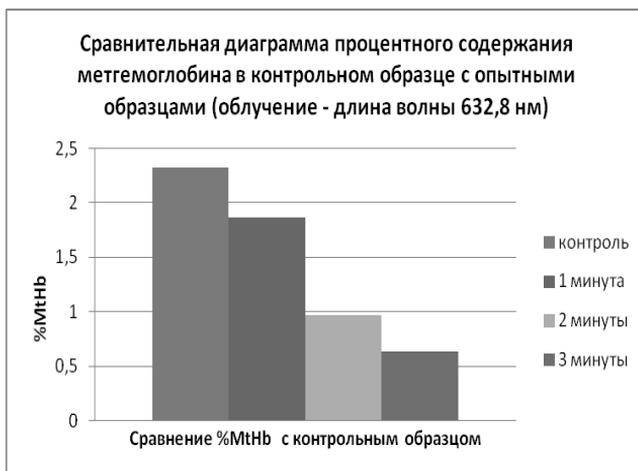
В работе представлены результаты исследований по нейтрализации вредного воздействия токсических химических веществ, так называемых экотоксикантов на здоровье человека [1]. Особое внимание уделено вредному воздействию экотоксикантов на кровеносную систему, которая очень чувствительна к действию химических веществ [2, 3].

Одним из токсичных соединений является метгемоглобин (MetHb) крови, отравляющее действие которого особенно опасно для новорожденных. С материнским молоком и питьевой водой в организме новорожденных в высокой концентрации вырабатывается метгемоглобин. Другой группой риска являются военнослужащие, у которых интоксикация связана с качеством воды, продовольствия и с состоянием окружающей среды.

В связи с этим, крайне актуальным является поиск эффективного метода устранения, и разработка защитных мер от отравляющего действия метгемоглобина.

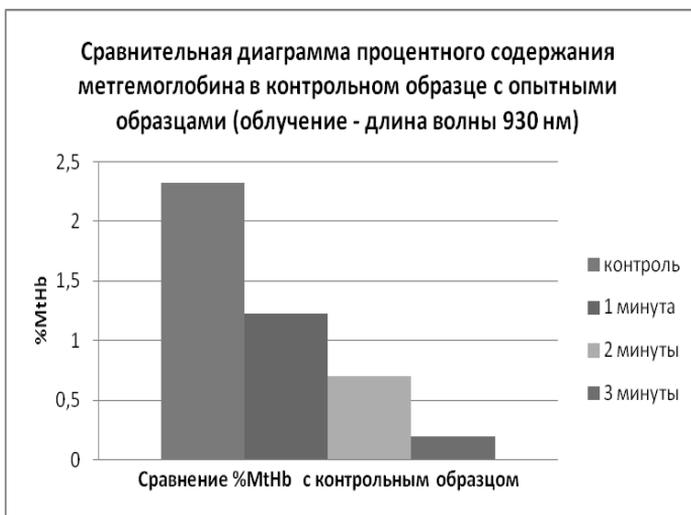
Экспериментальные измерения влияния лазерного излучения на концентрацию метгемоглобина крови проводились с использованием He – Ne и полупроводникового лазерного излучения. Результаты исследований представлены в виде сравнительных диаграмм процентного содержания метгемоглобина в контрольном образце и в образцах, облученных He – Ne и диодным лазерами на длинах волн 632,8 нм и 930 нм, соответственно.

Как видно из диаграммы облучение He – Ne лазером в течение трех минут снижает концентрацию MetHb крови до безопасного уровня. Наиболее сильный эффект проявляется при облучении образца излучением на длине волны 930 нм. Так, облучение на этой длине волны в два раза эффективнее снижает концентрацию MetHb в крови.



Следует отметить, что условия приготовления метгемоглобина и его облучения сохранялись одинаковыми при проведении исследований.

Полученные результаты показывают, при одинаковом механизме биологического действия низкоинтенсивного лазерного излучения эффективность воздействия зависит от длины волны лазерного излучения. Механизм лазерно-индуцированной фоторедукции MtHb крови можно связать с конформационными изменениями в структуре гемоглобина.



Поглощенная энергия распределяется в структуре метгемоглобина таким образом, что существенно ослабляет прочность связи гема с молекулами NO и OH. В такой ситуации облегчается восстановление MtHb до гемоглобина и его кислородтранспортной функции.

Следовательно, отравление метгемоглобином наиболее ярко проявляется у грудных младенцев. С молоком матери и питьевой водой в организм младенца попадают вредные химические вещества вызывающие рост концентрации MtHb в крови. Это представляет опасность для жизни ребенка наряду с высоким билирубином крови. Похоже на то, что положительный эффект солнечной радиации заключается не только в снижении концентрации билирубина, но и MtHb в крови младенца.

Полученные результаты дают научнообоснованную базу для разработки нового метода и аппаратуры для устранения отравляющего действия метгемоглобина и восстановления кислородтранспортной функции крови.

Разработанный метод может быть использован в клинической практике, как для профилактики, так и для устранения отравляющего действия метгемоглобина, образующегося под действием нитратов в воде и продуктах питания, равно как экотоксикантов в окружающей среде.

Планируется исследовать наблюдаемый эффект более детально в зависимости от длины волны и интенсивности лазерного излучения.

### Литература

1. W. Kao L., Nanagas K.A. // Clin. Lab. Med. – 2006. – V. 26. – P. 99-103.
2. Асимов М.М., Асимов Р.М., Рубинов А.Н. // Оптика и спектроскопия. – 2010. – Т. 109, № 2. – С. 1320-1325.
3. Асимов М.М., Асимов Р.М., Батян А.Н., Трусевич М.О., Рубинов А.Н. Медэлектроника-2012: средства медицинской электроники и новые медицинские технологии: сборник научных статей VII Международной научно-технической конференции, Минск, 13-14 декабря 2012 года / редколлегия: В.С. Улащик и др. – Минск. – 2012. – С. 142-145.

## АНАЛИЗ И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТЕЙ ЭЛЕКТРО- И ЛАЗЕРОКОАГУЛЯЦИИ ПРИ ОПЕРАТИВНЫХ ВМЕШАТЕЛЬСТВАХ НА ОКОЛОУШНОЙ СЛЮННОЙ ЖЕЛЕЗЕ

Базык-Новикова О.М.<sup>1</sup>, Ажгирей М.Д.<sup>1</sup>, Людчик Т.Б.<sup>2</sup>,  
Гольцев М.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Белорусский государственный медицинский университет,  
Минск, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Белорусская медицинская академия последипломного образования,  
Минск, Республика Беларусь*

Околоушная слюнная железа относится к органам с разветвленной сосудистой и протоковой системами и находится в непосредственной близости со стволовой частью лицевого нерва и с его ветвями, проходящими между долями железы. Для предотвращения таких послеоперационных осложнений, как гематома, серома, слюнной свищ, травматическая нейропатия, все хирургические операции должны проводиться прецизионными инструментами с использованием операционной оптики с увеличением 2×4 раза, с контролируемым гемо- и сиалостазом, выполняемыми зачастую с помощью электрохирургии. При температуре от 70 °С до 100 °С вода испаряется из клетки без разрушения мембраны, клетка при этом высушивается, белки денатурируют с образованием тромбов и тем самым осуществляется гемостаз [1, 2]. Экспериментально установлено, что зона коагуляционного некроза при использовании биполярной коагуляции в 2 раза больше, чем при монополярной [2].

Однако применение высокочастотной электрохирургии (ВЧЭХ) может вызывать осложнения в виде локальных термотравм и, как следствие, некроз долек железы, туннелизацию электрического тока по сосудам и протокам и, в итоге, поражение лицевого нерва. Один из путей минимизации этих осложнений – применение лазерного излучения путем трансформации световой энергии в тепловую при поглощении данного излучения специфическими хромофорами тканей [3, 4]. Эффект, оказываемый лазером на ткани, зависит от таких показателей, как длина волны, глубина проникновения, мощность, длительность, режим воздействия. При поглощении энергии лазерного излучения на ограниченном участке биоткани резко повышается температура до величины ~ 400 °С и более. В настоящее время в хирургическую практику активно внедряются полупроводниковые лазеры с длиной волны излучения 940-980 нм и с глубиной проникновения в биоткани ~ 0,5-2 мм [5]. При их использовании на железистых органах, наблюдается не только остановка кровотечения, но и «заваривание» выводных протоков, а также проводится профилактика микробной контаминации и опухолевого обсеменения раны, что улучшает течение послеоперационного периода.

В работе проанализированы возможности электро- и лазерокоагуляции при операциях на околоушной слюнной железе с применением электрохирургического аппарата ФОТЭК Е 352, имеющего 6 монополярных и 2 биполярных режима с максимальной мощностью 350 Вт и портативного полупроводникового лазера НТЦ «ЛЭМТ» БелОМО с длиной волны 940 нм и световодом 400 мкм на экспериментальном (30 морских свинок) и клиническом (20 пациентов с доброкачественными опухолями околоушной слюнной железы) материалах. Температура определялась гибкой термопарой тип К (хромель – алюмель) (ТХА) MLG 135 Flex на мультиметре М4583/2Ц (фирма ELPRIB). Проводили монополярную электрокоагуляцию в режимах от 10 до 36 Вт, лазерокоагуляцию – в режимах от 3 до 5 Вт.

Полученные результаты приведены в таблице 1.

При монополярной коагуляции междольковых прослоек адекватный режим составил 24-28 Вт. При этом перифокальная зона распространялась на железистые структуры, возникала необходимость многократного коагулирования в одном и том же месте за счет прилипания тканей к нагару, увеличивая зону некроза. Отмечалось сокращение мимической мускулатуры при работе на участках железы, визуально не содержащих лицевой нерв. При лазерокоагуляции работа одним кварцевым световодом существенно оптимизировала процесс диссекции тканей, приводя к устойчивой коагуляции сосудов и слюнных протоков.

Данные эксперимента были использованы в клинической практике. В основную и контрольную группы вошли 20 пациентов с локализацией опухоли в наружной доле околоушной железы в проекции прохождения краевой ветви лицевого нерва (моноветвь, не имеющая анастомозов с другими ветвями). Основной группе (10 пациентов) проводилась лазерная резекция в режиме 3-4 Вт. Контрольной группе (10 пациентов) проводилась резекция с использованием электрокоагуляции в монополярном режиме 24-32 Вт. В основной группе количество случаев транзиторной нейропатии краевой ветви в первые сутки после операции составило 3 (30 %), на 7-е сутки – 1 (10 %). В контрольной группе в первые сутки наблюдалось 6 (60 %) случаев нейропатии, на 7-е сутки – 5 (50 %) случаев. У одного пациента (1 %) отмечено образование гематомы, у 1 (1 %) – слюнотечение из раны, у 3 (30 %) – образование серомы.

Таблица 1 – Температурная реакция железистой ткани при применении электро- и лазерокоагуляции. Экспозиция электрода (световода) – 1 с,  $T_{\text{исходная}}=38\text{ }^{\circ}\text{C}$

Режимы, Вт / Условия	Электрод (световод) и ТХА на поверхности	Электрод (световод) на поверхности, ТХА на глубине 0,5 см	Электрод (световод) и ТХА на глубине 0,8 см на расстоянии 0,5 см друг от друга	Электрод (световод) на поверхности, ТХА на глубине 1 см
Электрокоагуляция				
24	44,80 °С	43,80 °С	48,20 °С	43,20 °С
28	50,20 °С	45,00 °С	49,80 °С	45,40 °С
32	54,20 °С	46,60 °С	52,40 °С	48,20 °С
Лазерокоагуляция				
3	41,20 °С	38,40 °С	41,80 °С	38,00 °С
4	45,20 °С	39,60 °С	44,80 °С	38,20 °С
5	48,80 °С	42,80 °С	49,20 °С	38,40 °С

Полученные экспериментальные и клинические данные позволяют сделать вывод, что использование лазерного излучения уменьшает до 2 раз зону повреждения по сравнению с ВЧЭХ и снижает риск повреждения близлежащих тканей, в частности лицевого нерва, обладает выраженным коагулирующим эффектом; обеспечивает надежное «заваривание» выводных протоков железистых органов. Применение лазера позволяет улучшить операционный обзор, предотвращает возникновение послеоперационных осложнений.

## Литература

1. Патон Б.Е., Иванова О.Н. Тканесохраняющая высокочастотная электросварочная хирургия. – Киев: Наукова думка, 2009. – 200 с.
2. Базык-Новикова О.М., Ажгирей М.Д., Бурлакова Т.В., Людчик Т.Б., Гольцев М.В. Использование высокочастотной электрохирургии при оперативных вмешательствах в челюстно-лицевой области // Материалы сателлитной дистанционной научно-практической конференции молодых ученых «Фундаментальная наука в современной медицине», Минск 25 февр. 2015г. БГМУ. – С. 10-15.
3. Богатов, В.В. Лазеры в челюстно-лицевой и пластической хирургии / В.В. Богатов // Стоматология. – 2009. – № 5. – С. 37-39.
4. Ляндрес, И.Г. Лазерные технологии в стоматологии / И.Г. Ляндрес. – М: БГМУ, 2007. – 116 с.
5. Минаев, В.П. Современные лазерные аппараты для хирургии и силовой терапии на основе полупроводниковых и волоконных лазеров: рекомендации по выбору и применению / В.П. Минаев, К.М. Жилин. М.: Издатель И.В. Балабанов, 2009. – 48 с.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОМА ЭКЗОСОМ, СВЯЗАННЫХ С ПОВЕРХНОСТЬЮ КЛЕТОК КРОВИ, ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Бакакина Ю.С.<sup>1</sup>, Тамкович С.Н.<sup>2</sup>, Тутанов О.С.<sup>2</sup>,  
Лактионов П.П.<sup>2</sup>, Дубовская Л.В.<sup>1</sup>, Волотовский И.Д.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,  
Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
СО РАН, Новосибирск, Россия*

Известно, что клетки млекопитающих продуцируют во внеклеточное пространство везикулярные частицы размером 30–100 нм – экзосомы. Экзосомы содержат цитоплазматические и мембранные белки, функционально активные нуклеиновые кислоты (мРНК, микроРНК) продуцирующих их клеток и могут транспортировать содержимое в другие клетки, что имеет большое значение для нормального функционирования многоклеточных организмов. Экзосомы были обнаружены как в плазме крови, так и на поверхности форменных элементов крови. При этом известно, что экзосомы плазмы крови вовлечены в процессы транспорта

биологического материала между клетками и могут служить источником диагностически значимых биополимеров. На сегодняшний день данные о составе и особенностях циркуляции экзосом, связанных с клеточной поверхностью, ограничены, и этот объект требует дальнейшего исследования.

В связи с этим, целью данной работы было сравнительное исследование протеома экзосом, связанных с поверхностью форменных элементов крови, у пациенток с раком молочной железы (РМЖ) и здоровых женщин (доноров).

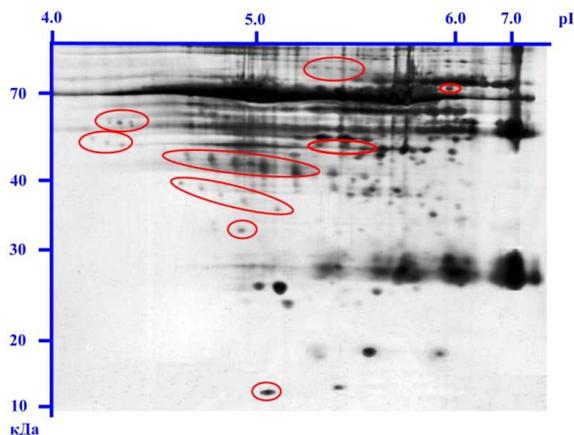
Элюаты с поверхности клеток крови были получены по ранее разработанному протоколу [1]. Затем элюаты разводили в соотношении 1:3 с натрий-фосфатным буфером и фильтровали через фильтры с диаметром пор 100 нм с последующим ультрацентрифугированием при 100 000g в течение 90 мин. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) была проведена характеристика размера везикул, а с помощью моноклональных коммерческих антител (Abcam, Великобритания и BD Biosciences, США) исследована экспрессия на поверхности частиц тетраспаниновых рецепторов (CD-9, CD-24 и CD-63). Для получения протеомных карт экзосом крови использовали метод двумерного гель-электрофореза [2]. Для гель-электрофоретического разделения протеома экзосом крови были подобраны экспериментальные условия (13 % полиакриламидный гель, 150 мкг белка/стрип, визуализация белков на гелях после разделения с использованием раствора нитрата серебра). Протеомные карты статистически анализировали с использованием программного обеспечения PDQuest (Bio-Rad Laboratories, США).

При помощи ТЭМ было показано, что на поверхности клеток крови находятся микрочастицы диаметром 30–70 нм, которые по данным иммунохимического окрашивания экспрессируют характерные для экзосом тетраспаниновые рецепторы CD-9, CD-24 и CD-63.

Для изучения протеома экзосом, связанных с поверхностью форменных элементов крови, пациенток с РМЖ (3 образца) и здоровых женщин (4 образца) были получены соответствующие протеомные карты. Четкая визуализация белков на карте свидетельствует об адекватности экспериментально подобранных условий для выделения и разделения белков (рисунок).

Было установлено, что в полученных препаратах присутствуют белки с молекулярной массой от 10 до 250 кДа. Для выявления белков экзосом, специфичных для РМЖ, был проведен сравнительный анализ полученных протеомных карт для каждой группы. В результате исследования обнаружено, что в группе пациенток с РМЖ по сравнению с группой до-

норов наблюдались отличия в белковом составе экзосом, связанных с поверхностью форменных элементов крови. Наиболее значимые различия между протеомными картами экзосом крови пациенток с РМЖ и доноров были найдены в девяти областях электрофоретической карты. Типичная протеомная карта с указанием областей, в которых были обнаружены наиболее значимые различия, представлена на рисунке. Выявленные отличия заключались в появлении новых дополнительных белков и изменении экспрессии присутствующих в норме белков.



В окружности заключены белки, по относительному объему и наличию которых наблюдались отличия между исследуемыми группами

Рисунок – Типичная протеомная карта экзосом, связанных с поверхностью форменных элементов крови, пациенток с РМЖ

Изучение протеома экзосом представляет особый интерес, поскольку секретируемые опухолевыми клетками везикулы содержат в своем составе опухолеспецифические белки; наличие таких белков свидетельствует о появлении трансформированных клеток, таким образом, экзосомальные белки можно использовать в качестве биомаркеров. Следует отметить, что выявление белков-онкомаркеров в крови может быть сильно затруднено избыточным содержанием общего белка, низкой концентрацией искомым антигенов и/или циркуляцией белка в форме недоступной для взаимодействия с антителами (в экзосомах). Выделение экзосом позволяет сконцентрировать образец и получить достаточное для анализа количество биологического материала.

Таким образом, в ходе выполнения работы проведен сравнительный анализ протеомного профиля экзосом, связанных с поверхностью фор-

менных элементов крови, в группе пациенток с РМЖ и группе доноров, выявлены отличия в белковом составе экзосом между исследованными группами, что свидетельствует о диагностическом потенциале данных белков.

Работа выполняется при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № M15CO-025) и Интеграционного проекта СО РАН (руководитель С.Н. Тамкович) в рамках совместного проекта НАН Беларуси и СО РАН «Анализ циркулирующих экзосом крови в норме и при раке молочной железы» (2015–2017 гг.).

### Литература

1. Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors / S.N. Tamkovich [et al.] // Clin. Chem. – 2005. – Vol. 51. – № 7. – P. 1317–1319.
2. Goerg, A. 2-D proteome analysis protocols / A. Goerg, W. Weiss // Meth. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 112. – P. 235–244.

## ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГОИНФОРМАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СВЧ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ И СПОСОБЫ ИХ ЗАЩИТЫ

**Банний В.А., Игнатенко В.А.**

*УО «Гомельский государственный медицинский университет»,  
Гомель, Республика Беларусь*

Наиболее выраженное действие на организм человека оказывает электромагнитное излучение (ЭМИ) СВЧ-диапазона. Эффект биологического действия СВЧ-излучения определяется интенсивностью, продолжительностью и режимами излучения, частотой, размерами и анатомическим строением тканей, подвергающихся облучению. В зависимости от интенсивности излучения различают тепловое и нетепловое (энергоинформационное) воздействие. Условной границей этого раздела является плотность потока мощности, равная  $10 \text{ мВт/см}^2$  [1]. Не вызывает сомнений, что нетепловое излучение отрицательно влияет на биологические объекты. Одним из способов защиты биообъектов от ЭМИ СВЧ-диапазона различной интенсивности являются радиопоглощающие материалы (РПМ) и электромагнитные экраны (ЭМЭ).

Цель работы состояла в обосновании механизма неспецифического энергоинформационного воздействия ЭМИ СВЧ-диапазона на биологические объекты и разработке защитных полимерных композиционных РПМ и ЭМЭ на их основе.

Тепловое действие заключается в повышении температуры облучаемых тканей, что и определяет возникающую патологию. Различные биологические ткани по-разному поглощают энергию ЭМИ СВЧ-диапазона: излучение миллиметрового диапазона поглощается поверхностными слоями кожи; сантиметрового диапазона – кожей и прилегающими к ней тканями; дециметровые проникают на глубину 10-15 см. Для более длинных волн ткани тела человека являются хорошо проводящей средой. Наиболее сильно поглощают энергию и нагреваются ткани и органы, которые содержат много воды – хрусталик и стекловидное тело глаза, полые органы (мочевой и желчный пузыри, желудок, кишечник), гонады, паренхиматозные органы. Это обусловлено тем, что вода является хорошим поглотителем энергии ЭМИ в микроволновом диапазоне [2]. Возникающие в тканях изменения связаны с денатурацией белка и изменением хода биохимических реакций (катаракты, некроспермия и атрофия сперматогенного эпителия, желудочные кровотечения и др.).

Специфическое энергоинформационное действие ЭМИ СВЧ-диапазона очень сложно обнаружить и исследовать прямыми методами, так как оно сводится к тончайшим изменениям в организме и проявляется лишь косвенно. Нетепловое действие радиоволн предположительно можно объяснить следующими механизмами:

- индуцированием под действием излучения в клеточных элементах электрических зарядов, которые вызывают ориентацию частиц, изменение структуры и функции тканей;

- перемещением ионов в электролитической среде клеток перпендикулярно магнитным силовым линиям, в результате чего нарушаются химический состав и электрическое равновесие тканей;

- поляризацией боковых цепей макромолекул тканей и ориентацией их параллельно электрическим силовым линиям, приводящей к разрыву межмолекулярных связей, к коагуляции молекул и изменению их свойств;

- резонансным поглощением энергии ЭМИ белковыми молекулами при совпадении характеристических частот молекул и частоты СВЧ-излучения.

Перечисленные возможные механизмы показывают, что взаимодействие ЭМИ с биологическими объектами имеет сложный характер и тем сложнее, чем выше организация биообъекта.

Для защиты от СВЧ-излучения существует широкая номенклатура РПМ и ЭМЭ. Среди них определенную нишу занимают материалы на основе композиционных термопластов [3, 4]. Разработаны и изготовлены листовые и профильные монолитные широкополосные радиопоглотители на основе композиций термопластов с дисперсными функциональными наполнителями, которые обеспечивают высокий уровень магнитных, диэлектрических и джоулевых потерь при взаимодействии с СВЧ-излучением. Сформированы радиопоглощающие слоистые пластики, армированные электропроводящими тканями, а также полимерные композиционные РПМ, наполненные волокнами и/или стеклосферами. Замена части полимерного связующего стеклосферами и армирование композиционного РПМ углеродной тканью улучшает параметры ослабления энергии ЭМИ. Это объясняется, во-первых, увеличением общего количества функциональных наполнителей, обеспечивающих магнитные, диэлектрические и джоулевы потери падающего на композит СВЧ-излучения (при соблюдении оптимизированной по критерию минимального отражения электромагнитной волны степени наполнения); во-вторых, сочетанием разных механизмов потерь и улучшением условий рассеяния ЭМИ на структурных неоднородностях композита. Введение в полимерную композицию углеродных или металлических волокон разной длины и диаметра позволяет расширить полосу и увеличить коэффициент поглощения РПМ.

В работах [5, 6] исследовано взаимодействие ЭМИ СВЧ-диапазона с биологическими объектами и показаны возможности использования биомассы в качестве компонента поглотителей энергии ЭМИ. Перспективным является использование экранирующих ЭМИ материалов, содержащих воду или водные растворы органических и неорганических соединений (соли, глицерин, спирты и т.п.) [7].

РПМ на основе композиционных термопластов и ЭМЭ являются эффективным способом защиты биологических объектов, радио- и электронного оборудования, военных и гражданских объектов от негативного действия СВЧ-излучения, обеспечивают требования электромагнитной безопасности и электромагнитной экологии.

### Литература

1. Электромагнитная безопасность человека. Справочно-информационное издание / Ю.Г. Григорьев, В.С. Степанов, О.А. Григорьев, А.В. Меркулов – М.: Российский национальный комитет по защите от неионизирующего излучения, 1999. –152 с.

2. Ломач В.А., Пинчук Л.С., Гольдаде В.А., Банный В.А. Эффективность несвязанной воды как радиопоглощающего компонента электромагнитных экранов при отрицательных температурах // Материалы, технологии, инструменты. – 2011. – № 4. – С. 41-44.
3. Алексеев А.Г., Гусева О.М., Семичев В.С. Композиционные ферромагнетики и электромагнитная безопасность. – СПб: НИИХ СПбГУ, 1998. – 296 с.
4. Макаревич А.В., Банный В.А. Радиопоглощающие полимерные композиционные материалы в технике СВЧ // Материалы, технологии, инструменты. – 1999. – Т. 4, № 3. – С. 24-32.
5. Банный В.А., Макаревич А.В., Орехов Д.А. Взаимодействие СВЧ-излучения нетепловой интенсивности с культурой дрожжевых клеток // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2002. – № 5-6. – С. 102-105.
6. Ермолович О.А., Банный В.А., Макаревич А.В. Хитин как функциональный наполнитель композиционных полимерных материалов // Материалы, технологии, инструменты. – 2005. – Т. 10, №. 2. – С. 58-60.
7. Пинчук Л.С., Гольдаде В.А. Радиопоглощающие материалы на основе криогелей поливинилового спирта // Доклады НАН Беларуси. – 2013. – Т. 57. – № 4. – С. 114–118.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРОВ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ КРОВИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ СПЕКТРАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ 2 МКМ**

**Батай Л.Е., Ходасевич И.А.**

*Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь,  
l.batay@ifanbel.bas-net.by*

Лазеры, излучающие в спектральной области 2 мкм (тулиевые и гольмиевые), где расположен один из интенсивных максимумов поглощения воды, рассматриваются с точки зрения биомедицины как излучатели хирургического назначения. Вместе с тем, как показано ранее в наших работах (например, [1, 2]), низкоинтенсивное излучение тулиевого лазера, несмотря на то, что поглощается на глубине до 50-100 мкм, обладает выраженным регуляторным действием на уровне организма.

Оно оказывает влияние на активность ферментов углеводно-энергетического обмена, обладает иммуномодулирующим действием, изменяя содержание  $\alpha_2$ -макроглобулина в сыворотке крови и тканях иммунокомпетентных органов, оказывает противовоспалительное действие, проявляющееся в изменении продукции первичных медиаторов воспаления интерлейкинов ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6. Таким образом, взаимодействие низкоинтенсивного излучения спектральной области 2 мкм с водой, являющейся универсальным хромофором, присутствующим в живых организмах, может приводить к сложным системным эффектам на уровне регуляции функций организма. Исследования в данном направлении пока крайне малочисленны, однако, представляют большой интерес, т.к. инструментарий лазерной терапии может быть дополнен новыми излучателями.

Целью данной работы являлось исследование спектров комбинационного рассеяния крови после воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения спектральной области 2 мкм.

В качестве излучателя использовался непрерывный диодно-накачиваемый тулиевый лазер. Максимум спектра излучения лазера соответствовал длине волны 1,96 мкм при ширине спектра  $\sim 10$  нм.

Исследования были проведены на модели индуцированного канцерогенеза на мышах-самцах, распределенных по пяти экспериментальным группам (10-12 животных в группе). Первую группу (контрольную) составили интактные особи. Мышам второй – пятой групп подкожно в области спины прививали по 6 млн. клеток штамма асцитной карциномы Эрлиха. В третьей – пятой группах дополнительно осуществлялось воздействие на опухолевый процесс. Так, животным третьей группы в качестве противоопухолевого цитостатического препарата вводили циклоцитидин (четырекратно, в дозе 10 мг/мышь). Животные четвертой группы получали курс ежедневного лазерного облучения, состоявшего из 7 процедур. Облучалась область роста опухоли, время экспозиции – 2 мин при мощности лазера 20 мВт (плотность мощности  $\sim 20$  мВт/см<sup>2</sup>). В пятой группе осуществлялось сочетанное воздействие лазерного облучения и циклоцитидина. Забор крови у животных производился на следующий день после окончания курса облучения.

Возбуждение спектров КР производилось с помощью непрерывного гелий-кадмиевого лазера с длиной волны 441,6 нм. Регистрация спектров КР осуществлялась в диапазоне частотных сдвигов 700–2000 см<sup>-1</sup> на монохроматоре-спектрографе Solar ТП модели MS3504i с CCD-камерой СПЕС-10:256Е. Спектры прописывались в течение 2 с. Для улучшения соотношения сигнал/шум использовалось 30 накоплений спектра. После

оцифровки спектров производилась их обработка с помощью программы PeakFit v.4.12. Обработка включала в себя аппроксимацию фона соответствующей аналитической функцией, вычитание фона, определение значений интенсивностей анализируемых линий и их нормирование путем отнесения интенсивностей линий к интенсивности наиболее выраженной линии спектра КР крови, соответствующей частотному сдвигу  $1375 \text{ см}^{-1}$ . Статистический анализ производился с использованием программы Origin 7.5. Различия между экспериментальными группами считались достоверными при уровне значимости  $p=0,05$  и менее.

Анализ спектров проводился по наиболее интенсивным линиям спектра КР, которым соответствуют характеристические частоты  $\sim 1130$ ,  $\sim 1170$ ,  $\sim 1227$ ,  $\sim 1375$ ,  $\sim 1430$ ,  $\sim 1505$ ,  $\sim 1583$ ,  $\sim 1620 \text{ см}^{-1}$ . Данные частотные сдвиги очень хорошо коррелируют с линиями, наблюдавшимися в КР спектрах оксигенированных и дезоксигенированных эритроцитов [3]. А именно: полосы  $1130$ ,  $1227$ ,  $1375$ ,  $1430$ ,  $1505$ ,  $1583 \text{ см}^{-1}$  можно отнести к колебаниям в молекуле оксигемоглобина. Полоса  $1620 \text{ см}^{-1}$  относится к колебаниям в молекуле дезоксигемоглобина. Линию  $1170 \text{ см}^{-1}$  сложно однозначно отнести к оксигемоглобину или дезоксигемоглобину, т.к. по данным [3] сходные полосы наблюдались как в спектре оксигенированных ( $1173 \text{ см}^{-1}$ ), так и дезоксигенированных эритроцитов ( $1172 \text{ см}^{-1}$ ).

Показано, что развитие опухолевого процесса (группа 2) не приводило к достоверному изменению относительных интенсивностей анализируемых линий спектра КР крови относительно группы интактных животных. Хотя в целом наблюдалась тенденция к повышению относительных интенсивностей всех анализируемых линий. Достоверные изменения относительных интенсивностей линий в экспериментальных группах 3 - 5 были обнаружены в полосах  $\sim 1130 \text{ см}^{-1}$  и  $\sim 1430 \text{ см}^{-1}$ . Так, в полосе  $\sim 1130 \text{ см}^{-1}$ , связанной с колебаниями в молекуле оксигемоглобина, наблюдались достоверные отличия между группами 1 и 4 ( $p_{14}<0,01$ ), 1 и 5 ( $p_{15}<0,01$ ), 2 и 4 ( $p_{24}<0,05$ ), 2 и 5 ( $p_{25}<0,05$ ). Наблюдалось достоверное увеличение интенсивности данной линии спектра КР как при лазерном облучении (группа 4), так и при лазерном облучении на фоне введения циклоцитидина (группа 5). При этом различий между группами 4 и 5 не обнаружено. Это позволяет сделать вывод о том, что увеличение относительной интенсивности линии  $\sim 1130 \text{ см}^{-1}$  в группах 4 и 5 связано только с воздействием лазерного излучения с длиной волны  $\sim 2,0 \text{ мкм}$ . Эффект противоположной направленности наблюдался в полосе  $\sim 1430 \text{ см}^{-1}$ , также связанной с колебаниями в молекуле оксигемоглобина. Как при лазерном облучении (группа 4), так и при лазерном облучении на фоне

введения циклоцитидина (группа 5) наблюдалось достоверное ( $p_{14} < 0,05$ ;  $p_{24} < 0,05$ ;  $p_{15} < 0,01$ ;  $p_{25} < 0,01$ ) снижение относительной интенсивности линии  $\sim 1430 \text{ см}^{-1}$  по отношению к группам как интактных животных, так и животных с карциномой, что свидетельствует о модификациях в молекуле оксигемоглобина.

Таким образом, влияние облучения животных низкоинтенсивным излучением тулиевого лазера с длиной волны, совпадающей с интенсивным спектральным максимумом поглощения воды, достоверно проявлялось в спектрах комбинационного рассеяния крови. Результаты свидетельствуют о модификациях молекулы оксигемоглобина, вызванных прямым возбуждением молекул воды излучением с длиной волны 2 мкм.

### Литература

1. Батай Л.Е., Водчиц А.И., Орлович В.А. и др. Лазеры, излучающие в спектральной области 2 мкм, и их биомедицинские применения // *ARS Medica*. - 2012. - № 3 (58). – С. 35–48.
2. Горбунова Н.Б., Улащик В.С., Батай Л.Е. и др. Влияние непрерывного низкоинтенсивного инфракрасного лазерного излучения (1,6 мкм и 2 мкм) на уровень ингибиторов протеаз в сыворотке крови при экспериментальном системном воспалении // *Материалы XXXX Международной научно-практической конференции "Применение лазеров в медицине и биологии"*, Ялта, 2-5 октября 2013 г. - С. 124–127.
3. Wood, B.R. Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells in vivo / B.R. Wood, D. McNaughton // *J. Raman Spectrosc.* – 2002. – Vol. 33. – P. 517–523.

### **ВЛИЯНИЕ УФ-СВЕТА НА АКТИВНОСТЬ ГЕКСОКИНАЗЫ И ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЛИМФОЦИТОВ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ**

**Башарина О.В., Коробкина И.А., Спахова Я.Г., Зеленецкая М.Г.,  
Артюхов В.Г.**

*Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия*

В настоящее время широкое распространение в медицине получил метод аутоотрансфузии УФ-облученной крови (АУФОК), его применение приводит к улучшению иммунологического статуса организма, что мо-

жет быть следствием структурно-функциональных изменений иммунокомпетентных клеток. Этот метод используется в терапии ряда воспалительных заболеваний, в том числе для лечения больных острым панкреатитом. Однако до настоящего времени остаются малоизученными многие аспекты физико-химических механизмов лечебного эффекта фото-модифицированной крови.

УФ-свет как модулятор функциональной активности лимфоцитов приводит к изменению метаболизма клеток. Важными метаболическими путями в клетке являются гликолиз и пентозофосфатный путь (ПФП).

В УФ-модифицированных лимфоцитах активируется синтез ряда важных ферментов (СОД, СДГ, цитохром *c* оксидаза, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2) [1, 2] и клеточных рецепторов [3]. Для более полного понимания изменений метаболических путей в УФ-облученных лимфоцитах необходимо изучить более подробно процесс гликолиза, в частности, функционирование гексокиназы (ГК) – ключевого фермента данного процесса. Под действием ГК образуется глюкозо-6-фосфат, необходимый для начала функционирования ПФП. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) – цитозольный ключевой фермент пентозофосфатного пути (ПФП).

Материалы и методы. Объектом исследования явились лимфоцитарные клетки крови доноров и больных острым панкреатитом. УФ-облучение суспензии лимфоцитов (1 мл,  $1 \cdot 10^6$  клеток/мл) проводили в термостатируемой ( $20 \pm 1$  °С) кювете светом лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 (240-390 нм). Интенсивность излучения – 151 Дж/(м<sup>2</sup>·мин), доза облучения – 755 Дж/м<sup>2</sup>. Лимфоциты инкубировали в питательной среде RPMI-1640 в присутствии гентамицина и в отсутствие или в присутствии циклогексимида (блокатора синтеза белка) при 37 °С ([CO<sub>2</sub>]=5 %) в течение 24 ч. Для определения активности ферментов клетки лизировали путем гипосмотического шока. Об активности Г6ФДГ судили по скорости восстановления НАДФ. Активность гексокиназы определяли энзиматическим методом, в качестве сопрягающего фермента добавляли Г6ФДГ и НАДФ. Исследуемые реакции регистрировали по увеличению оптической плотности при 340 нм. Измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 PC.

Результаты и их обсуждение. Показано, что в ходе суточной инкубации активность гексокиназы лимфоцитов здоровых доноров повышается, причем это повышение более выражено в УФ-облученных лимфоцитах (рисунок). Уровень активности гексокиназы в лимфоцитах, инкубированных в течение 24 часов в отсутствие и в присутствии циклогексимида, статистически значимо не отличается, и, следовательно, повы-

шение активности фермента не связано с изменением синтеза данного белка.

Активность гексокиназы в лимфоцитах больных ОП значительно выше, чем у здоровых доноров; а активность Г6ФДГ находится в пределах нормальных значений; это указывает на повышение потребления глюкозы активированными лимфоцитами больных.

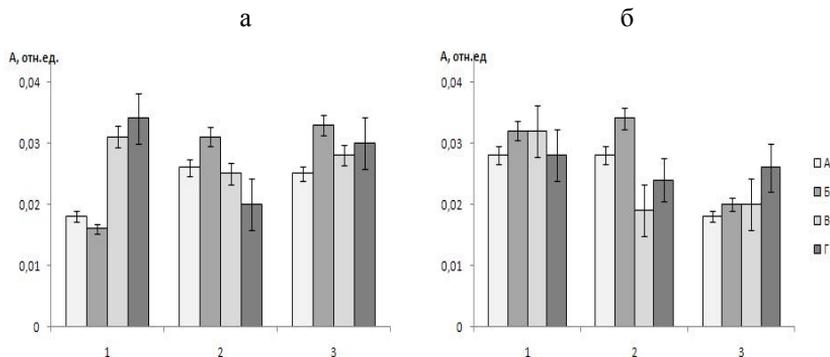


Рисунок – Влияние УФ-света на активность (А, отн. ед.): а – гексокиназы и б – Г6ФДГ лимфоцитов. Обозначения: 1 – лимфоциты без инкубации; 2 – клетки через 24 часа инкубации; 3 – инкубация в присутствии циклогексимида; А и В – необлученные, Б и Г – фотомодифицированные ( $755 \text{ Дж/м}^2$ ) лимфоциты; первые два столбца (А и Б) в каждой группе – лимфоциты здоровых доноров, два последних (В и Г) – больных ОП

В ходе суточной инкубации УФ-облученных клеток здоровых доноров активность Г6ФДГ увеличивается (см. рисунок б). При этом, как следует из экспериментов с циклогексимидом, активация Г6ФДГ, в отличие от гексокиназы, обусловлена усилением синтеза данного белка.

Динамика изменения активности как гексокиназы (и, следовательно, интенсивности гликолиза), так и Г6ФДГ, в ходе суточной инкубации клеток здоровых доноров и больных ОП имеет разнонаправленный характер.

Таким образом, учитывая высокую информативность метаболических показателей для характеристики функционального состояния лимфоцитов, а также высокую чувствительность клеток иммунной системы к воздействию различных факторов, исследование иммунного статуса и метаболизма лимфоцитов позволяет выявить, наряду с характерными чертами внутриклеточного обмена веществ,

особенности реагирования иммунной системы здоровых людей и больных с деструктивно-воспалительными заболеваниями в условиях воздействия УФ-излучения на организм человека.

### **Литература**

1. Особенности метаболизма УФ-облученных лимфоцитов / В.Г. Артюхов [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51, № 2. – С. 252-257.
2. Артюхов, В.Г. Влияние УФ-света на синтез некоторых белков лимфоцитами / В.Г. Артюхов, О.В. Башарина, И.Е. Савостина // Иммунология. – М., 2011. – Т. 30, № 3. – С. 152-154.
3. Влияние УФ-света на субпопуляционный состав и экспрессию мембранных маркеров лимфоцитов крови человека / В.Г. Артюхов [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2016. – Т. 56, № 1. – С. 73-80.

### **АКТИВНОСТЬ КАСПАЗЫ-3 И ЭКСПОНИРОВАНИЕ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА В ЭРИТРОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ С АНЕМИЧЕСКИМИ СОСТОЯНИЯМИ**

**Белевич Е.И.<sup>1</sup>, Костин Д.Г.<sup>1</sup>, Рачкова Т.А.<sup>2</sup>, Костин Г.М.<sup>2</sup>,  
Слобожанина Е.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,  
Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*УЗ «Минский консультационно-диагностический центр»,  
Минск, Беларусь*

Наиболее часто встречающейся формой анемических состояний является железодефицитная анемия (ЖДА), обусловленная недостатком железа в организме [1]. Второе место по распространенности занимает анемия хронического заболевания (АХЗ), развивающаяся на фоне широкого спектра болезней [1, 2]. К причинам развития ЖДА и АХЗ относят снижение эритропоэза [2, 3], формирование «дефектных» эритроцитов с недостаточным содержанием гемоглобина, а также уменьшение продолжительности их жизни [1, 3]. До сих пор считается, что механизмом гибели таких «дефектных» клеток является внесосудистый гемолиз [2]. В то же время уменьшение продолжительности жизни эритроцитов может быть связано с запуском запрограммированной гибели – эриптозом. Из-

вестно, что повышенный эритроцитоз наблюдается при ряде соматических, инфекционных и наследственных заболеваний [4]. Одним из последствий анемии является гипоксия тканей, возникающая в результате недостаточного снабжения их кислородом, что, в свою очередь, вызывает окислительный стресс. Ранее нами установлено, что окислительный стресс в эритроцитах *in vitro* сопровождается активацией каспазы-3 [5]. Происходит ли увеличение активности каспазы-3 в эритроцитах *in vivo* – пациентов с анемическими состояниями не известно. В работе [6] на образцах крови пациентов с хроническим заболеванием почек, сопровождающимся анемией, показано только увеличение числа эритроцитов, экспонирующих фосфатидилсерин (ФС) на своей поверхности. Дефицит железа в рационе мышей так же приводил к увеличению числа эритрозных клеток [3], что авторы объясняют только запуском кальций-зависимого механизма эритроцитоза [3].

Цель данной работы – оценить возможный вклад активированной каспазы-3 в развитие процесса эритроцитоза при ЖДА и АХЗ.

В работе использованы образцы крови здоровых доноров (ЗД), полученные из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий МЗ РБ, а также образцы крови пациентов с ЖДА и АХЗ, предоставленные УЗ «Минский консультационно-диагностический центр». Эритроциты получали из крови путем центрифугирования и трижды отмывали в 155 мМ NaCl (4 °С, 3000 об/мин). Клетки с экспонированным ФС определяли по интенсивности флуоресценции FITC-меченного аннексин-V. Активность каспазы-3 определяли с помощью набора CaspGlow, содержащего специфический флуорогенный субстрат каспазы-3 – FITC-DEVD-fmk. Флуоресцентные измерения выполнены на проточном цитофлуориметре BD FACScanto II (Becton Dickinson США). Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием критериев Манна–Уитни и Уилкоксона. В работе представлены средние значения 6–12 независимых экспериментов. Различия считали статистически достоверными при  $p < 0,05$  (\*) и  $p < 0,01$  (\*\*).

На рисунке 1 А представлены данные об экспонировании ФС на поверхности эритроцитов в исследованных образцах. Из рисунка видно, что как в популяции эритроцитов ЗД, так и пациентов с анемиями присутствуют клетки, экспонирующие ФС. В то же время количество таких эритроцитов в образцах крови пациентов с анемиями было выше, чем у ЗД и составило для ЖДА и АХЗ –  $(7,1 \pm 1,5)$  % и  $(5,2 \pm 0,7)$  %, соответственно, тогда как для ЗД –  $(1,9 \pm 0,2)$  %, что свидетельствует о повышенном эритроцитозе у пациентов с анемическими состояниями. Однако значимых различий по интенсивности флуоресценции FITC-меченного аннексин-V

син-V между экспонирующими ФС эритроцитами ЗД и пациентов с анемиями обнаружено не было (рисунок 1А).

Из рисунка 1Б видно, что в образцах крови всех трех обследованных групп присутствуют эритроциты с активной каспазой-3. Однако количество клеток с активированной каспазой-3 было выше в группах пациентов с анемиями. Так, у ЗД число клеток с активированной каспазой-3 составляло  $(0,3 \pm 0,1) \%$ , в то время как в группе пациентов с ЖДА –  $(1,3 \pm 0,3) \%$ , а у пациентов с АХЗ было обнаружено  $(0,8 \pm 0,2) \%$  каспазоположительных клеток. Стоит отметить, что интенсивность флуоресценции субстрата FITC-DEVD-fmk имела близкие значения в каспазоположительных клетках как ЗД, так и пациентов с анемиями.

Таким образом, из полученных результатов следует, что в популяции эритроцитов крови пациентов с анемическими состояниями (ЖДА и АХЗ) наблюдается увеличение числа эритроцитов, в которых запрограммированная гибель развивается по каспазо-зависимому пути.

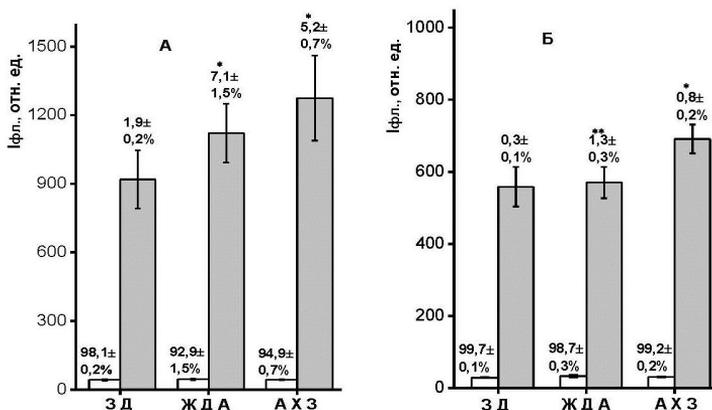


Рисунок 1 – Экспонирование ФС (Iфл. FITC-меченного аннексин-V, отн. ед.) и количество клеток (в %) с экспонированным ФС (А), а также активность каспазы-3 (Iфл. FITC-DEVD-fmk, отн. ед.) и количество клеток (в %) с активированной каспазой-3 (Б) в популяции эритроцитов ЗД, пациентов с ЖДА и АХЗ

### Литература

1. Козарезова, Т.И. Анемический синдром в практике педиатра: учеб.-метод. пособие / Т.И. Козарезова, Н.Н. Климович; БелМАПО. – Минск, 2007 – 226 с.

2. Гончарик, И.И. Анемия хронических заболеваний / И.И. Гончарик, Т.В. Малая // Военная медицина – 2013. – № 3. – С. 152–154.
3. Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes / D.S. Kempe [et al.] // FASEB J. – 2006. – Vol. 20, № 2. – P. 368–370.
4. Белевич, Е.И. Эриптоз – запрограммированная гибель эритроцитов / Е.И. Белевич, Д.Г. Костин, Е.И. Слобожанина // Успехи современ. биол. – 2014. – Т. 134, № 2. – С. 149–157.
5. Белевич, Е.И. Окислительный стресс в эритроцитах человека и активация каспазы-3 / Е.И. Белевич, Д.Г. Костин, Е.И. Слобожанина // Сборник тезисов докладов междунар. науч. конференции “Свободные радикалы в химии и жизни” Минск, 25-26 июня 2015 г. – 2015. – С. 51-53.
6. Uremic toxicity-induced eryptosis and monocyte modulation: the erythrophagocytosis as a novel pathway to renal anemia / N.B. Bonan [et al.] // Blood Purif. – 2016. – Vol. 41, № 4. – P. 317–323.

## **ВЛИЯНИЕ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ ИЗ ЛИЗОЦИМА НА ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА**

**Венская Е.И., Скоробогатова А.С., Лукьяненко Л.М.**

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,  
Минск, Беларусь*

Амилоиды – это нерастворимые белковые фибриллы, которые образуются при нарушении процесса фолдинга и накапливаются в органах человека при различных патологиях [1].

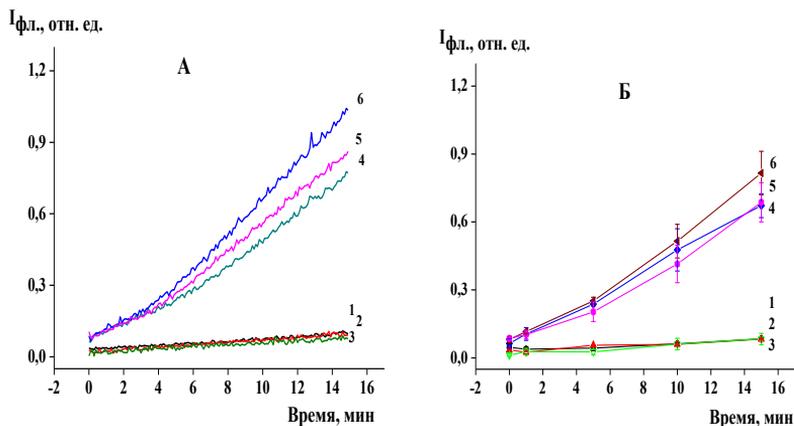
Цель данной работы – изучить влияние амилоидных фибрилл из лизоцима на процесс генерации активных форм кислорода (АФК) в лимфоцитах человека.

Материалы и методы. Амилоидные фибриллы получали из лизоцима куриного яйца (Fluka) [2]. Контроль за образованием фибрилл осуществляли спектрофлуориметрическим методом с использованием зонда тиофлавина Т (Sigma). Донорскую кровь получали в РНПЦ «Трансфузиологии и медицинских биотехнологий» МЗРБ. Лимфоциты выделяли из периферической крови практически здоровых доноров в градиенте плотности гистобака (Sigma). Уровень АФК регистрировали флуоресцентным методом с помощью зонда 5-(6)-хлорметил-2',7'-

дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) [3] и методом люминолзависимой хемилюминесценции [4].

Результаты. Известно, что зонд CM-H<sub>2</sub>DCFDA свободно проникает через клеточные мембраны и гидролизуется в клетке эстеразами до неактивной формы DCFH, которая, в свою очередь, окисляется в присутствии внутриклеточных АФК и флуоресцирует. Измеряя кинетику флуоресценции данного зонда, можно изучать общий уровень окислительного статуса живой клетки [3].

В нашей работе для стимуляции окислительных процессов в клетке использовали трет-бутил гидроперекись (tBHP) в конечной концентрации 1мМ. Было показано, что амилоидные фибриллы и лизоцим при кратковременном воздействии не оказывают влияния на генерацию АФК в лимфоцитах человека, но при этом могут усиливать окислительный стресс клеток в присутствии tBHP (рисунок 1).



1 – контроль; 2 – лимфоциты + 20 мкг/мл лизоцима; 3 – лимфоциты + 20 мкг/мл амилоидов; 4 – лимфоциты + 1 мМ tBHP; 5 – лимфоциты + 20 мкг/мл амилоидов + 1 мМ tBHP; 6 – лимфоциты + 20 мкг/мл лизоцима + 1 мМ tBHP.

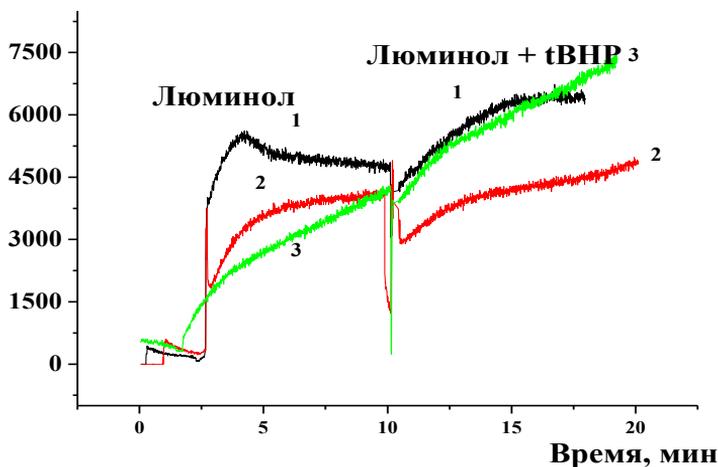
Рисунок 1 – А – Типичная кинетика флуоресценции DCF в лимфоцитах человека, обработанных лизоцимом куриного яйца; амилоидными фибриллами, полученными из лизоцима; и tBHP; Б – Кинетика флуоресценции DCF в лимфоцитах человека, обработанных лизоцимом куриного яйца; амилоидными фибриллами, полученными из лизоцима; и tBHP

Показано, что амилоидные фибриллы, полученные из лизоцима, также как и лизоцим, при краткосрочном воздействии не оказывают влияния на уровень образования свободных радикалов в лимфоцитах, по сравнению с контролем (рисунок 2). Это согласуется с данными, полученными ранее в нашей лаборатории на эритроцитах человека [5].

Таким образом, можно предположить, что механизм краткосрочного токсического воздействия амилоидных фибрилл на клетки не включает в себя изменение уровня АФК в клетках, однако амилоидные фибриллы способны усиливать окислительный стресс, вызванный другими окислителями (tBHP).

Из литературных данных известно, что при развитии амилоидозов *in vivo* наблюдается усиление окислительного стресса. В ряде случаев это связывают с присутствием и накоплением в очагах отложения амилоидов ионов металлов [6]. Можно предположить, что ионы металлов вызывают окислительный стресс, а амилоидные фибриллы усиливают его.

**Интенсивность люминесценции, отн. ед.**



1 – контроль; 2 – лимфоциты + 20 мкг/мл лизоцима; 3 – лимфоциты + 20 мкг/мл амилоидов.

Рисунок 2 – Изменение люминолзависимой хемилюминесценции в лимфоцитах человека при воздействии на клетки амилоидных структур из лизоцима

## Литература

1. Chiti, F. Protein missfolding, functional amyloid, and human disease / F. Chiti, C. Dobson // *Annu Rev Biochem.* – 2006. – Vol. 75. – P. 333-366.
2. Chaudhary, N. Hen lysozyme amyloid fibrils induce aggregation of erythrocytes and lipid vesicles / N. Chaudhary, R. Nagaraj // *Mol Cell Biochem.* – 2009. – Vol. 328. – P. 209-215.
3. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry / A.Wojtala [et al.] // *Methods in enzymology.* – 2014. – P. 243-245.
4. Коваленко, Е.И. Влияние пероксида водорода на способность нейтрофилов генерировать активные формы кислорода и хлора и секретировать миелопероксидазу *in vitro* / Е.И. Коваленко, Г.Н. Семенова, С.Н. Черенкевич // *Цитология.* – 2009. – Т. 49, № 10. – С. 839-847.
5. Влияние амилоидов на физико-химическое состояние липидного бислоя мембран эритроцитов / Л.М. Лукьяненко [и др.] // *Новости медико-биологических наук.* – 2013. – Т. 7, № 1. – С. 9-13.
6. Amyloidosis, Inflammation, and Oxidative Stress in the Heart of an Alkaptonuric Patient / L. Millucci [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2014. – P. 258471.

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ МАГНИТНОГО ПОЛЯ И ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АРТРИТЕ

**Войченко Н.В.<sup>1</sup>, Улащик В.С.<sup>2</sup>, Волотовская А.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусская медицинская академия последипломного образования,  
Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Перспективным направлением физиотерапии, в том числе и в лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата, является применение сочетанных физиотерапевтических методов, в частности, фотоманнитотерапии [1]. Для разработки дифференцированных методик применения фотоманнитотерапии в ревматологии актуальны экспериментальные и клинические исследования, направленные на сравнительное изучение влияния магнитного поля, света и их сочетания [2].

Цель нашего исследования – оценить влияние низкоинтенсивного импульсного магнитного поля (НИМП), света различной длины волны и их сочетания на лабораторные показатели крови крыс при экспериментальном артрите.

Материалы и методы. Объектом исследования были белые лабораторные крысы-самцы (110 особей) со средней массой  $180 \pm 15$  г. Животные были разделены на 11 групп. 1-ую группу составили 10 здоровых животных, которым не проводили моделирование артрита. Животным 2-й – 11-й групп индуцировали зимозановый артрит путем введения 0,2 мл 1,5 %-ного раствора зимозана в голенопредплюсневый сустав задней лапы животного [3]. При этом во 2-ой группе воздействие лечебными физическими факторами не проводили. Животным 3-й – 11-й групп с 4-го дня развития экспериментального артрита проводили физиотерапевтические воздействия на область пораженного сустава с параметрами, представленными в таблице 1. Для проведения физиотерапевтических процедур использовали аппарат «ФотоСПОК» (ОДО «Магномед», РБ). Длительность воздействия составляла 15 мин. Процедуры проводили 1 раз в день в течение 10 дней.

Эксперимент завершали на 16-е сутки. У животных в динамике определяли СОЭ, С-реактивный белок (СРБ), циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) и активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови [4, 5].

Таблица 1 – Параметры физических факторов в группах лабораторных животных

Номер группы	Артрит	НИМП, мТл	Инфра-красный свет, мВт	Красный свет, мВт	Желтый свет, мВт	Синий свет, мВт
1	–	–	–	–	–	–
2	+	–	–	–	–	–
3	+	25	–	–	–	–
4	+	–	4,5	–	–	–
5	+	–	–	2,0	–	–
6	+	–	–	–	1,0	–
7	+	–	–	–	–	1,5
8	+	25	4,5	–	–	–
9	+	25	–	2,0	–	–
10	+	25	–	–	1,0	–
11	+	25	–	–	–	1,5

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6. Результаты измерений показателей представлены средним и стандартным отклонением. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Результаты и их обсуждение. У всех животных 2-й – 11-й групп на 4-й день после введения зимозана в голенопредплюсневый сустав развивался артрит. Наблюдался выраженный отек сустава, распространяющийся на стопу, деформация сустава, ограничение движения в нем. На четвертые сутки после развития воспалительных изменений в суставе у животных были повышены как показатели острой фазы воспаления (СОЭ, СРБ), так и ЩФ, оксипролин и ЦИК.

На 16-е сутки у животных, не получавших воздействия физическими факторами, воспалительная активность сохранялась. У животных, получивших воздействие НИМП и светом различного диапазона как в виде монотерапии, так и в сочетанном варианте, отмечена положительная динамика лабораторных показателей к концу эксперимента (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты лабораторного обследования экспериментальных животных

Группа	СОЭ, мм/час	ЦИК, усл.ед.	ЩФ, ммоль/ч·л	СРБ, мг/мл	Свободный оксипролин, мкмоль/л
1	2,86±0,17	23,70±2,83	10,30±1,45	1,30±0,24	16,40±1,07
2	6,38±0,53	60,30±6,45	17,66±1,10	34,90±3,60	34,30±1,73
3	4,60±0,52*	42,60±2,95*	15,10±0,62*	21,22±2,90*	24,30±0,98*
4	4,35±0,40*	47,20±4,10*	15,38±0,43*	23,45±2,36*	23,40±1,45*
5	4,45±0,37*	45,60±3,50*	14,46±0,53*	24,0±2,70*	26,0±1,20*
6	4,85±0,30*	51,50±3,21*	15,88±0,57*	30,40±0,89*	28,4±1,06*
7	5,63±0,16*	57,00±3,12	16,75±0,56	29,00±1,96*	30,20±1,45*
8	3,2±0,37*	28,60±3,03*	13,35±0,48*	6,10±1,99*	19,40±1,00*
9	3,48±0,32*	35,30±3,20*	12,19±0,83*	10,80±2,89*	18,40±0,88*
10	3,80±0,28*	44,00±3,94*	14,12±0,69*	15,20±2,64*	22,20±1,17*
11	4,52±0,25*	38,60±4,53*	15,00±0,72*	18,10±2,21*	24,20±0,93*

\* – различия статистически значимы (в сравнении с 2-ой группой) при  $p < 0,05$ .

Показано, что раздельное и сочетанное курсовое применение НИМП и света различного диапазона (за исключением нескольких вариантов светового воздействия) влияет на воспалительный процесс при экспериментальном артрите, вызывая снижение уровня СРБ, СОЭ, ЦИК, ЩФ и

оксипролина в крови лабораторных животных. При сочетании НИМП и света различного диапазона наблюдается возрастание лечебного эффекта.

Таким образом, выявлено, что наиболее значимое влияние на показатели воспалительного процесса при экспериментальном артрите оказывает сочетанное воздействие низкоинтенсивным импульсным магнитным полем и инфракрасным или красным светом, что позволяет рекомендовать данные варианты параметров физических факторов для применения в клинической практике при лечении заболеваний суставов воспалительной природы.

### **Литература**

1. Улащик, В.С. Физиотерапия. Новейшие методы и технологии / В.С. Улащик // Мн.: Книжный дом, 2013. – 448 с.
2. Волотовская, А.В. Магнитофототерапия: применение аппарата «ФотосПОК» в клинической медицине / А.В. Волотовская, В.С. Улащик, А.С. Плетнев // Мн., 2011. – 73 с.
3. Kannan, K. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human / K. Kannan, R.A. Ortman, D. Kimpel // Pathophysiology. – 2005. – Oct. 12 (3). – P. 167-181.
4. Камышников, В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник / В.С. Камышников // Мн.: Интерпрессервис, 2003. – Т. 2. – 463 с.
5. Лифшиц, В.М. Медицинские лабораторные анализы: справочник / В.М. Лифшиц, В.И. Сидельникова // М.: Триада-Х, 2011. – 304 с.

### **МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ДЕЙСТВИИ ХИНОНОВ**

**Вчерашняя А.В., Мартинович И.В., Мартинович Г.Г.,  
Шадыро О.И., Черенкевич С.Н.**

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

В последние годы активно проводятся исследования, направленные на разработку новых технологий противоопухолевой терапии, задачей которых является регуляция окислительно-восстановительных процессов

в клетках [1, 2]. Поскольку в качестве ключевых характеристик трансформированных тканей выделяют нарушения клеточного и тканевого редокс-гомеостаза, в таких технологиях предлагается использовать различные редокс-активные соединения, включая хиноны и их производные [2, 3]. Однако механизмы действия хинонов в биологических системах, определяющие их биологическую активность, включая противоопухолевую, остаются до конца не изученными.

В данной работе исследованы механизмы регуляции внутриклеточной продукции активных форм кислорода (АФК) и гибели опухолевых клеток при действии тимохинона (2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинона) и 1,4-бензохинона. Данные соединения, хотя и являются близкими по структуре, отличаются своими физико-химическими свойствами. Молекула тимохинона, также как и молекула 1,4-бензохинона, содержит две карбонильные группы в 1 и 4 положениях, но, в отличие от 1,4-бензохинона, в структуре тимохинона содержится также изопропильная и метильная группы, определяющие взаимодействие с гидрофобным окружением. Редокс-потенциал тимохинона значительно ниже, чем у 1,4-бензохинона.

В работе использовали клетки карциномы гортани человека линии НЕР-2. Оценку внутриклеточной продукции АФК проводили на основе анализа скорости окисления флуоресцентного зонда 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (СМ-Н<sub>2</sub>DCF) эндогенными окислителями. Интенсивность флуоресценции СМ-DCF, образующегося при окислении СМ-Н<sub>2</sub>DCF, измеряли с использованием спектрофлуориметра СМ 2203 («СОЛАР», Республика Беларусь).

Показано, что при добавлении в культуру 1,4-бензохинона и тимохинона наблюдалось дозозависимое угнетение роста клеток, причем тимохинон проявлял большую токсичность в отношении опухолевых клеток: величина концентрации 50 %-го ингибирования (IC<sub>50</sub>) роста клеток в культуре для тимохинона составила 8 мкМ, а IC<sub>50</sub> для 1,4-бензохинона – 25 мкМ (рис. 1 а). В процессе окисления зонда, индуцированного хинонами, можно выделить две стадии: на первой стадии наблюдается высокая скорость окисления СМ-Н<sub>2</sub>DCF, на второй – скорость окисления СМ-Н<sub>2</sub>DCF значительно ниже, чем на первой. Выход АФК при действии тимохинона, наблюдаемый на первой стадии, оказался значительно ниже, чем выход АФК при действии 1,4-бензохинона (рис. 1 б).

С другой стороны, при действии тимохинона на второй стадии редокс-отклика клеток наблюдалось снижение эндогенной продукции АФК в сравнении с контролем. При увеличении концентрации тимохинона снижение внутриклеточной продукции АФК, индуцируемое аген-

том, увеличивалась. Величина скорости окисления CM-H<sub>2</sub>DCF на второй стадии при действии 1,4-бензохинона не изменялась при увеличении концентрации агента и была сравнима с величиной скорости окисления CM-H<sub>2</sub>DCF в контроле. Выявленные отличия в редокс-отклике клеток на действие хинонов свидетельствуют об участии различных механизмов внутриклеточной продукции АФК, активируемых в клетках при действии агентов.

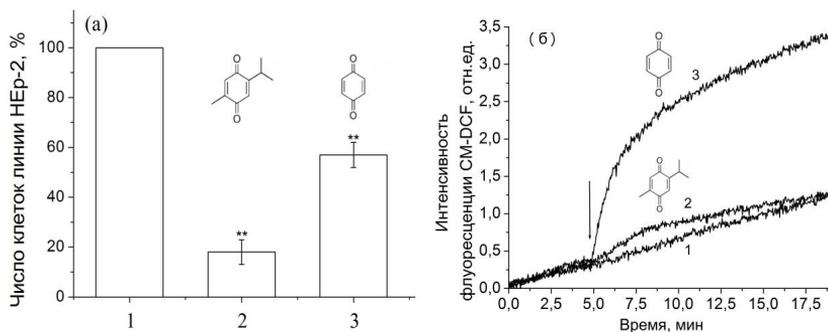


Рисунок 1 – Влияние хинонов на рост клеток (а) и продукцию внутриклеточных АФК (б): 1 – контроль, 2 – 20 мкМ тимохинона, 3 – 20 мкМ 1,4-бензохинона

Согласно полученным результатам при действии тимохинона усиливается продукция АФК в митохондриях, тогда как при действии 1,4-бензохинона – в цитозоле клеток. Показано, что ингибитор митохондриальных пор высокой проницаемости циклоспорин А полностью блокирует индуцированное тимохиноном снижение роста клеток агента (рисунок 2). При этом цитотоксическое действие 1,4-бензохинона не блокировалось циклоспорином А. С другой стороны, эксперименты, проведенные с использованием антиоксиданта L-цистеина, накапливающегося в цитозоле клеток, привели к противоположным результатам. При добавлении в культуру L-цистеина наблюдалось уменьшение токсического эффекта 1,4-бензохинона. Действие тимохинона L-цистеином не блокировалось (рисунок 2).

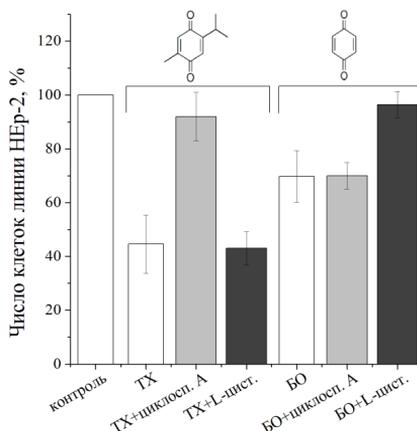


Рисунок 2 – Влияние тимохинона (8 мкМ TX) и 1,4-бензохинона (20 мкМ БО) на рост клеток в присутствии циклоспорина А (0,5 мкМ) и L-цистеина (1 мМ)

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что тимохинон активирует редокс-сигнальный механизм открытия пор высокой проводимости, в то время как механизм действия 1,4-бензохинона, вероятно, связан с развитием в клетках окислительного стресса.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке БРФФИ (грант №М15-019).

### Литература

1. Trachootham, D. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? / D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2009. – Vol. 8. – P. 579–591.
2. Редокс-биотехнологии как основа для новой стратегии в противоопухолевой терапии / Г.Г. Мартинович [и др.] // *Известия НАН Беларуси. Серия медицинских наук.* – 2012. – № 2. – С. 85–104.
3. Wondrak, G.T. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities / G.T. Wondrak // *Antioxid. Redox Signal.* – 2009. – Vol. 11. – P. 3013–3069.

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДОВ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ И ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДАМИ

Головач Т.Н., Тарун Е.И., Кравцова О.И., Курченко В.П.

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Введение. Биологически активные пептиды белков молока представляют особый интерес в нутрициологии, так как они обладают иммуномодулирующим, антиоксидантным, антимуtagenным, гипотензивным, противомикробным, противовирусным и др. действием [1]. Антиоксидантная активность (АОА) белков и пептидов обусловлена доступными растворителю аминокислотами (восстанавливающими свойствами аминокислотных радикалов). В составе идентифицированных пептидов с антирадикальными свойствами выявлены триптофан, тирозин, метионин и гистидин. Получение гидролизатов, содержащих специфические пептиды, обеспечивается проведением ферментативной реакции в оптимизированных условиях, особенностями субстратной и сайт-специфичности протеаз, физико-химическими свойствами расщепляемых белковых субстратов [2]. Актуальность исследований связана с получением ферментативных гидролизатов белков молока (казеина и сывороточных белков) с заданным пептидным профилем и биологическими активностями для продуктов функционального питания.

Цель работы – сравнительное исследование антиоксидантной активности пептидов сывороточных белков молока спектрофотометрическим и флуориметрическим методами.

Материалы и методы исследований. В исследовании использовали концентрат сывороточных белков молока, изготовленный методом ультрафильтрации (КСБ, ТУ ВУ 100377914.550–2008, исходный субстрат для получения гидролизатов) и опытный образец частичного ферментативного гидролизата сывороточных белков, полученный в НИЛ прикладных проблем биологии БГУ. В качестве образцов сравнения применяли частичные ферментативные гидролизаты сывороточных белков «PRODIET GF 006» (Ingredia, Франция), «Vital Armor H 801 LB» (Armor Protéines, Франция) и «Hilmar 8350» (Hilmar, США).

Для оценки АОА образцов гидролизатов применены спектрофотометрический и флуориметрический методы. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) – метод, основанный на измерении уменьшения ин-

тенсивности флуоресценции флуоресцеина (ФЛ), что наблюдается при его связывании с кислородными радикалами. Антиоксиданты (АО) в реакционной среде, взаимодействуя с радикалами, замедляют свободнорадикальное окисление ФЛ. Степень уменьшения флуоресценции – это мера степени деградации ФЛ под воздействием кислородных радикалов. Подход, использованный в работе, основан на определении АОА образцов по их способности связывать свободные радикалы, образованные в системе Фентона. В данной системе генерируются гидроксильные радикалы при взаимодействии комплекса Fe(II) и этилендиамина тетрауксусной кислоты с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Интерпретация получаемых данных осложняется одновременным присутствием нескольких активных форм кислорода (АФК) с различной реакционной способностью. Также не исключается прямое воздействие АО на компоненты системы генерирования АФК.

Вместе с тем, при измерении АВТС-радикал-восстанавливающей активности предполагается применение предварительно полученного катион-радикала на основе диаммониевой соли 2,2'-азино-бис[3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты]. АВТС<sup>++</sup> – метастабильный радикал, который может существовать в растворе продолжительное время; при внесении в среду различных антирадикальных агентов наблюдается быстрое восстановление радикала. Реакцию контролировали спектрофотометрически при  $\lambda_{734}$ : АВТС<sup>++</sup>-радикал (синее окрашивание раствора) при восстановлении преобразуется в свою бесцветную нейтральную форму. В данной системе присутствует один тип радикала и исключено влияние антиоксиданта на процесс его образования, поэтому осуществляется механизм прямого взаимодействия АО с радикалом.

Результаты и их обсуждение. Получены данные об АОА исходного субстрата для изготовления гидролизатов (КСБ), опытного образца гидролизата и зарубежных аналогов (таблица). Диапазон анализируемых концентраций белка составил 2–120 и 2–10 000 мкг/мл для спектрофотометрического и флуориметрического методов, соответственно. Определены величины IC<sub>50</sub>, или концентрации АО (мкг/мл), при которых в анализируемых системах связывается 50 % свободных радикалов.

Установлено возрастание АОА в результате ферментативного гидролиза сывороточных белков. Способность к восстановлению АВТС<sup>++</sup> при внесении опытного образца по сравнению с КСБ увеличилась в 3,2 раза. Наряду с этим, связывание свободных радикалов, образованных в системе Фентона, возросло в 2,3 раза. Согласно данным таблицы, с увеличением степени гидролиза сывороточных белков с 12,5 до 25 % наблюдается повышение антиоксидантного потенциала гидролизатов. По результатам сравнительного анализа гидролизатов, количество бел-

ковой фракции с  $mw < 10$  кДа в опытном образце на 11–15 % больше, чем в образцах «Vital Armor H 801 LB» и «Hilmar 8350». Образец «PRODIET GF 006» содержит 97 % фракции с  $mw < 5$  кДа и характеризуется высоким антиоксидантным потенциалом (таблица). Однако в гидролизатах «PRODIET GF 006» и «Hilmar 8350» обнаружен нативный бычий сывороточный альбумин, который обладает аллергенным потенциалом. Преимуществом опытного образца является расщепление всех белков-аллергенов молочной сыворотки, что является определяющим фактором при использовании гидролизатов в гипоаллергенных продуктах.

Таблица – Характеристика гидролизатов сывороточных белков молока

Наименование образца	Пептидный профиль	Степень гидролиза, %	IC <sub>50</sub> (ORAC)	IC <sub>50</sub> (ABTS <sup>++</sup> )
КСБ	–	–	1000	95,1
Опытный образец	≤10 кДа, 98 %	15,5	439,5	29,9
«Hilmar 8350»	<20 кДа, 83 % *	12,5*	887,6	29,5
«Vital Armor H 801 LB»	<10 кДа, 87 % *	16*	433,7	26,6
«PRODIET GF 006»	<5 кДа, 97 % *	20–25*	49,6	16,8

Примечание: \* – согласно данным производителей.

Применение обоих методов позволяет наиболее полно оценить АОА белков и пептидов как при действии на кислородные радикалы, образующиеся в системе Фентона, так и на предварительно полученный катион-радикал ABTS<sup>++</sup>. ORAC-метод чувствителен в широком диапазоне анализируемых концентраций белка, однако в ABTS<sup>++</sup>-системе присутствует один тип радикала и исключено прямое воздействие антиоксиданта на систему образования радикалов.

Выводы. Согласно данным спектрофотометрического и флуориметрического методов, гидролиз сывороточных белков оказывает существенное влияние на антирадикальную активность полученной пептидной фракции. По результатам сравнительного исследования опытного образца гидролизата и зарубежных аналогов с различной степенью гидролиза показано, что увеличение степени расщепления белков коррелирует с возрастанием их радикал-восстанавливающих свойств.

## Литература

1. Raikos, V. Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review / V. Raikos, T. Dassios // Dairy Sci. & Technol. – 2014. – Vol. 94. – P. 91–101.
2. Halavach, T.M. Enzymatic hydrolysis of milk proteins as a basis of specialized food products biotechnology / T.M. Halavach, V.P. Kurchenko, A.I. Albulov // Ural Scientific Bulletin. – 2014. – № 25 (104). – P. 69–79.

## **ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА И ГЕНЕРАЦИЯ ИМИ СУПЕРОКСИДНЫХ РАДИКАЛОВ: ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ КОЭНЗИМА Q<sub>10</sub>-H<sub>2</sub>**

**Дудылина А.Л.<sup>1</sup>, Иванова М.В.<sup>2</sup>, Шумаев К.Б.<sup>2,3</sup>, Рууге Э.К.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

<sup>2</sup>*ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва, Россия*

<sup>3</sup>*ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

Митохондрии являются одним из основных источников активных форм кислорода в клетках организма. Супероксидные анион-радикалы, образовавшиеся в комплексе III митохондриальной дыхательной цепи, и появившийся впоследствии пероксид водорода, вызывают значительный интерес, так как они играют регуляторную и сигнальную роли во многих внутриклеточных процессах. В тоже время, если продукция активных форм кислорода превышает клеточные возможности детоксикации, то последующее окисление фосфолипидов, белков и ДНК приводит к необратимым нарушениям энергетического метаболизма и возможной гибели клеток. Эндогенный коэнзим Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) в митохондриях является не только одним из компонентов цепи переноса электронов, но и важнейшим антиоксидантом.

Нами исследована роль экзогенно вводимой восстановленной формы CoQ<sub>10</sub> (убихинола-10) в регуляции биоэнергетических процессов и образования супероксидных радикалов в митохондриях сердца крыс линии Wistar. Водорастворимый препарат убихинола-10 (CoQ<sub>10</sub>-H<sub>2</sub>) был разработан и любезно предоставлен ЗАО "НПО "ДОМ ФАРМАЦИИ".

Дыхательную активность митохондрий изучали полярографическим методом с использованием электрода Кларка после 30 мин преинкубации митохондрий с различными концентрациями  $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$  – от 0,05 до 10 мкг на мг белка митохондрий. Контрольными были интактные митохондрии. Было установлено, что предварительная инкубация изолированных митохондрий с различными концентрациями  $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$  практически не влияет на сопряжение электронного транспорта с окислительным фосфорилированием и не приводит к изменению функциональной активности митохондрий. Достоверное снижение дыхательного контроля на 35 % и скорости поглощения кислорода в состоянии III на 18 % наблюдали только при концентрации  $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$  более 1 мкг/мг белка.

Таблица – Скорость поглощения кислорода и дыхательный контроль митохондрий сердца после 30 мин инкубации с различными концентрациями  $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$

Экспериментальные группы	Скорость поглощения кислорода, нмоль/мин·мг белка		Дыхательный контроль митохондрий
	Состояние IV	Состояние III	
Контроль, интактные митохондрии	16,6±1,8	40,0±5,5	2,42±0,30
Митохондрии+0,05 мкг Q/мг белка	15,7±0,3	39,5±2,0	2,52±0,12
Митохондрии+0,1 мкг Q/мг белка	16,2±0,6	34,7±3,4	2,14±0,26
Митохондрии+1 мкг Q/мг белка	16,7±0,7	33,1±4,6 *p=0,034	1,99±0,33 *p=0,048
Митохондрии+10 мкг Q/мг белка	21,3±2,0 *p=0,003	33,0±3,1 *p=0,014	1,56±0,18 *p<0,001

Образование и гибель супероксидных радикалов в комплексе III изолированных митохондрий сердца исследовали с помощью спиновой ловушки TIRON (4,5-диоксибензол-1,3-дисульфонат натрия) [1].

Регистрация и анализ спектров ЭПР проводились на спектрометре ESR 70-03 XD/2 УП «КБСТ» БГУ (Беларусь). Реакционная смесь, содержащая митохондрии, находилась в газопроницаемом капилляре PTFE 22 фирмы «Zeus Industrial Products, Inc.» (США) в условиях контролируемого парциального давления кислорода. При исследовании антиоксидантного действия различные концентрации  $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$  (0,02-0,1 мМ) вносили в среду инкубации перед добавлением митохондрий.

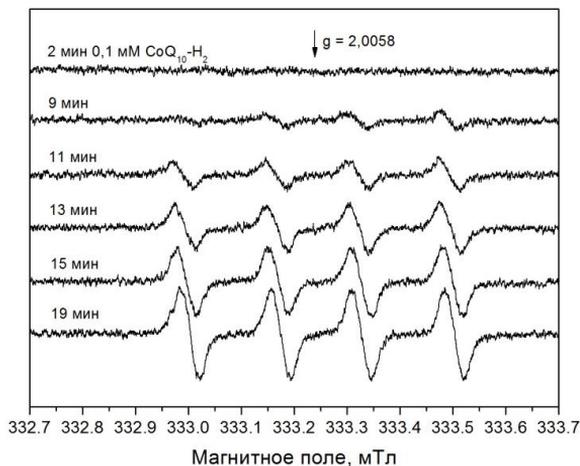


Рисунок 1 – Спектры ЭПР спиновой ловушки TIRON. Реакционная смесь содержала: 2 мг белка/мл митохондрий, 4 мМ сукцината, антимицин А, 10 мМ TIRON, 0,1 мМ  $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$  (pH 7,5; ~ 25 °С)

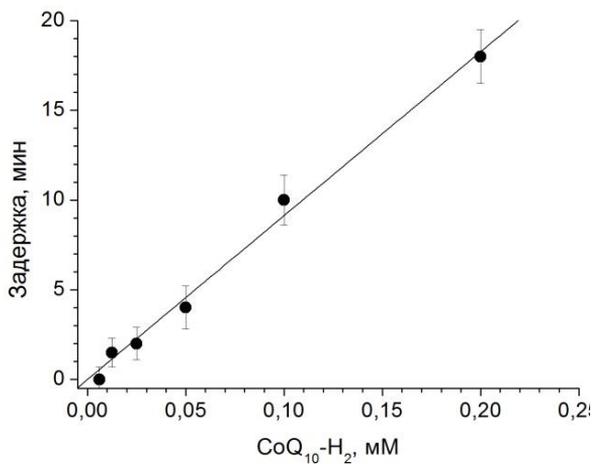


Рисунок 2 – Зависимость времени задержки сигнала ЭПР TIRON от концентрации водорастворимой формы убихинола-10 ( $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ ) в инкубационной смеси

Необходимо отметить, что спиновой ловушке TIRON характерна высокая константа скорости взаимодействия с супероксидными анион-радикалами, сравнимая с супероксиддисмутазой.  $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$  расходуется, вступая в реакцию с супероксидом, и в результате происходит появление и возрастание сигнала ЭПР TIRON в суспензии митохондрий через несколько минут после начала записи спектров (см. рисунок 1 и 2) в зависимости от концентрации вводимого препарата. Следовательно,  $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$  должен иметь сравнимую или даже более высокую константу скорости взаимодействия с супероксидом, чем TIRON.

Полученные результаты позволяют заключить, что в изолированных митохондриях сердца водорастворимая форма убихинола-10 ( $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ ) при разных значениях концентрации эффективно взаимодействует с образовавшимися в III комплексе супероксидными радикалами, проявляя антиоксидантный эффект, сравнимый с супероксиддисмутазой.

Работа выполнена при поддержке Государственного контракта № 14411.2049999.19.068 от 20.08.2014 г. и гранта РФФИ 15-04-05211.

### Литература

1. Коркина, О.В. Генерация супероксидных радикалов митохондриями сердца: исследование методом спиновых ловушек в условиях непрерывной оксигенации / О.В. Коркина, Э.К. Рууге // Биофизика. – 2000. – Т. 45. – С. 695-699.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДЛИН ВОЛН

Залеская Г.А.<sup>1</sup>, Ласкина О.В.<sup>2</sup>

*<sup>1</sup>Институт физики им. Б.И. Степанова*

*Национальной Академии Наук Беларуси, Минск, Беларусь,*

*<sup>2</sup>Белорусский государственный медуниверситет, Минск, Беларусь*

Среди современных технологий лазерной медицины важное место занимает фотогемотерапия (ФГТ) – внутривенное (ВОК) и надвенное воздействие оптического излучения на кровь. Выбор оптимальных режимов для ФГТ возможен на основе количественных оценок: проникающей способности излучения различных длин волн  $\lambda$  в кровь и кожные

ткани, а также ослабления излучения кожными тканями. Цель настоящей работы – определение спектральных условий, позволяющих обеспечить эффективное образование  $O_2$  в крови при фотодиссоциации оксигемоглобина (оксиHb); анализ физических причин, вызывающих изменения характеристик оксигенации и содержания продуктов метаболизма при ФГТ излучением различных длин волн.

Методы исследования. Для оценок эффективности воздействия оптического излучения с разными  $\lambda$  в условиях многократного рассеяния использовалась модель, в которой зависимость ослабления излучения  $I(z)/I_0$  от глубины проникновения в биоткани представлялась как экспоненциальная функция расстояния  $z$  от облучаемой поверхности и эффективного коэффициента ослабления излучения  $\mu_{эф}$ . Эффективность воздействия излучения различных  $\lambda$  на кровь сопоставлялась по количеству молекул кислорода  $N(\lambda)$ , образовавшихся при фотодиссоциации оксиHb в облучаемом слое крови в единицу времени. С учетом оптических характеристик крови оценивались эффективные спектральные показатели поглощения крови  $K_{эф}(\lambda, z)$ , в наибольшей степени зависящие от отношения  $\mu_a/\mu_{эф}$ . При одной и той же интенсивности  $I_0$  и одинаковых исходных биофизических характеристиках крови отношение  $K_{эф}(\lambda_1, z)/K_{эф}(\lambda_2)$  показывает, во сколько раз фотодиссоциация оксиHb при поглощении излучения  $\lambda_1$  окажется эффективнее, чем при  $\lambda_2$ .

Влияние курсов: НЛОК ( $\lambda=670$  нм, 780 нм 20 мВт,  $t=20$  мин, 7 ежедневных процедур, аппарат «Родник», Беларусь) и ВЛОК ( $\lambda=632,8$  нм, 670 нм, 2 мВт на выходе световода,  $t=20-30$  мин, 10 процедур) на характеристики оксигенации и продукты метаболизма оценивалось по результатам измерений образцов крови пациентов ( $n=40$  при НЛОК,  $n=25$  при ВЛОК) до и после окончания курса на приборе ABL-800 (Radiometer, Дания).

Результаты и обсуждение. Анализ спектров глубин проникновения излучения в кровь  $\sigma_{кр}$  и кожные ткани  $\sigma_{кж}$ , рассчитанных с оптическими характеристиками ( $\mu_a$ ,  $\mu_s$ ,  $g$ ), типичными для биотканей человека, показал, что для крови величина  $\sigma_{кр}$  возрастает от нескольких мкм при  $\lambda=405$  нм до 1,4 мм при продвижении в длинноволновую область до 950 нм. При ВОК оптическое излучение наиболее эффективно в интервале 406–574 нм, в пределах которого величины  $K_{эф}(\lambda_1, z)$  изменяются незначительно. При продвижении в длинноволновую область эффективность ВОК снижается, уменьшаясь на традиционно используемых длинах волн: ВОК–630 нм в 1,5 и ВОК–670 нм в 2 раза по сравнению с ВОК–406 нм, но не в 116 и 184 раза, как это следует из сравнения коэффициентов поглощения крови  $\mu_a$  на этих длинах волн. Из-за больших ве-

личин  $\sigma_{кр}$  излучение 630 нм и 670 нм более равномерно освещает кровь в вене, снижая возможность отрицательных пристеночных эффектов. Сделан вывод, что невозможно выбрать  $\lambda$ , пригодную для оптимального увеличения  $O_2$  в облучаемой крови только на основании значений  $\mu_a$ .

Показано, почему оптическое излучение с  $\lambda=405-416$  нм не пригодно для НОК: проникает только в поверхностные слои кожных тканей, малая доля излучения  $\lambda=416$  нм (2 %) и  $\lambda=470$  нм (30 %) достигает крови в вене. Наиболее эффективно для НЛОК и НОК излучение диапазона от 670 нм до 950 нм, обеспечивающее достаточную глубину проникновения (6–8 мм) и интенсивность у поверхности вены  $I(z)=60-80$  %.

Установлено, что практически важной для клинического применения особенностью воздействия оптического излучения разных  $\lambda$  на кровь является достаточно высокая степень фотодиссоциации оксиHb эритроцитов излучением широкого диапазона длин волн, в том числе красного и ближнего ИК диапазонов, для которых в растворах гемоглобина предсказывалось сильное падение квантового выхода фотодиссоциации оксиHb. Сопоставимые результаты фотодиссоциации в диапазоне от 450 нм до 950 нм были получены как при облучении крови в крупных кровеносных сосудах, так и при облучении кожных тканей. Установлено, что для обоих методов изменения степени насыщения артериальной крови составляли  $\Delta S_a O_2=2-6$  %, а венозной  $\Delta S_v O_2$  достигали 20–30 %.

Важной особенностью ФГТ, которую необходимо учитывать при анализе результатов, полученных с разными  $\lambda$ , является зависимость эффективности воздействия от исходных значений  $S_v O_2$ . На примере изменений содержания оксиHb после курсов НЛОК показано, что зависимости индивидуальных изменений его концентрации ( $\Delta F_v HbO_2$ ) от исходных значений  $S_v O_2$  коррелируют с зависимостью величина  $\mu_a$  от  $S_v O_2$ . Как  $\Delta F_v HbO_2$ , так и  $\mu_a$  изменяются с ростом величины  $S_v O_2$  однонаправлено, убывая с увеличением  $S_v O_2$ . Отмечается, что многочисленные сообщения об отсутствии терапевтической реакции на ФГТ у пациентов с нормальными, высокими значениями  $S_v O_2$  могут быть обусловлены зависимостью  $\mu_a$  ( $S_v O_2$ ).

По продуктам метаболизма в большинстве медицинских применений определяется эффективность фототерапии. Поэтому особый интерес представляют их фотоиндуцированные изменения при разных  $\lambda$ . Сопоставление зависимостей от исходных значений  $S_v O_2$  концентрации глюкозы и холестерина и зависимости  $\mu_a(S_v O_2)$ , подтверждает влияние количества поглощенного кровью излучения на метаболические процессы. Подобные, но количественно отличающиеся результаты получены для

продуктов метаболизма при УФОК ( $\lambda=254$  нм), ВЛОК ( $\lambda=632,8$  нм, 670 нм), НЛОК ( $\lambda=670$  нм, 780 нм).

Успешное терапевтическое использование технологий ФГТ предполагает также учет динамики показателей кислородного статуса венозной и артериальной крови. Надежные результаты по влиянию ФГТ с различными  $\lambda$  получены для образцов крови, отобранных в одинаковые фиксированные моменты времени.

Выводы. Оценки оптимальных спектральных условий для ФГТ излучением  $\lambda=405-950$  нм показали, что наибольшее увеличение содержания  $O_2$  в крови при ВОК может быть получено для  $\lambda=405-570$  нм, затем эффективность ВОК снижается для  $\lambda>630$  нм. Однако уменьшение эффективности ВОК происходит значительно медленнее, чем снижение коэффициента поглощения крови  $\mu_a$  с ростом  $\lambda$ ; поэтому необходимы оценки поглощенной энергии в облучаемом слое крови с учетом  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  и  $g$ . Показано, почему наиболее эффективным для НЛОК и НОК является излучение от 670 нм до 950 нм, обеспечивающее достаточные как глубину проникновения, так и интенсивность излучения, достигшую вены.

Установлено, что фотодиссоциация оксиНв способствует дополнительному экстрагированию  $O_2$  из крови при ФГТ. Воздействие оптического излучения с различными  $\lambda$ , увеличивая содержание  $O_2$  в крови, приводит как к генерализованной реакции организма, так и к стимуляции разнообразных местных терапевтических эффектов: снижению гипоксии тканей с увеличением  $S_vO_2$  до 20–30 %, активации процессов метаболизма. Фотоиндуцированные изменения, как характеристик оксигенации, так и продуктов метаболизма связаны с исходным значением  $S_vO_2$ , которой определяется коэффициент поглощения крови.

## ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Зорина Т.Е.<sup>1</sup>, Кравченко И.Е.<sup>1</sup>, Яковец И.В.<sup>1</sup>, Белевцев М.В.<sup>3</sup>,  
Балахар Гош<sup>2</sup>, Свати Бисвоз<sup>2</sup>, Зорин В.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт технологий и научных исследований Бирла, Пилани, Индия*

<sup>3</sup>*РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии,  
Минск, Беларусь*

Известно, что амфифильные полимеры способны формировать самоорганизующиеся наноструктуры за счет наличия в их цепи гидрофобных и гидрофильных фрагментов. Варьируя химическое строение синтезируемых макромолекул, природу и распределение функциональных групп, удается эффективно управлять процессом молекулярной сборки, добиваясь получения сложных регулярных наноструктур различного строения, обладающих уникальными свойствами. В настоящее время наносистемы, созданные на основе амфифильных полимеров, вызывают все возрастающий интерес в фармакологии, так как они представляют один из видов терапевтических систем и способны транспортировать лекарственные вещества внутрь клеток. При циркуляции таких носителей содержащееся в них биологически активное вещество защищено от инактивации, а действие лекарственного препарата пролонгируется. Кроме того, наносистемы доставки на основе амфифильных полимеров имеют следующие преимущества: 1) быстрое и воспроизводимое получение в больших количествах; 2) возможность включения плохорастворимых в воде веществ; 3) регулирование накопления препарата в различных органах и тканях организма в зависимости от размера частиц.

Сополимеры метокси-поли(этилен гликоль)-поли(D,L-лактид) (mPEG-PLA) и метокси-поли(этилен гликоль)-*b*-поли( $\epsilon$ -капролактон) (mPEG-PCL) являются типичными амфифильными блочными сополимерами, которые способны к самоорганизации в водной среде в мицеллы, при этом гидролитически стабильные гидрофильные сегменты полиэтиленгликоля образуют внешнюю оболочку-корону, а ядро содержит гидрофобные биологически деградируемые блоки PLA и PCL. Мицеллы, получаемые из данных типов блочных сополимеров, наиболее перспективны при использовании в качестве переносчиков лекарственных препаратов при химиотерапии онкологических и других заболеваний.

В данной работе исследованы методы получения полимерных наночастиц на основе сополимеров mPEG-PLA и mPEG-PCL, нагруженных фотосенсибилизатором хлорином  $e_6$  (Хл  $e_6$ ). Исследованы структурные и фотофизические характеристики полученных наноразмерных комплексов. Проведено сравнение кинетических характеристик Хл  $e_6$  в сыворотке и клеточных культурах при введении фотосенсибилизатора (ФС) в растворе или в составе наноразмерных полимерных везикул.

Препараты сополимеров mPEG-PLA и mPEG-PCL синтезированы в Институте технологий и научных исследований Бирла (Индия). Полимерные мицеллы получали методом регидротации пленок, полученных при вакуумировании на роторном испарителе растворов полимера и Хл  $e_6$  либо в процессе диализа растворов полимера в смеси диметилсульфоксида и воды. В качестве растворителя использовались деионизированная вода или разбавленный фосфатно-солевой буфер (ФСБ) в разведении 1:10 (pH 7,4).

Оценку размеров полимерных частиц проводили методами динамического светорассеяния на анализаторе Nanoparticle Size Analyzer «Brookhaven 90Plus» (Австрия) и атомно-силовой микроскопии (АСМ) на приборе Solver P47PRO (НТ-МДТ, Россия).

На основании анализа АСМ-изображений были построены трехмерные модели полимерных частиц, а также определены их средние размеры (рисунок 1).

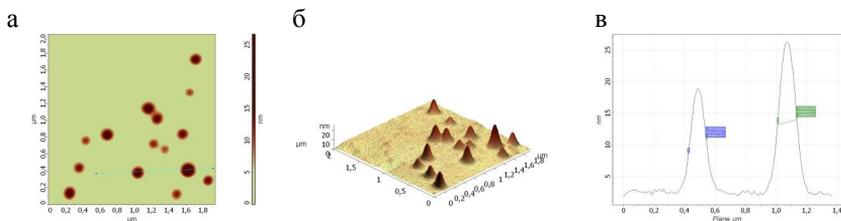


Рисунок 1– АСМ-изображение мицелл из кополимера mPEG-PLA с Хл  $e_6$  и оценка их размера: а – изображение при окне сканирования  $2 \times 2$   $\mu\text{м}$ ; б – трехмерная модель липосомы, построенная по АСМ-изображению при окне сканирования  $2 \times 2$   $\mu\text{м}$ ; в – оценка размера указанных на рисунке 1 а частиц, сечение рельефа поверхности

Размеры полимерных мицелл были определены в контроле и при нагрузке Хл  $e_6$  в соотношении от 1:3 до 1:9. Было показано, что средний

диаметр ненагруженных мицелл mPEG-PLA составляет 120 нм. Нагрузка хлорином сопровождается увеличением размеров мицелл, при максимальной степени нагрузки 36-40 % средний диаметр полимерных везикул составляет 145-150 нм. Средний диаметр мицелл, приготовленных из mPEG-PCL – 100-110 нм и практически не зависит от нагрузки ФС. Согласно данным динамического светорассеяния и АСМ, полученные препараты мицелл характеризуются высоким уровнем полидисперсности, что, по-видимому, обусловлено агрегацией мицелл в водных растворах. Степень агрегированности мицелл сильно зависит от условий подготовки (температура, продолжительность и интенсивность встряхивания суспензии) на стадии самоорганизации полимеров в мицеллы.

Исследования спектрально-флуоресцентных характеристик Хл е<sub>6</sub>, включенного в мицеллярные комплексы, позволило оценить характеристики связывания его с mPEG-PLA и mPEG-PCL. Небольшое длинноволновое смещение максимума спектра флуоресценции Хл е<sub>6</sub> (3 нм) свидетельствует об умеренно полярном микроокружении молекул данного ФС в составе полимерных мицелл (рисунок 2).

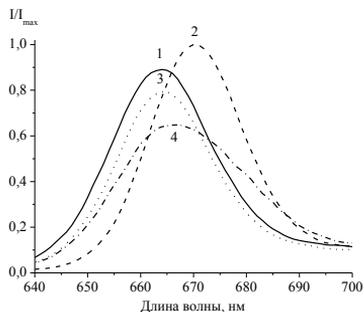


Рисунок 2 – Спектры флуоресценции\* Хл е<sub>6</sub> в растворах и в составе полимерных мицелл: 1 – Хл е<sub>6</sub> в ФСБ; 2 – Хл е<sub>6</sub> в этаноле; 3 – Хл е<sub>6</sub> в mPEG-PLA; 4 – Хл е<sub>6</sub> в mPEG-PCL; соотношение полимеры:Хл е<sub>6</sub> – (5:1).  
\*Значения флуоресценции нормированы на уровень I<sub>max</sub> флуоресценции Хл е<sub>6</sub> в растворе этанола

Относительный квантовый выход флуоресценции Хл е<sub>6</sub> в полимерных наноструктурах снижен в сравнении с его растворами, что, вероятно, происходит вследствие процессов экранировки и концентрационного тушения флуоресценции. Данный эффект в мицеллах mPEG-PLA слабо зависит от степени их нагрузки фотосенсибилизатором. В случае мицелл

mPEG-PCL увеличение количества связанного хлорина в 2-3 раза сопровождается снижением интенсивности флуоресценции на 50-60 %. Исследованные полимерные наноструктуры значительно различаются по скорости выхода связанного ФС. Анализ спектральных и поляризационных характеристик флуоресценции при введении нагруженных мицелл в раствор сыворотки показал, что практически все молекулы Хл  $e_6$  выходят из мицелл mPEG-PLA в течение 10-15 мин и связываются с белками. В случае mPEG-PCL мицелл, скорость выхода молекул ФС крайне низка, даже после 24 ч инкубирования большая часть молекул ФС остается в составе полимерных везикул.

Согласно результатам, полученным с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии (микроскоп Leica TCS SPE, Германия), Хл  $e_6$ , введенный в составе mPEG-PCL мицелл, накапливается в клетках Raji в значительно больших количествах в сравнении со свободным Хл  $e_6$ . При этом присутствие белков сыворотки крови практически не влияет на скорость накопления мицеллярной формы ФС.

Проведенные исследования показывают, что применение сополимеров mPEG-PCL и mPEG-PLA позволяет получать высокостабильные мицеллярные структуры, пригодные для создания новых фармакологических форм ФС. Изменение структурных характеристик подобных форм может позволить направленно контролировать фармакокинетику фотосенсибилизаторов при проведении фотодинамической терапии.

## **ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМОВ ФОТОПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ВВЕДЕНИЯ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ**

**Зорина Т.Е.<sup>1</sup>, Яковец И.В.<sup>1</sup>, Янковский И.В.<sup>1</sup>, Кравченко И.Е.<sup>1</sup>,  
Шман Т.В.<sup>2</sup>, Белевцев М.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии,  
Минск, Беларусь*

Эффективность и механизмы фотосенсибилизированного порфиринами повреждения клеток в значительной степени зависят от процессов связывания и внутриклеточной локализации фотосенсибилизаторов (ФС). Ранее было показано, что использование липосомальных форм для введения производных хлорина  $e_6$  (ПХл  $e_6$ ) существенно влияет на уро-

вень и кинетику накопления их в клетках [1]. В этой связи, представляет интерес анализ механизмов повреждения клеток, фотосенсибилизированных хлоринами и их липосомальными формами.

В данной работе представлены результаты исследования апоптотического и некротического механизмов повреждения клеток при фотооблучении в присутствии производных хлорина  $e_6$  и их липосомальных форм.

В работе использовали культуру клеток Raji. Производные Хл  $e_6$  – ди- и триметилловый эфиры хлорина  $e_6$  (ДМЭ и ТМЭ, соответственно) вводились в суспензию клеток в спиртовом растворе и в составе липидных везикул, приготовленных из димеристоилфосфатидилхолина методом экструзии.

Изменения в клетках, индуцированные фотодинамическим воздействием, анализировали с применением методов проточной цитофлуориметрии. Структурные изменения в клетках при фотосенсибилизации в данной работе оценивали на основании анализа распределения клеток по интенсивности прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. При исследовании динамики апоптоза анализ светорассеяния совмещали с изменениями флуоресценции мембранонепроницаемого флуорохрома йодида пропидия (PI), связывающегося с ДНК.

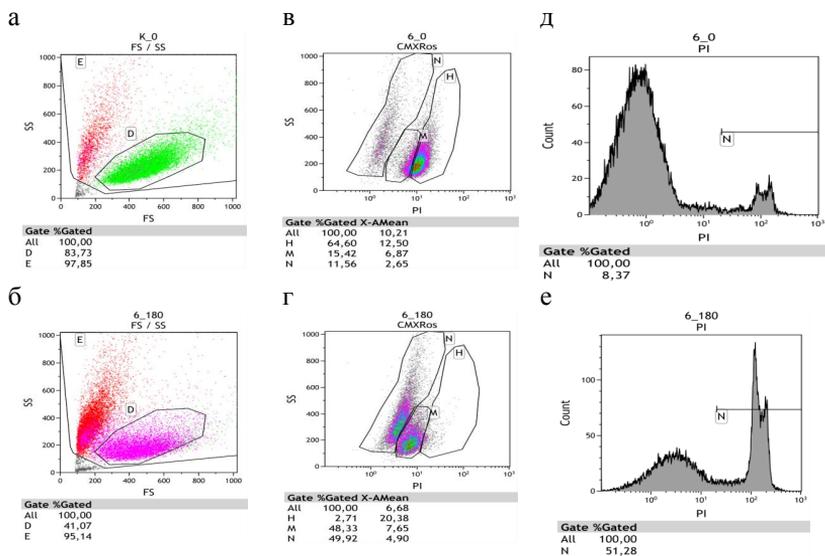
Снижение трансмембранного потенциала митохондрий (СТП) является одним из основных показателей развития апоптоза. Для измерения СТП в данной работе применялся липофильный флуорохром – CMXRos (хлорметил-Х-розамин).

Данные по оценке механизмов повреждения (апоптоз-некроз) клеток Raji при фотосенсибилизации ДМЭ представлены на рисунке 1.

Анализ характеристик светорассеяния позволяет выделить пул интактных клеток контрольного образца, которые характеризуются относительно высокими значениями FSC в сравнении с минорной популяцией поврежденных клеток, отличающейся существенно меньшей интенсивностью FSC (рисунок 1 а). Фотооблучение клеток, сенсибилизированное хлоринами, приводит к значительному изменению светорассеивающих свойств клеток. После воздействия резко возрастает доля клеточной популяции с низкими значениями FSC и более высокими в сравнение с контрольным образцом значениями SSC, что свидетельствует о значительных структурных изменениях в исследуемых клетках (рисунок 1 б).

Сенсибилизированное ПХл  $e_6$  фотовоздействие вызывает значительный рост числа клеток, у которых проявляется изменение трансмембранного потенциала, что свидетельствует о вовлечении этих клеток в процесс апоптоза. Дополнительно по уровню флуоресценции PI идентифи-

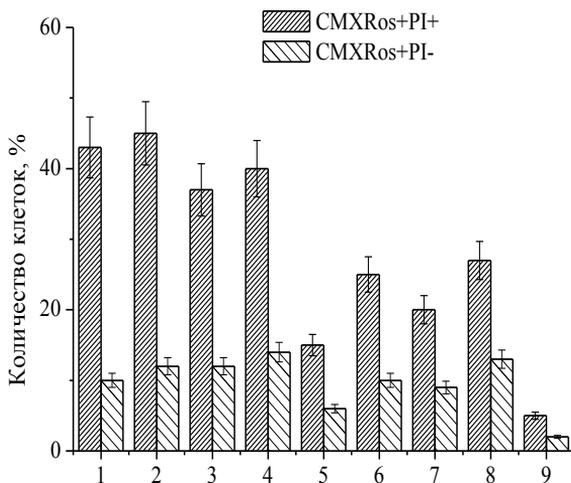
цировали клетки с фрагментированной ДНК (на рисунке 1 д, 1 е). Анализ двухпараметрического (по боковому светорассеянию и флуоресценции CMXRos) распределения клеток позволил дифференцировать неповрежденные и апоптотические клетки. Через 3 ч после облучения в присутствии ДМЭ число апоптотических клеток возросло до 50 % (рисунок 1 в, 1 г, регион М).



а, б – клетки разделены по параметрам прямого и бокового светорассеяния; в, г – диаграммы, отражающие распределение клеток, окрашенных CMXRos по отклику на степень фотосенсибилизированного воздействия: Н – живые клетки, М – апоптотические клетки, N – погибшие клетки; д, е – диаграмма, отражающая рост количества погибших клеток (тест с PI). а, в, д – клетки до облучения; б, г, е – клетки после облучения; время облучения – 20 с; время после облучения – 3 ч. Концентрация ДМЭ –  $6 \times 10^{-7}$  М. Доза светового воздействия – 1,1 Дж/см<sup>2</sup>,  $\lambda=660$  нм.

Рисунок 1 – Оценка механизмов повреждения (апоптоз-некроз) клеток Raji при фотосенсибилизации ДМЭ

С использованием описанных выше методик проведено сравнение результативности фотоповреждения клеток при их сенсibilизации ДМЭ и ТМЭ, введенными в клеточный образец в спиртовом растворе и в составе липосомальной формы. Согласно полученным данным при одинаковых режимах фотооблучения исследуемые ФС различаются по способности индуцировать апоптотические и некротические изменения в клетках (рисунок 2).



1 – ДМЭ, клетки после облучения; 2 – ДМЭ, время после облучения – 3 ч; 3 – ЛФ ДМЭ, клетки после облучения; 4 – ЛФ ДМЭ, время после облучения – 3 ч; 5 – ТМЭ, клетки после облучения; 6 – ТМЭ, время после облучения – 3 ч; 7 – ЛФ ТМЭ, клетки после облучения; 8 – ЛФ ТМЭ, время после облучения – 3 ч; 9 – контрольные образцы (клетки без ФС).  
 Время облучения – 30 с; концентрация ДМЭ –  $4 \times 10^{-7}$  М. Доза светового воздействия –  $1,2 \text{ Дж/см}^2$ ,  $\lambda=660 \text{ нм}$ . Общее количество клеток в образце принято за 100%. Представлены средние значения и ошибка среднего ( $M \pm m$ ) для 3 независимых экспериментов.

Рисунок 2 – Относительное содержание апоптотических (CMXRos+PI-) и некротических (CMXRos+PI+) клеток при фотосенсibilизации ПХл  $e_6$  и их липосомальными формами

При использовании в качестве ФС ТМЭ результативность повреждения клеток была значительно ниже по сравнению с ДМЭ. Для 30-минутной инкубации относительное количество поврежденных клеток, определяемых в тесте с PI, при использовании ТМЭ в спиртовом растворе было ниже в 3 раза в сравнении с ДМЭ. Выход апоптотических клеток в этом случае был также ниже в 2 раза. Увеличение продолжительности инкубирования клеток в растворе с ТМЭ сопровождалось увеличением эффективности фотоповреждения клеток, при этом число некротически и апоптотически поврежденных клеток было на 40 % и 18 %, соответственно, ниже в сравнении с образцами, содержащими ДМЭ. Введение ТМЭ в составе липосом сопровождалось значительным увеличением результативности фотосенсибилизированного повреждения клеток по сравнению с ТМЭ, введенным в спиртовом растворе. В случае ДМЭ относительный выход апоптотически и некротически поврежденных клеток не зависел от формы его введения в клеточную суспензию, при этом ДМЭ характеризовался существенно большей способностью сенсибилизировать апоптотические и некротические изменения в клетках в сравнении с ТМЭ и хлорином  $e_6$ .

Полученные результаты показывают, что использование липосомальных форм неполярных фотосенсибилизаторов оказывает существенное влияние на клеточные механизмы фотоповреждения. При этом ПХл  $e_6$  в ЛФ проявляют высокую фотодинамическую активность и могут быть успешно применены для решения различных задач ФДТ.

### Литература

1. Оценка фото- и цитотоксичности этерифицированных производных хлорина  $e_6$  и их липосомальных форм / Т.Е. Зорина [и др.] // Биофизика. – 2015. – Т. 60, вып. 5. – С. 922-930.

**ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ  
НА ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ  
«АМИЛОИДНЫЕ СТРУКТУРЫ–БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ»**

**Зубрицкая Г.П.<sup>1</sup>, Гармаза Ю.М.<sup>1</sup>, Болодон В.Н.<sup>2</sup>, Кутько А.Г.<sup>1</sup>,  
Слобожанина Е.И.<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии  
НАН Беларуси”, Минск*

*<sup>2</sup>ГУ “Белорусский государственный аграрный технический  
университет”, Минск*

Причиной нейродегенеративных заболеваний и других амилоидозов является переход “здоровой” молекулы белка или пептида из нативной конформации в очень стабильную “патологическую” форму. При этом молекулы в патологической конформации агрегируют, образуя амилоидные фибриллы, повышение количества которых может происходить бесконтрольно [1]. Широкая распространенность нейродегенеративных заболеваний и других амилоидозов ставит актуальным вопрос поиска путей диагностики этих заболеваний на его ранних этапах (доклиническом и на раннем клиническом этапе). На сегодняшний день к физико-химическим подходам исследования амилоидов относят методы микроскопии, оптические и флуоресцентные методы, методы электронного парамагнитного резонанса, электрохимический и электрофоретический, а также масс-спектрометрические методы [2]. В данной работе уделено наибольшее внимание люминесцентным методам анализа, которые наиболее отражают характеристики комплексов амилоидных структур с белками плазмы крови. Цель настоящей работы – используя собственную и зондовую флуоресценцию, изучить влияние температуры и рН среды на образование комплексов “амилоидные структуры–белки плазмы крови”.

Амилоидные структуры были получены из лизоцима куриного яйца (Fluka) путем его инкубации в 10 мМ HCl при 55 °С в течение 7 суток при постоянном перемешивании. Контроль за процессом образования амилоидных структур проводили ежедневно флуоресцентным методом с использованием зонда тиофлавина Т. Концентрацию полученных амилоидных фибрилл оценивали по модифицированному методу Лоури.

Для создания модельной тест-системы “амилоидные структуры–белки крови” были использованы – сывороточный альбумин человека (САЧ) и сывороточный альбумин быка (САБ), растворенные в 10 мМ Na-

фосфатном буфере (рН 7,4) до конечной концентрации 1 мг/мл. Флуоресцентные измерения выполнены на спектрофлуориметре SM2203 («СОЛАР»), спектрофотометрические – на спектрофотометре «Спекорд М40».

Как известно, процессы формирования комплексов амилоидных фибрилл с различными белками *in vitro* характеризуются разной скоростью. Она зависит от состава растворов, температуры, рН среды и др. Поэтому нами была проведена оценка собственной флуоресценции белков ( $\lambda_{\text{возб}}=296$  нм,  $\lambda_{\text{рег}}=350$  нм) и интенсивности флуоресценции тиофлавина Т ( $\lambda_{\text{возб/рег}}=440/495$  нм) в комплексах “САЧ/САБ–амилоидные фибриллы” при различных условиях их инкубации: температура – 20 °С, 37 °С, 65 °С и буферные системы с рН 5,4, 7,0 и 8,0.

Как известно, тиофлавин Т является подходящим зондом для обнаружения амилоидных структур как *in vivo*, так и *in vitro*. Это обусловлено тем, что свободный краситель в водном растворе имеет низкий квантовый выход, а при взаимодействии с белками в состоянии амилоидных фибрилл его квантовый выход возрастает на несколько порядков [3]. Установлено, что инкубация САЧ и САБ с амилоидными фибриллами при 37 °С сопровождается снижением интенсивности флуоресценции тиофлавина Т в среднем на 10–15 % по сравнению с их выдерживанием при 20 °С. Увеличение температуры инкубации комплекса “САЧ–амилоидные фибриллы” до 65 °С сопровождалось также снижением исследуемого параметра по сравнению с выдерживанием при 20 °С, но в большей степени (в среднем на 30–40 %). Однако повышение температуры инкубации другого комплекса “САБ–амилоидные фибриллы” до 65 °С вызывало рост интенсивности флуоресценции тиофлавина Т на 10–15 % по сравнению с их инкубацией при 20 °С, на фоне отсутствия видимых различий при 20 °С и 37 °С.

Параллельно с оценкой интенсивности флуоресценции тиофлавина Т в комплексах “САЧ/САБ–амилоидные фибриллы” были изучены параметры собственной флуоресценции белков плазмы крови. Показано, что 3-часовая инкубация САБ и САЧ с амилоидными фибриллами из лизоцима при 37 °С приводит к двукратному увеличению интенсивности триптофановой флуоресценции исследуемого комплекса в случае использования САЧ, но к снижению изучаемого параметра в случае САБ примерно в 1,5 раза по сравнению со значениями интенсивности флуоресценции нативных растворов САЧ и САБ. В то же время установлено, что повышение температуры инкубации альбуминов с амилоидными фибриллами до 65 °С сопровождалось разнонаправленными изменениями параметров собственной флуоресценции белков. Так, в случае ком-

плекса “САЧ–амилоидные структуры” нами зарегистрировано повышение значения исследуемого параметра в среднем на 5–10 %, а в случае САБ – снижение на 20 %.

При изучении влияния рН среды инкубации на образование комплексов амилоидов с белками крови обнаружено, что 3-часовая инкубация (37 °С) САБ и САЧ с амилоидными фибриллами из лизоцима в условиях щелочной среды (рН 8,0) приводит к увеличению интенсивности триптофановой флуоресценции комплекса “амилоидные структуры–белки плазмы крови” в среднем на 30 % для САБ и на 15 % для САЧ по сравнению с инкубацией в кислой (рН 5,4) и нейтральной (рН 7,0) средах. Стоит отметить, что изменение концентрации ионов водорода в буферном растворе (10 мМ натрий-фосфатный буфер), используемом для разведения САБ и САЧ, а также амилоидных фибрилл, существенно не влияет на интенсивность триптофановой флуоресценции белков. Установлено, что при инкубации белков плазмы крови с амилоидными фибриллами в условиях кислого рН интенсивность флуоресценции тиофлавина Т находилась на низком уровне, то в условиях нейтральной и щелочной рН – возрастала примерно в 1,5 раза для САБ и в 2 раза для САЧ.

Полученные результаты позволяют заключить, что образование комплексов “амилоидные структуры–белки плазмы крови” зависит от температуры инкубации, так как связь между белками и их лигандами обычно ослабевает при высоких температурах. С другой стороны, установлено, что значение рН среды инкубации также влияет на образование комплексов амилоидов с САЧ и САБ (снижается в области рН 5,4), что может явиться результатом изменения связывающей способности альбуминов при их окислении.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ, грант № М15-112.

### Литература

1. Amyloid- $\beta$  and Astrocytes Interplay in Amyloid- $\beta$  Related Disorders / Y.S. Batarseh [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17, № 3. – P. 338–342.
2. Физико-химические методы исследования агрегации  $\beta$ -амилоида / С.П. Радько [и др.] // *Биомедицинская химия.* – 2015. – Т. 61, вып. 2. – С. 203–218.
3. Amdursky, N. Molecular rotors: what lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker // N. Amdursky, Y. Erez, D. Huppert // *Acc. Chem. Res.* – 2012. – Vol. 45. – P. 1548–1557.

## АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ПСОРИАТИЧЕСКОМ, РЕВМАТОИДНОМ И РЕАКТИВНОМ АРТРИТАХ

**Иванова С.В., Голенова И.А., Семенов Д.И.**

*Витебский государственный медицинский университет,  
г. Витебск, Беларусь*

Известно, что псориаатический артрит (ПсА) – это хроническое прогрессирующее заболевание, приводящее к деструкции и деформации суставов, что отражается на трудоспособности и продолжительности жизни пациента [1]. В некоторых случаях диагностика ПсА затруднена даже при длительном течении болезни, т.к. псориаз может предшествовать артриту, развиваться одновременно с артритом и после возникновения заболевания суставов [2]. Поскольку нарушения протеолитической системы играют основополагающую роль в развитии артритов [3], то целью данного исследования являлось установление возможности использования показателей протеолиза и флуоресценции сыворотки крови для дифференциации псориаатического, ревматоидного и реактивного артритов.

Исследовали сыворотку крови 79 человек: 33 – с ревматоидным артритом, серопозитивным, 2-й степени активности и 2-й рентгенологической стадией (РА); 21 – с псориаатическим ассиметричным олигоартритом (ПсА); 25 – с реактивным хламидиоиндуцированным артритом (РеА). Определение активности трипсиноподобных протеиназ (ТпА) в сыворотке крови проводили с использованием в качестве субстрата N- $\alpha$ -бензоил-D,L-аргинин паранитроанилида (БАПНА) по методу Erlander B.F., et al. [4]. Регистрацию протеолитической активности в сыворотке крови осуществляли также по регистрации флуоресценции компонентов реакции взаимодействия альбумина (как субстрата) и сыворотки крови ( $I_{кр.}$ ) и по содержанию ТХУ-растворимых продуктов этой реакции ( $A_{280}$ ) [5]. В сыворотке крови исследовали интенсивность собственной флуоресценции ( $I_{сб.}$ ). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре CM 2203 (SOLAR, Республика Беларусь) при длине волны возбуждения 286 нм. Все количественные данные представлены в виде значений медиан (Me) с указанием 10 и 90 перцентилей: Me (10 % – 90 %). Для определения статистической значимости различий использовали непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса и критерий Манна-Уитни для несвязанных выборок с учетом поправки Бонферони [6].

Анализ протеолитической активности сыворотки крови по распаду синтетического субстрата (БАПНА) ТпА при исследуемых заболеваниях выявил, в группе пациентов с ПА активность трипсиноподобных протеиназ была на 31 % и 26 % ниже, чем в группах РА ( $p<0,01$ ) и РеА, соответственно (таблица 1). Интенсивность протеолиза  $A_{280}$  по отношению к белковому субстрату в сыворотке крови пациентов с ПА была на 36 % и 29 % ниже, чем у пациентов с РА ( $p<0,01$ ) и РеА, соответственно.

Таблица 1 – Протеолитическая активность и флуоресценция сыворотки крови пациентов с артритами (Ме, 10 % – 90 %)

Диагноз	Показатели протеолитической активности		Показатели флуоресценции	
	ТпА, ммоль/(л·с)	$A_{280}$	$I_{сб.}$ , отн. ед., $\lambda_{max}=333-335$ нм	$I_{кр.}$ , отн. ед., $\lambda_{max}=337-339$ нм
РА	30,35	1,13	3,58	0,27
	23,36–51,62	1,00–1,33	3,26–4,35	0,22–0,37
РеА	28,36	1,01	4,49	0,25
	20,99–30,63	0,80–1,25	3,62–5,06	0,18–0,33
ПсА	20,99 <sup>1</sup>	0,72 <sup>1</sup>	2,81 <sup>1,2</sup>	0,48 <sup>1,2</sup>
	15,49–23,33	0,50–0,81	1,63–2,91	0,38–0,55

Примечание – Достоверность различий по сравнению: <sup>1</sup> – с группой РА; <sup>2</sup> – с группой РеА ( $p<0,01$ ).

Интенсивность флуоресценции нативной сыворотки крови в максимуме эмиссии  $I_{сб.}$  в группе пациентов с псориатическим артритом достоверно снижалась на 22 % и 37 % по сравнению с таковой в группах РА и РеА, соответственно ( $p<0,01$ ). Снижение интенсивности собственной флуоресценции сыворотки крови при ПА может быть вызвано разными причинами: меньшим уровнем белков острой фазы в сыворотке крови и содержанием низко- и средномолекулярных органических веществ, поступающих в кровь при ПА, изменением соотношения белковых фракций и т. д. Вероятно, воспалительные процессы в сыворотке крови пациентов с РА и РеА носят более острый характер, чем при ПА.

Исследование показателя  $I_{кр.}$  выявило его достоверное повышение на 78 % (в 1,8 раза) и 92 % (в 1,9 раза) в группе пациентов с ПА по сравнению по сравнению с РА и РеА ( $p<0,01$ ), соответственно. Повышение показателя  $I_{кр.}$  сыворотки крови пациентов с ПА соответствует самой низкой ферментативной активности сыворотки крови в этой группе, поскольку: а) согласно данным, представленным нами ранее [7], показатель  $I_{кр.}$  отражает ход протеолитической реакции и находится в обратной кор-

реляционной взаимосвязи с содержанием ТХУ-растворимых продуктов протеолиза  $A_{280}$ ; б) в сыворотке крови показатель  $I_{кр.}$ , на наш взгляд, будет интегральным показателем, обусловленным, в первую очередь, протеолитическим расщеплением альбумина ферментами сыворотки крови, а также, возможно, другими взаимодействиями, поскольку альбумин является белком–«сорбентом», который взаимодействует с другими белками и многими низкомолекулярными соединениями.

Таким образом, снижение протеолитической активности в сыворотке крови при ПсА (по сравнению с РА и РеА) по показателям ТпА и  $A_{280}$  сопровождается уменьшением интенсивности собственной флуоресценции сыворотки крови  $I_{сб.}$  и ростом интенсивности флуоресценции компонентов реакции взаимодействия альбумина и сыворотки крови  $I_{кр.}$ . Полученные результаты доказывают, что показатели протеолитической активности и флуоресценции отражают различия между ПсА, РА и РеА, а показатели флуоресценции могут быть использованы в качестве более простых способов оценки протеолитической активности сыворотки крови при этих формах артритов.

#### Литература

1. McHugh, N. Progression peripheral joint disease in PsA: a 5 year prospective study / N. McHugh, C. Balachrishnan, S. Jones // *Rheumatology*. – 2003. – Vol. 42. – С. 778–783.
2. Логинова, Е.Ю. Ранний псориатический артрит / Е.Ю. Логинова, Т.В. Коротаяева // *Науч. практ. ревматол.* – 2008. – № 6. – С. 47–55.
3. Турна, А.А. Матриксные металлопротеиназы в развитии деструктивных процессов при ревматоидном артрите / А.А. Турна // *Науч. практ. ревматол.* – 2010. – № 3. – С. 59–64.
4. Erlanger, D.F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / D.F. Erlanger, N. Kokowsky // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1961. – Vol. 95, № 2. – P. 271–278.
5. Спектрально-флуоресцентный анализ и протеолитическая активность сыворотки крови и синовиальной жидкости при артритах / С.В. Иванова [и др.] // *Журн. Гродн. гос. мед. ун-та.* – 2009. – № 4. – С. 73–77.
6. Авива, П. Наглядная медицинская статистика. Перевод с англ. / П. Авива, С. Кэралайн; под ред. В.П. Леонова. – 2-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 168 с.

7. Иванова, С.В. Исследование протеолитического расщепления сывроточного альбумина человека трипсином в условиях *in vitro* / С.В. Иванова, Л.Н. Кирпиченок // Новости мед.-биол. наук. – 2012. – Т. 6, № 3. – С. 61–68.

## **ФАЗОКОНТРАСТНАЯ МРТ В ДИАГНОСТИКЕ НАРУШЕНИЙ ВОДНОГО ОБМЕНА ПРИ ГИДРОЦЕФАЛИИ У ДЕТЕЙ**

**Каленчик С.И., Пархач Л.П., Талабаев М.В.,  
Босякова Е.В., Титовец Э.П.**

*РНПЦ неврологии и нейрохирургии, Минск, Беларусь*

Особенностью современного состояния проблемы водного обмена головного мозга и его нарушений является отсутствие единого общепринятого механизма, в котором были бы учтены совокупность новых экспериментальных и клинических наблюдений. При исследовании патогенеза нарушений ликвородинамики, в том числе гидроцефалии у детей, следует учитывать новые фундаментальные данные о наличии осцилляторного движения воды во внутрижелудочковой системе головного мозга (ГМ), синхронизированного с фазами сердечного цикла; существовании в мембранах всех клеток белковых трансмембранных водных каналов – аквапоринов; возможности фармакологической и гормональной регуляции как активности, так и экспрессии аквапоринов [1]. Таким образом, в связи с изменениями фундаментальных представлений о ликвородинамике возникла необходимость в уточнении критериев оценки состояния ликворообращения с целью определения показаний к хирургическому лечению гидроцефалии. К этим методам относят фазоконтрастную МРТ с одномоментным проведением пульсометрии, а также церебральную оксиметрию и доплерографическое исследование кровотока сосудов ГМ.

Обследования выполнялись с использованием магнитно-резонансной томографии с напряженностью магнитного поля 1,5-3 Тесла в соответствии с протоколом исследования и пакета программ General Electric в комплекте томографа Discovery750 в режиме исследования аксиального тока цереброспинальной жидкости (AXCSFFlow), лазерной церебральной оксиметрии, транскраниальной доплерографии кровотока в артериях головного мозга (средняя мозговая артерия). Осуществлялась математическая обработка данных с использованием программ Mathematica 10, Digitizer, TableCurve, Excel, ClearCanvas.

Нами проведен всесторонний анализ 15 пациентов детского возраста, поступивших в нейрохирургическое отделение № 3 (для детей) РНПЦ неврологии и нейрохирургии с диагнозом – гидроцефалия. Возраст пациентов составил от 1 мес. до 24 мес., медиана 3 мес. Из них 10 пациентов мужского пола, 5 – женского. Всем пациентам МРТ-обследование проводилось в состоянии медикаментозного сна. При проведении процедуры МРТ пациенту с помощью оптического сенсорного устройства синхронизировали нейровизуализационные измерения с фазами сердечного цикла. Наклон магнитного среза выбирали так, чтобы плоскость среза была перпендикулярна продольной оси водопровода мозга в области измерения. Полученные данные об объемных скоростях СМЖ в Сильвиевом водопроводе обрабатывали с построением интегральных графиков и расчётом систолического  $V_s$  и диастолического  $V_d$  объемов СМЖ.

Показано, что течение СМЖ в водопроводе ГМ носит колебательный возвратно-поступательный характер и связано с фазами сердечного цикла. Следует отметить, что это противоречит общепринятым классическим представлениям, согласно которым движение СМЖ монотонно и имеет неизменно краниокаудальное направление. В норме у здоровых людей в фазе систолы наблюдается краниокаудальное направление тока СМЖ – объемная скорость течения СМЖ имеет положительные значения – СМЖ вытекает из желудочков. В фазе диастолы направление потока изменяется на противоположное.

Для характеристики направления течения СМЖ и величины смещения потока нами был введен параметр  $K$  – показатель асимметрии потоков: отношение по модулю интегрального систолического объема ЦСЖ к ее интегральному диастолическому объему ( $K=V_s/V_d$ ). Значение  $K>1$  означает, что глобальный поток СМЖ в водопроводе мозга имеет краниокаудальное направление, т.е. соответствует ее нормальному физиологическому течению, как это следует из классических представлений. При  $K<1$  глобальное течение СМЖ обратно предыдущему и имеет каудокраниальное направление. В таких случаях, вероятно, нарушается нормальный ликвороотток, происходит накопление СМЖ в желудочках мозга, что следует рассматривать как объективное указание на церебральную патологию. При  $K=1$  интегральный систолический и интегральный диастолический объемы равны – глобальное течение СМЖ в Сильвиевом водопроводе отсутствует.

В нашем исследовании  $K>1$  был у 5 (33,3 %) пациентов,  $K<1$  у 8 (53,3 %), незначительные колебания ликвора на уровне водопровода ГМ отмечены у 2 (13,4 %). Принимая во внимание положительный показатель асимметрии потоков, результаты инструментальных методов диа-

гностики и клиническую картину, было принято решение не проводить хирургическое лечение у 6 пациентов с расширением желудочковой системы. 9 пациентов с гидроцефалией подверглись нейрохирургическому лечению, при этом  $K < 1$  отмечался у 7 (77,8 %) из них. У одного из оперированных пациентов с наиболее выраженной внутричерепной гипертензией (плащ головного мозга не превышал 1 см) показатели церебральной оксиметрии (сатурация гемоглобина в сосудах коры ГМ) были резко снижены:  $rSO_2 < 30$  % (норма 70 %) . Допплерографическое исследование скоростей кровотока сосудов ГМ в средней мозговой артерии у пациентов с гидроцефалией показало, что скорости кровотока были наиболее значимо снижены у пациентов с внутричерепной гипертензией.

У оперированных пациентов (9 человек) причиной развития гидроцефалии явились перивентрикулярные кровоизлияния тяжелой степени у 4 детей (44,5 %) из них, врожденные пороки развития – у 3 (33,3 %), инфекция центральной нервной системы – у 2 (22,2 %). Для нормализации ликворооттока у 6 пациентов выполнены вентрикуло-перитонеальное шунтирование, у 1 – эндоскопическая операция: кистовентрикулостомия, и у 2 применяли сочетание методик эндоскопии и шунтирования. Все пациенты выписаны из отделения с положительной динамикой в компенсированном состоянии без клинических признаков внутричерепной гипертензии.

Методы функциональной магнитно-резонансной визуализации в сочетании с другими инструментальными неинвазивными методами диагностики, такими как церебральная оксиметрия и транскраниальная доплерография, позволяют получить обоснованные диагностические критерии оценки церебрального водного обмена, которые могут быть использованы для уточнения тактики лечения пациентов с гидроцефалией, в том числе для определения необходимости нейрохирургического вмешательства. Интерпретация данных фазоконтрастной МРТ, церебральной оксиметрии и доплерографии кровотока сосудов ГМ базируется на новой развиваемой концепции развития отека ГМ с учетом закономерностей осцилляторного движения воды по нанопространствам аквапориновых трансмембранных белковых каналов [1].

### Литература

1. Титовец, Э.П. Исследование нарушений водного обмена головного мозга методами функциональной магнитно-резонансной визуализации / Э.П. Титовец, А.Ф. Смянович, Л.П. Пархач / Известия национальной Академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. – 2015.– № 1.– С. 65-72.

## ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДОВ НА КАЧЕСТВО ПОЛУЧАЕМОГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО СЫРЬЯ

Капустин М.А.<sup>1</sup>, Чубарова А.С.<sup>1</sup>, Якимович Е.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

<sup>1</sup>*РУП «Институт защиты растений», Прилуки, Беларусь*

Анализ состояния использования лекарственных средств в Республике Беларусь свидетельствует об увеличении спроса на лекарственные препараты растительного происхождения. Применение лекарственных средств растительного происхождения имеет ряд преимуществ перед использованием их синтетических аналогов. Сложный комплекс биологических активных веществ лекарственных растений оказывает более мягкий, но в то же время достаточно выраженный лечебный эффект, что крайне важно при лечении заболеваний, носящих хронический характер [1]. Проблема фитотерапии особенно актуальна для Беларуси, где, в условиях радиационного загрязнения, неправильного питания, недостаточного потребления витаминов и минеральных веществ, значительная часть населения для сохранения здоровья вынуждена периодически употреблять адаптогены, радиопротекторы и иммуномодулирующие препараты [2, 3].

Аптечная сеть и медицинская промышленность испытывают определенный дефицит в сырье многих лекарственных растений. Общее количество растительных лекарственных средств, зарегистрированных в республике, превышает 300 наименований. Потребности в таких лечебных средствах удовлетворяются, главным образом, за счет их поставки из-за рубежа [1]. В период с 2005 по 2010 гг. в Беларуси отмечено увеличение в 1,2–1,3 раза номенклатуры и объемов выпуска лекарственных средств из растительного сырья.

Низкая продуктивность лекарственных растений в настоящее время связана с устаревшей технологией их возделывания. Характерной чертой производства лекарственных растений остается использование ручного труда при проведении прополок, что ведет к удорожанию себестоимости производимой продукции и не позволяет расширять посевные площади данных культур. Поэтому одним из важнейших элементов интенсивной технологии возделывания лекарственных культур является применение химических средств защиты растений. Среди агротехнологических факторов, определяющих реализацию биологического потенциала лекарственных

растений, вклад мероприятий по борьбе с сорняками в общее количество сохраненного урожая составляет от 25 до 75 % [4, 5].

Снижение численности и вредоносности сорных растений на плантациях лекарственных растений является одним из важнейших факторов получения высоких урожаев и стабилизации объемов посевных площадей. Сохранение качественного состава и высокого количественного содержания биологически активных веществ (БАВ) в выращиваемом лекарственном сырье – основа создания эффективной технологии производства фитопрепаратов.

Нами была поставлена цель – на основании установления влияния гербицидов, норм и сроков их применения на урожайность сырья расторопши пятнистой и его биохимические показатели обосновать систему защиты данной культуры от сорных растений для получения качественного сырья, соответствующего требованиям фармацевтической промышленности Республики Беларусь.

В процессе работы проводилось изучение хозяйственной эффективности применения гербицидов почвенного действия (Прометрекс Фло, КС, Гезагард, КС, Стомп, КЭ, Эстамп, КЭ и Стомп профессионал, МКС), и послевсходовых препаратов (Миура, КЭ, Скат, КЭ, Таргет супер, КЭ) в посевах расторопши пятнистой, а также их влияние на накопление и состав флаволигнанов в получаемом лекарственном сырье. В результате установлена биологическая и хозяйственная эффективность применения довсходовых и послевсходовых гербицидов в посевах расторопши пятнистой, которые позволяют сохранить 3,2–5,3 ц/га урожая семян культуры. Определено, что при однократном применении в посевах расторопши пятнистой препаратов Миура, КЭ (хизалофоп-п-этил, 125 г/л) (1,0 л/га), Прометрекс Фло, КС (прометрин, 500 г/л) (2,0 л/га), Эстамп, КЭ (пендиметалин, 330 г/л) (3,0 л/га) и Стомп профессионал, МКС (пендиметалин, 455 г/л) (2,2 л/га) остаточных количеств гербицидов не обнаружено. Гербициды Миура, КЭ, Прометрекс Фло, КС, Эстамп, КЭ и Стомп профессионал, МКС включены в «Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь» для их широкого производственного применения в посевах расторопши пятнистой.

Впервые показано влияние применения гербицидов на содержание и соотношение основных флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой. Эстамп, КЭ (3,0 л/га) проявляет высокую эффективность на посевах расторопши пятнистой, и позволяет сохранить высокий урожай. Применение этого гербицида не приводит к изменениям в соотношении флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой, что важно при получении

стандартизированного фармацевтического сырья. Учитывая эффективность гербицидов, а также их влияние на содержание флаволигнанов в плодах, гербицид Эстамп, КЭ (3,0 л/га) может быть рекомендован к применению на посевах расторопши пятнистой, с целью получения стандартизированного лекарственного сырья. Применение противозлаковых гербицидов вызывает снижение содержания силимарина, а также содержания отдельных флаволигнанов: силибинина и силикристина в плодах расторопши пятнистой. Содержание силидианина в плодах увеличивается под воздействием этих гербицидов, за исключением препарата Скат, КЭ (1,0 л/га). Было показано, что негативное влияние использованных противозлаковых гербицидов на содержание БАВ связано с тем, что процесс биосинтеза флаволигнанов связан с ацетил-КоА и малонил-КоА. По механизму действия эти препараты являются ингибиторами фермента ацетил-КоА-карбоксилазы, что приводит к угнетению синтеза флаволигнанов в растении. В связи с этим, использование исследованных гербицидов является нежелательным в посевах расторопши пятнистой.

Работа поддержана грантом БРФФИ № Б14МВ-020.

### Литература

1. Постановление Совета Министров Республики Беларусь от 5 июля 2005 г. № 749 г. Минск «Об утверждении Государственной народнохозяйственной программы развития сырьевой базы и переработки лекарственных и пряно-ароматических растений на 2005–2010 годы «Фитопрепараты»».
2. Решетников, В.Н. Государственная народнохозяйственная программа развития сырьевой базы и переработки лекарственных и пряно-ароматических растений на 2005–2010 годы «Фитопрепараты» – инновации в действии / В.Н. Решетников, В.Н. Гапанович, И.К. Володько // Труды БГУ. Серия физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем / под ред. В.М. Юрина. – Минск. – 2010. – Т. 5, Ч. 2. – С. 10–15.
3. Решетников, В.Н. Производство фитопрепаратов – важная задача науки и производства / В.Н. Решетников // Труды БГУ. Серия физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем / под ред. В.М. Юрина. – Минск. – 2010. – Т. 5, Ч. 2. – С. 7–9.
4. Загуменников, В.Б. Оптимизация культивирования лекарственных растений в нечерноземной зоне России / В.Б. Загуменников. – М.: РАСХН ВИЛАР, 2006. – 76 с.

5. Загуменников, В.Б. Особенности культивирования лекарственных растений в Нечерноземной зоне РФ : автореф. дис. ... докт. биол. наук : 06.01.13 / В.Б. Загуменников ; ВИЛАР РАСХН. – М., 2002. – 54 с.

## **ВЛИЯНИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОЛОНА И ЕГО НАНОКОМПОЗИТА НА ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ**

**Качалова Н.М.<sup>1</sup>, Завадская Т.С.<sup>2</sup>, Качалова Е.А.<sup>3</sup>, Свириденко Л.Ю.<sup>4</sup>**

*<sup>1</sup>Институту фізико-органічної хімії та углехімії  
ім. Л.М. Литвиненко НАН України*

*<sup>2</sup>Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології  
ім. Р.Е. Кавецького НАН України, Київ, Україна*

*<sup>3</sup>Національний медичний університет  
ім. А.А. Богомольця, Київ, Україна*

*<sup>4</sup>Харківська медична академія післядипломної освіти,  
Харків, Україна*

В последнее годы появились информация, что, кроме прямого разрушения опухоли лазерным светом, положительное влияние может иметь облучение крови при одновременном внутривенном введении фотосенсибилизатора (ФС) [1]. Такое влияние получило название фотодинамической модификации крови (ФДМК) [2]. Заслуживают внимания экспериментальные работы, свидетельствующие о высокой эффективности фотодинамической терапии (ФДТ) глиальных опухолей человека и крыс с использованием фотосенсибилизирующего препарата Фотолон («Белмедпрепараты», Беларусь). Под действием лазерного излучения определенной длины волны в крови происходят структурно-функциональные и биохимические изменения компонентов крови. ФДМК индуцирует изменения в нервной и эндокринной системах организма. Главными мишенями оптического излучения являются гемоглобин, а также аминокислоты, белки, липиды, полисахариды клеточных мембран и цитоплазмы. В экспериментах *in vitro* было получено, что сенсибилизированная Фотодитазином и облученная лазерным светом плазма крови производит цитотоксическое действие на опухолевые клетки линии Нер-2 и меланомы человека. Клиническая апробация метода фотомодификации сенсибилизиро-

ванной фотодитазином циркулирующей крови была проведена в группе волонтеров [3].

Мы рассматриваем многократную ФДМК, как одну из возможностей аддитивной терапии опухолей головного мозга (ОГМ), и не исключено, что она может выступить альтернативой многократной локальной ФДТ ОГМ, которую технически трудно осуществить на практике. Действительно, опубликовано сообщение о редукции отдаленных метастазов опухолей различных локализаций под влиянием системной ФДТ, которую мы обозначили как ФДМК [2]. Механизм феномена остается малоизученным, но есть основания предполагать особую роль световой альтерации циркулирующих опухолевых клеток.

Цель работы: оценить противоопухолевую эффективность фотодинамической модификации крови крыс и мышей с перевиваемыми опухолями, а также возможность комбинации ФДМК с использованием композита Фотолона с наночастицами золота.

Материалы и методы. В первой опытной серии крысам (13 животных) на шестые сутки после инокуляции глиобластомы 101.8 проводилась однократная ФДМК с Фотолоном в первом опыте и однократная ФДМК, сенсibilизированной композитом Фотолона с наночастицами золота – во втором опыте. В работе использовали аппарат Лика-Терапевт 658±1 нм и облучатель на базе лампы Phillips, оснащенный светофильтром 520 нм. Выходная мощность лазерного света на торце световода, расположенного в хвостовой вене составляла 25 мВт, доза облучения – 7,5 Дж/см<sup>2</sup>, время воздействия – 5 мин. Выходная мощность света на базе светодиодной лампы "Philips LED" с зеленым светофильтром, расположенным в проекции хвостовой вены, составляла 50 мВт, доза облучения – 7,5 Дж/см<sup>2</sup>, время воздействия – 5 мин. Животные контрольной группы не подлежали терапевтическим воздействиям.

Во второй опытной серии нами на мышах (30 животных) изучено влияние ФДМК с нанокompозитом по критерию уменьшения объема опухоли мышей с карциномой легких Льюис.

При достижении размеров опухоли 5 мм животным первой группы была проведена однократная ФДМК, с выходной мощностью лазерного света 25 мВт на длине волны 658 нм, экспозицией 10 мин, дозой облучения 15 Дж/см<sup>2</sup>.

Животными второй группы была проведена однократная ФДМК с нанокompозитом, с выходной мощностью лазерного света 25 мВт на длине волны 658 нм, экспозицией 10 мин, дозой облучения 15 Дж/см<sup>2</sup> и с выходной мощностью света 25 мВт на длине волны 520 нм, экспозицией 10 мин, дозой облучения – 15 Дж/см<sup>2</sup>, то есть имело место комбиниро-

ванное облучение с использованием двух источников света используемых в предыдущей опытной серии. Животные контрольной группы, как и в первой серии, не подвергались терапевтическим воздействиям.

Результаты. В первой опытной серии динамика выживаемости крыс с глиомой в группе с однократной ФДМК с Фотолоном свидетельствует о положительном влиянии избранного лечебного подхода. Достоверное удлинение жизни в группе с ФДМК (аппарат Лика-Терапевт  $659 \pm 1$  нм) с Фотолоном составило по сравнению с контрольной группой без терапевтических воздействий 81 %. В группе животных с ФДМК с нанокompозитов достоверное удлинение жизни, по сравнению с контрольной группой составило 60 %.

Во второй опытной серии нами изучено влияние ФДМК с нанокompозитом по критерию уменьшения объема опухоли мышей с карциномой легких Льюис. Достоверное уменьшение размеров опухолей на 35,5 %, 39,6 %, 28,79 % в группе Фотолона наблюдалось, соответственно, на 5, 7, 10 сутки, по сравнению с контрольной группой. Вместе с тем, в группе ФДМК с нанокompозитом отмечается уменьшение размеров опухолей на 34,7 %, 51,7 %, 31,8 %, соответственно, на 7, 10, 17 сутки, что свидетельствует о более значимом эффекте, по сравнению с группой Фотолона в более поздние сроки наблюдения.

Выводы. Выявлена противоопухолевая эффективность ФДМК крыс с глиомами 101.8 с использованием Фотолона по критерию увеличения средней продолжительности жизни. Использование ФДМК с нанокompозитом (Фотолон+золотые наносферы) не оптимизирует данный лечебный подход.

В эксперименте на карциноме Льюис мышей выявлена противоопухолевая эффективность ФДМК по критерию уменьшения объема опухоли и возможность ее усиления при использовании композита Фотолона с наночастицами золота.

Таким образом, доказана лечебная эффективность ФДМК с Фотолоном и возможность оптимизации ФДМК композитом Фотолона с наночастицами золота на различных моделях животных-опухоленосителей, которая требует дальнейших экспериментальных исследований.

### Литература

1. Фотодинамическая терапия экспериментальной саркомы М-1 крыс с фотосенсибилизатором борированным хлорином / Ю.С. Осипчук [и др.] // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2015. – № 4 (1). – С. 11-13.

2. Вплив фотодинамічної модифікації крові на ріст солідних пухлин та метастазування у тварин-пухлиноносців / Завадська Т.С., Штонь І.О. // Матеріали научно-практичної конференції Лазерна хирургія [”Малоінвазивні оперативні втручання в лазерній медицині”], (Черкаси, Україна, 8-9 квітня 2016 р.) Черкаси – Вертикаль, 2016. – С. 150.
3. Гельфонд, М.Л. Предварительные результаты применения фотомодификации крови, сенсibilизированной «Фотодитазином», в лечении распространенных форм злокачественных новообразований / М.Л. Гельфонд // Журнал физической медицины. – 2005. – Т. 15, № 2. – С. 41-63.

## **МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ВЫЖИВАЕМОСТИ ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТОК ОПУХОЛЕЙ ОТ СТЕПЕНИ ИХ ОКСИГЕНАЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ФОТОННЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ**

**Книгавко В.Г., Батюк Л.В., Пономаренко Н.С., Човпан А.А.**

*Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина*

При решении задачи оптимизации методик лучевой терапии злокачественных опухолей актуальной проблемой является получение аналитического выражения, которое бы одновременно описывало зависимость выживаемости облученных клеток и от дозы излучения, и от степени оксигенации этих клеток. Считается [1-3], что радиационными повреждениями (РП), вызывающими репродуктивную гибель клеток, являются двунитевые разрывы (ДР) ДНК, поскольку именно для РП такого вида доказано наличие достоверной зависимости между их числом и выживаемостью клеток. Известно [4, 5], что при облучении клеток рентгеновским или гамма излучением количество ДР ДНК почти линейно зависит от дозы излучения. Нами предлагается следующее выражение для зависимости выживаемости облученных клеток от дозы излучения:

$$S = \exp(-n_0 D) \cdot \left( k + (1-k) \left( 1 + \frac{n_0 D}{n_e} \right)^{n_e} \right), (1)$$

где  $S$  – выживаемость клеток;  $D$  – поглощенная доза;  $k$  – параметр, характеризующий вероятность репарации ДР,  $n_e$  – количество структурно-функциональных единиц хроматина, обслуживаемых собственным ком-

плексом ферментов рекомбинационной репарации;  $n_0$  – среднее на клетку количество ДР на 1 Гр поглощенной дозы.

Если в обоих нитях ДНК доступность исходных простых повреждений для взаимодействия с кислородом одинакова, то вероятность образования ДР должна быть равна квадрату вероятности такого взаимодействия. Эта вероятность ( $p_b$ ) описывается выражением:  $p_b = (1 - (1 - \eta)^{\alpha c_b})$ , где  $\eta$  – вероятность того, что одна из молекул кислорода, которая находится от простого повреждения на достижимом расстоянии, достигнет этого повреждения и трансформирует его в разрыв прежде, чем клетка репарирует это простое повреждение;  $c_b$  – концентрация кислорода внутри ядра клетки;  $\alpha$  – коэффициент, который зависит от объема области, находясь в которой молекула кислорода может достичь простого повреждения. Тогда вероятность ( $p_p$ ) образования ДР зависит от концентрации кислорода следующим образом:  $p_p = (1 - (1 - \eta)^{\alpha c_b})^2$ . Очевидно, что количество таких ДР ДНК, которые образуются, прямо пропорциональны вероятности  $p_p$ . В то же время, при облучении, некоторое количество радиационных повреждений в клетке образуется вследствие прямого действия радиации; эти повреждения являются кислородонезависимыми [6] и, с учетом этого, для величины  $n_0$  окончательно можно записать:

$$n_0 = n_{0н} (\beta + (1 - \beta)p_p) = n_{0н} (\beta + (1 - \beta)(1 - (1 - \eta)^{\alpha c_b})^2), \quad (2)$$

где  $n_{0н}$  – это  $n_0$  при нормоксии;  $\beta$  – величина, значение которой лежит в пределах от 0,1 до 0,2 и выражает долю кислородонезависимых РП.

Рассмотрим теперь параметр  $k$  в формуле (1), который, как было сказано выше, определяет вероятность репарации ДНК. В работе [5] параметр  $k$  вводится как отношение длительности ( $T_{нр}$ ) той части клеточного цикла, в течение которой репарации РП не происходит, к общей длительности клеточного цикла, которая, в свою очередь, является суммой  $T_{нр}$  и длительности ( $T_p$ ) той части клеточного цикла, в течение которой репарация может произойти. Таким образом,

$$k = \frac{T_{нр}}{T_p + T_{нр}}$$

Известно, что при уменьшении оксигенации, деление клеток замедляется, а при достаточно низких значениях концентрации кислорода в околочелюточной среде – прекращается, и клетка переходит в состояние  $G_0$ . Рассмотрим причины и характер изменений величины  $k$  при уменьшении концентрации кислорода. Будем исходить из модельных предположений и результатов расчетов приведенных в работе [7], где предпола-

галось, что клетка при подготовке репликации и деления должна выполнять один и тот же объем синтетической работы и тратить на это одинаковое количество кислорода. Поэтому  $v_d \cdot T = \text{const}$ , где  $T$  – длительность той стадии клеточного цикла, при которой происходит подготовка к репликации и делению (главным образом, стадия S),  $v_d$  – скорость потребления кислорода клетками в момент деления клеток.

Учитывая, что стадия цикла во время которой происходит подготовка к репликации и делению, и стадия, при которой происходит рекомбинационная репарация ДР ДНК, совпадают, можно считать, что  $T_p = T$ . Тогда  $T_p \cdot v_d = \text{const}$ .

При нормоксии величина  $T_p$  приобретает минимальное значение ( $T_{\text{min}}$ ), а  $v_d = v_m - v_{\text{ж}} = \frac{v_m(c_r - c_{\text{ж}})}{c_r}$ , где  $v_m$  – скорость потребления кислорода клетками при нормоксии, а  $v_{\text{ж}}$  – та часть  $v$ , которая тратится на обеспечение текущей жизнедеятельности,  $c_r$  – концентрация кислорода, граничная между нормоксией и гипоксией,  $c_{\text{ж}}$  – такая концентрация кислорода, что при  $c < c_{\text{ж}}$  клетки живы, но деление клеток не происходит и при этом  $v_d = 0$ . При этом величина  $c_r$  приблизительно соответствует напряжению кислорода в 14 мм рт. ст. В общем случае:  $T_{\text{min}} v_m \left( \frac{c_r - c_{\text{ж}}}{c_r} \right) = T_p v_m \left( \frac{c - c_{\text{ж}}}{c_r} \right)$ , откуда  $T_{\text{min}}(c_r - c_{\text{ж}}) = T_p(c - c_{\text{ж}})$ . Таким образом, при  $c > c_r$

$$k = \frac{T_{\text{np}}}{T_{\text{np}} + T_{\text{min}}}, \quad (3)$$

а при  $c_r \geq c \geq c_{\text{ж}}$

$$k = \frac{T_{\text{np}}}{T_{\text{np}} + \frac{T_{\text{min}}(c_r - c_{\text{ж}})}{c - c_{\text{ж}}}}. \quad (4)$$

Из последней формулы видно, что при  $c \rightarrow c_{\text{ж}}$  величина  $k$  приближается к нулю, что в соответствии с формулой (1) ведет к увеличению выживаемости облученных клеток.

Более сложным является вопрос о радиочувствительности клеток в условиях оксигенации, соответствующей условию  $c_n < c < c_{\text{ж}}$ , где  $c_n$  – такая концентрация кислорода, что при  $c < c_n$  клетка гибнет. Мы считаем, что  $c_{\text{ж}}$  – это концентрация кислорода, равная приблизительно 3 мм рт. ст. При такой оксигенации деление клеток не происходит. Поэтому при облучении эти клетки могут существовать неопределенно долго. Проявиться указанные повреждения могут после улучшения оксигенации и восста-

новления деления клеток. При лучевой терапии погибает большое количество опухолевых клеток (особенно в нормоксичной части опухоли) и начинается процесс реоксигенации опухолевой ткани. Однако, учитывая, что клетки гибнут не сразу после облучения, и часть клеток до гибели успевает совершить несколько делений, можно сделать вывод о том, что процесс реоксигенации опухоли в целом, и особенно, ее наиболее гипоксических участков, протекает значительно медленнее, чем процесс репарации ДР ДНК в области опухоли, в которой происходит деление клеток. Поэтому, можно считать, что, перейдя за счет реоксигенации опухоли из состояния  $s < c_{ж}$  в состояние  $c_{ж} < s < c_{г}$ , клетки довольно долго находятся при концентрациях кислорода несколько больших, чем  $c_{ж}$  и, следовательно, для них также выполняется формула (4).

### Литература

1. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных. 1988. – М.: Высшая школа, 424 с.
2. Lavin M.F. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2008. – V. 9. – P. 759–769.
3. Москалева Е.Ю., Илюшина Н.А. Повреждение ДНК при действии ионизирующих излучений и их репарация // *Итоги науки и техники. Радиационная биология.* – 1990. – V. 9. – P. 1–113.
4. Mothersill C., Seymour C. Changing paradigm in radiobiology. *Mutat. Res.* // 2012. – V. 750. – P. 85–95.
5. Книгавко В.Г., Пономаренко Н.С., Мещерякова О.П., Протасеня С.Ю. Математична модель репродуктивної загибелі опромінених клітин еукаріот, яка враховує насичення системи репарації ДНК // *Український Радіологічний Журнал.* – 2009. – Т. XVII (4). – С. 497–502.
6. Березовский В.А., Сушко Б.С. Профиль концентрации кислорода в клетке и некоторые спорные вопросы перемещения свободного кислорода в биологических объектах // *Физиологический журнал.* – 1984. – Т. 30. – С. 345–354.
7. Книгавко В.Г., Бондаренко М.А., Пахомов В.И., Проценко Е.В. Математическое моделирование процессов роста злокачественной опухоли сферической формы // *Біофізичний вісник.* – 2004. – № 637. – С. 88–93.

## ХРОНИЧЕСКИЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС СПОСОБСТВУЕТ ПОВЫШЕННОЙ ПРОДУКЦИИ АДЕНОЗИНА ИЗ АДФ В КОРОНАРНОМ РУСЛЕ

Козловский В.И.<sup>1</sup>, Зинчук В.В.<sup>1</sup>, Хлопицкий С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>УО «Гродненский государственный медицинский университет,  
Гродно, Беларусь

<sup>2</sup>Ягеллонский университет, Краков, Польша

Кардиопротекторная роль аденозина достаточно широко известна. Одним из возможных механизмов кардиопротекторного действия этого аутокоида является его способность ограничивать негативное влияние окислительного стресса на сердце. Показано, что аденозин уменьшает генерацию активных форм кислорода [1] и повышает активность антиоксидантной системы в сердце [2]. Мы предположили, что хронический окислительный стресс будет способствовать повышенной генерации аденозина из АДФ и АТФ в сердце в качестве компенсаторного механизма, поэтому будет увеличиваться вклад аденозиновых рецепторов в коронарорасширяющие эффекты этих соединений. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния хронического окислительного стресса на механизм коронарной вазодилатации, вызванной АДФ и АТФ, а также на генерацию аденозина из этих соединений в коронарном русле.

Материал и методы исследования. В качестве модели хронического окислительного стресса мы использовали трансгенных мышей линии Tgαq\*44. Для этих животных характерна повышенная экспрессия гена, ответственного за α-субъединицу трансмембранного сигнального белка G<sub>q</sub>. Эти животные получены в Гарвардской медицинской школе (Бостон, США) на основе мышей линии FVB [3]. Уже в возрасте 2 месяцев у этих животных повышено содержание супероксид аниона в сердце, а в возрасте 14 месяцев у них развивается дилатационная кардиомиопатия и дисфункция коронарного эндотелия [4]. Исследование проводилось на модели изолированного сердца, перфузированного по методу Лангендорфа [4]. В течение эксперимента измерялся коронарный поток (КП) – объём жидкости, протекавший через сердце в единицу времени. АДФ и АТФ вводились болюсно в объёме 10 мкл. Для оценки роли аденозиновых рецепторов в механизме эффектов пуринов использовался антагонист аденозиновых рецепторов 8-сульфобензилтеофиллин (8-СФТ, 5·10<sup>-5</sup> М), который добавлялся в перфузионный раствор. Кроме того, с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в со-

четании с масс-спектрометрией, измерялось выделение аденозина в эф-флюэнте из изолированного сердца после введения исследованных со-единений. Эксперименты были проведены на мышах двух возрастных групп: 2 и 8 месяцев, в качестве контроля использовались животные ли-нии FVB соответствующих возрастов.

Результаты и их обсуждение. АДФ и АТФ увеличивали КП у транс-генных и у контрольных мышей. Эффекты пуринов и влияние на них 8-СФТ не отличались у контрольных и трансгенных мышей 2-месячного возраста. В то же время у 8-месячных мышей линии Tgaq\*44 уменьше-ние коронарорасширяющего эффекта АДФ под влиянием 8-СФТ было больше в сравнении с контролем (таблица 1). Наряду с этим, выделение аденозина после введения АДФ у трансгенных мышей примерно в 2 раза выше в сравнении с контролем (таблица 2).

Таблица 1 – Влияние 8-СФТ ( $5 \cdot 10^{-5}$  М) на прирост КП, вызванный АДФ и АТФ ( $10^{-9}$  М) в изолированном сердце мышей линий Tgaq\*44 и FVB в возрасте 8 месяцев – Ме (25 %; 75 %)

Соеди-нение	контрольные мыши FVB (n=10)			трансгенные мыши Tgaq*44 (n=16)		
	прирост КП (мл/мин)		% снижения 8-СФТ	прирост КП (мл/мин)		% снижения 8-СФТ
	без 8-СФТ	в присутст-вии 8-СФТ		без 8-СФТ	в присутст-вии 8-СФТ	
АДФ	1,76 (1,64;1,86)	0,87 (0,72;0,97)	52,2 (40,9;60,4)	1,96 (1,77;2,11)	0,62* (0,50;0,84)	68,9* (61,6;72,8)
АТФ	2,25 (2,09;2,39)	1,32 (1,10;1,57)	42,9 (24,9;49,0)	2,16 (1,77;2,36)	1,27 (1,77;2,36)	43,0 (31,3;49,0)

Примечание: \* – статистически достоверное различие при сравнении мышей линий Tgaq\*44 и FVB по критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

Полученные результаты показали, что в сердце мышей линии Tgaq\*44 в сравнении с животными линии FVB отмечается более выра-женный вклад аденозина в коронарорасширяющий эффект АДФ. Это связано с повышенной генерацией аденозина из АДФ. Указанные изме-нения предшествуют развитию дилатационной кардиомиопатии и дис-функции коронарного эндотелия, они обусловлены, прежде всего, повы-шенным образование супероксид аниона. Очевидно, активация продук-ции аденозина из АДФ в коронарном русле – компенсаторный механизм, минимизирующий повреждающее влияние окислительного стресса на сердце и коронарные сосуды. Кроме того, позитивное значение выявлен-ного нами феномена состоит в том, что АДФ, обладающий провоспалит-ельными и проагрегантными свойствами, превращается в аденозин, для которого характерны противовоспалительный и антиагрегантный эффек-

ты [5, 6]. Это препятствует развитию нарушений коронарного кровообращения.

Таблица 2 – Сравнение скорости выделения аденозина из изолированных сердец мышей линий Tgαq\*44 и FVB в базальных условиях, а также после применения АДФ и АТФ (оба в дозе 10<sup>-9</sup> М) – Ме (25 %; 75 %)

		Выделение аденозина из изолированного сердца мыши (пкМ/мин)	
		линия FVB (n=5)	линия Tgαq*44 (n=5)
базальные условия		33,9 (22,0; 36,8)	29,9 (19,8; 39,7)
после введения	АДФ	76,4 (68,5; 93,3)	145,4 (115,3; 169,1)*
	АТФ	87,4 (47,8; 134,7)	105,4 (75,0; 173,0)

Примечание: \* – статистически достоверное различие при сравнении мышей линий Tgαq\*44 и FVB по критерию Манна-Уитни (p<0,05).

Таким образом, хронический окислительный стресс способствует повышенной продукции аденозина из АДФ в коронарном русле, что может рассматриваться как компенсаторный механизм, направленный на минимизацию негативного воздействия активных форм кислорода на сердце и коронарные сосуды.

### Литература

1. A2B adenosine receptors inhibit superoxide production from mitochondrial complex I in rabbit cardiomyocytes via a mechanism sensitive to Pertussis toxin / X. Yang [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2011. – Vol. 163, № 5. – P. 995 – 1006.
2. Husain, K. Interaction of exercise and adenosine receptor agonist and antagonist on rat heart antioxidant defense system / K. Husain, S.M. Somani // Mol. Cell. Biochem. – 2005. – Vol. 270, № (1-2). – P. 209 – 214.
3. Dilated cardiomyopathy in two transgenic mouse lines expressing activated G protein alpha(q): lack of correlation between phospholipase C activation and the phenotype / U. Mende [et al.] // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2001. – Vol. 33. – P. 1477 – 1491.
4. NO and PGI(2) in coronary endothelial dysfunction in transgenic mice with dilated cardiomyopathy / L. Drelicharz [et al.] // Basic. Res. Cardiol. – 2008. – Vol. 103, № 5. – P. 417 – 430.
5. Adenosine A(2A) receptor stimulation reduces inflammation and neointimal growth in a murine carotid ligation model / J.A. McPherson [et al.]

// Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2001. – Vol. 21, № 5. – P. 791–796.

6. Hourani, S.M. Purinoceptors and platelet aggregation / S.M. Hourani // J. Auton. Pharmacol. – 1996. – Vol. 16, № 6. – P. 349 – 352.

## **ИЗМЕНЕНИЯ ВЯЗКО-УПРУГИХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ЭНДОВАСКУЛЯРНОЙ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ**

**Константинова Е.Э.<sup>1</sup>, Цапаева Н.Л.<sup>2</sup>, Мельникова Г.Б.<sup>1</sup>, Чижик С.А.<sup>1</sup>, Кужель Н.С.<sup>1</sup>, Миронова Е.В.<sup>2</sup>, Толстая Т.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси,  
Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Белорусский государственный медицинский университет,  
Минск, Беларусь*

Благодаря развитию метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) на сегодняшний день есть возможность изучения тонкой структуры поверхности и микрорельефа, а также механических свойств мембран биологических клеток, что невозможно сделать с использованием других методов. Как известно, острый коронарный синдром (ОКС) является клиническим отражением дефицита доставки крови к миокарду. К настоящему времени показано, что реологические свойства крови: вязкость цельной крови и плазмы, агрегация и деформируемость эритроцитов, которые представляют собой «основную ткань» артериальных сосудов в ряде случаев определяют морфофункциональное состояние микроциркуляторного русла и имеют прогностическое значение в исходе реваскуляризации миокарда при ОКС [1]. Изучение изменений структурно-функционального состояния клеток крови после восстановления кровотока с использованием рентгенэндоваскулярной реваскуляризации миокарда в ранние и отдаленные сроки после ОКС является перспективным с точки зрения решения данной проблемы.

Задача оценки морфо-функциональных свойств эритроцитов может быть решена с использованием метода АСМ, который зарекомендовал себя как информативный и высокочувствительный [2, 3]. В связи с выше изложенным целью работы являлось изучение особенностей структурно-функционального состояния эритроцитов пациентов с ОКС в отдаленные

(3 и 6 месяцев) сроки эндоваскулярной реваскуляризации миокарда с использованием метода АСМ.

Забор крови производили натощак через 10-12 часов после приема пищи. Образцы эритроцитов готовили по методике [2]. Исследование геометрии, структуры поверхности и упругих свойств мембраны форменных элементов крови осуществляли при помощи специализированного экспериментального комплекса NT-206 (производства ОДО «Микротестмашины», Беларусь). Использовали стандартные кремниевые зонды NSC11 («MikroMasch» Co., Эстония), жесткостью 3 Н/м. Для оценки упругих свойств мембраны клеток использовали метод статической силовой спектроскопии. Степень агрегации эритроцитов (САЭ) определяли по скорости их оседания в стандартизованных [4] стеклянных капиллярах диаметром 3 мм и длиной 200 мм.

Значения модуля упругости (E) эритроцитов у пациентов с ОКС в исходном состоянии находились в пределах от  $57,5 \pm 6,6$  до  $88,2 \pm 9,1$  МПа, силы адгезии (F) - от 22,2 до 33,3 нН. Установлено, что модуль упругости эритроцитов ниже, а сила адгезии на поверхности красных клеток крови выше, чем у практически здоровых лиц (E эритроцитов – от  $72,3 \pm 7,1$  до  $81,4 \pm 7,9$  МПа, F – от 23,5 до 27,2 нН), что свидетельствует о дестабилизации мембран эритроцитов у пациентов с ОКС в исходном состоянии [5].

Результаты оценки изменений параметров, характеризующих структурно-функциональные свойства эритроцитов, а также сравнительной оценки указанных характеристик с показателями биомаркера фиброза кардиомиоцитов (ST2) представлены в таблице.

Показано, что снижение концентрации ST2 через 1 месяц наблюдения, сопровождается благоприятными изменениями параметров, характеризующих структурно-функциональные свойства мембран клеток крови. Наиболее значимые изменения имеют место в динамике степени агрегации эритроцитов. У пациентов с благоприятным исходом ОКС этот показатель снижается через 1 месяц лечения на 37,9 %, через 3 и 6 месяцев – на 42,4 % и 45,3 %, соответственно. У пациентов с неблагоприятным исходом ОКС этот показатель в исходном состоянии на 9,1 % выше, чем у лиц с благоприятным исходом заболевания, и, при сохранении тенденции и к его снижению, остается также выше на протяжении всего периода наблюдения. У пациентов, как с благоприятным, так и с неблагоприятным исходом ОКС, имеет место тенденции к увеличению модуля упругости эритроцитов. Это свидетельствует о стабилизации мембран красных клеток крови и выражается в тенденции к нормализации деформируемости эритроцитов. При этом у пациентов с благоприятным исхо-

дом заболевания эти изменения более выражены. Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о диагностическом потенциале как САЭ, так и параметров АСМ, характеризующих упругие свойства клеточных мембран.

Таблица – Параметры биомаркера фиброза кардиомиоцитов и структурно-функционального состояния эритроцитов при различных вариантах исхода ОКС

Сроки наблюдения	Исходно	1 месяц	3 месяца	6 месяцев
Показатель	благоприятный исход ОКС (n=21)			
ST2, нг/мл	30,1±5,7	19,3±4,9*	20,1±4,2*	19,2±3,9*
САЭ, мм/2 ч	87,5±9,2	54,8±6,7*	50,4±5,7*	47,9±5,8*
Е, МПа	89,7±12,3	91,2±12,9	96,3±13,4	104,5±13,8*
	неблагоприятный исход ОКС (n=10)			
ST2, нг/мл	42,6±5,1	26,9±6,3*	22,4±6,8*	20,8±2,7*
САЭ, мм/2 ч	96,3±10,1	84,5±9,8*	76,2±8,9*	72,4±9,1*
Е, МПа	81,8±9,7	87,4±10,1	89,9±11,2	92,7±12,3

Примечание – Различия достоверны по отношению к исходным значениям при уровне значимости \* $p < 0,01$ .

### Литература

1. Kaul, S. Microvasculature in acute myocardial ischemia / S. Kaul, H. Ito // *Circulation*. - 2004. - Vol. 109. - P. 146-149.
2. Дрозд, Е.С. Атомно-силовая микроскопия структурно-механических свойств мембран эритроцитов/ Е.С. Дрозд, С.А. Чижик, Е.Э. Константинова // *Российский журнал биомеханики*. - 2009. - Т. 13, № 4 (46). - С. 22-30.
3. Detection of erythrocytes influenced by aging and type 2 diabetes using atomic force microscope / H. Jin [et al.] // *Biochem. and Biophys. Research Communications*. - 2010. - Vol. 391, № 4. - P. 1698-1702.
4. Состояние системы микроциркуляции и показатели гемореологии при острых и хронических формах ИБС / Е.Э. Константинова [и др.] // *Сб. науч. тр. / БелНИИ кардиологии*. - Минск, 1997. - Вып. 1: Актуальные вопросы кардиологии. - С. 127-130.
5. ISCH recommendation for measurements of erythrocyte sedimentation rate / B.S. Bull [et al.] // *J. Clin. Pathol.* – 1993. – Vol. 46. – P. 198-203.

# ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОСНОВНЫХ ТРАНСПОРТНЫХ СИСТЕМ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ЛЕЙКЕМИИ

**Королик Е.В.<sup>1</sup>, Иванов А.А.<sup>1</sup>, Инсарова Н.И.<sup>1</sup>, Лещенко В.Г.<sup>1</sup>,  
Морозова О.М.<sup>2</sup>, Миланович Н.Ф.<sup>2</sup>, Усс А.Л.<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Белорусский Государственный Медицинский Университет,  
Минск, Беларусь. Email: elena\_korolik@mail.ru*

*<sup>2</sup>Республиканский центр гематологии и трансплантации  
костного мозга, Минск, Беларусь*

Лейкоз – это заболевание, характеризующееся трансформацией определенных кроветворных клеток в злокачественные, неограниченное размножение которых приводит к замещению ими нормальных клеток костного мозга и очень высокому содержанию в крови измененных лейкоцитов. Лейкозы делятся на две основные группы – острые и хронические. В свою очередь острые лейкозы подразделяются на лимфобластный и миелобластный. Развитие ряда тяжелых заболеваний, в том числе и лейкоза, сопровождается образованием и накоплением в жидких средах организма разнообразных токсических субстанций. Наиболее адекватным и информативным подходом к диагностике эндогенной интоксикации является тестирование функционального состояния основных транспортных систем, осуществляющих сорбцию и перенос гидрофобных метаболитов и лекарственных препаратов в организме.

В настоящее время для оценки степени эндогенной интоксикации организма пациента по функциональному состоянию белков плазмы крови достаточно успешно используется метод флуоресцентного зондирования. Принцип этого метода заключается в оценке параметров связывания гидрофобных флуоресцентных зондов с транспортными белками [1]. К важнейшим транспортным системам крови человека относятся сывороточный альбумин (ЧСА), липопротеины (ЛП) и  $\alpha$ -1-кислый гликопротеин ( $\alpha$ -1-КГП). Метод флуоресцентного зондирования является одним из наиболее перспективных для изучения процесса функционирования белков плазмы крови в организме, для выяснения молекулярных механизмов патогенеза различных заболеваний, а также для использования его в качестве диагностического теста. Основное значение в связывании с белками плазмы крови играет заряд молекулы низкомолекулярных гидрофобных лигандов: анионные преимущественно сорбируются ЧСА, кати-

онные –  $\alpha$ -1-КГП, а незаряженные – распределяются между ЧСА и ЛП. Поэтому связывание низкомолекулярных гидрофобных токсинов и лекарственных препаратов белками крови можно анализировать с помощью набора флуоресцентных зондов с различными зарядами: анионный – 1-анилино-нафталин-8-сульфонат (АНС), катионный – Хинальдиновый красный (ХК), нейтральный – Нильский красный (НК).

Цель – применение метода флуоресцентного зондирования для оценки связывающей способности основных транспортных систем плазмы крови – сывороточного альбумина человека, липопротеинов,  $\alpha$ -1-кислого гликопротеина – больных с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) и хроническим миелолейкозом (ХМЛ), в комплекс лечебных мероприятий, в который включены высокодозная химиотерапия (ВХТ) и трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).

В работе была проанализирована плазма крови: 40-ка здоровых доноров, 30-ти пациентов с ОМЛ и 30-ти больных с ХМЛ. В качестве консерванта плазмы крови был использован гепарин. Методика проведения эксперимента подробно описана в работе [1].

В работе были проанализированы параметры связывания флуоресцентных зондов в плазме крови здоровых доноров (контрольная группа) и больных с ОМЛ и с ХМЛ. Для анализа полученных данных нами были использованы пиковые значения интенсивностей зондов АНС и ХК как показатель общей связывающей способности альбумина и  $\alpha$ -1-кислого гликопротеина, соответственно. В случае зонда НК, сольватохромные свойства которого делают его удобным для тестирования распределения нейтральных гидрофобных веществ между сывороточными липопротеинами и альбумином в нефракционированной плазме крови, был использован флуоресцентный параметр – отношение пиковой интенсивности липопротеин-связанного зонда НК ( $\lambda_{\max}=554$  нм) к альбумин-связанному зонду НК ( $\lambda_{\max}=592$  нм) –  $I_{554}/I_{592}$  [1].

На рисунке 1 представлены значения флуоресцентных параметров зондов АНС, ХК и НК в плазме крови больных с ОМЛ и с ХМЛ. Как видно из рисунка, наблюдается незначительное понижение связывающей способности альбумина по отношению к анионным лигандам (по данным зонда АНС) для больных с ХМЛ и практически не отличается от контрольной группы для пациентов с ОМЛ.

Отношение интенсивности флуоресценции липопротеин-связанного зонда НК к альбумин-связанному зонду НК, характеризующее связывающую способность липопротеинов и альбумина к нейтральным лигандам, показало, что для больных с ХМЛ не происходит перераспределение нейтральных гидрофобных метаболитов между липопротеинами и

альбумином по сравнению с контрольной группой. Исключение составляют больные с ОМЛ. Поскольку для этой группы больных концентрация альбумина ( $C_{\text{ЧСА}}$ , мг/мл) практически остается в норме (контрольная группа ( $n=40$ ) –  $C_{\text{ЧСА}}=46,8\pm 2,5$ ; ОМЛ ( $n=30$ ) –  $C_{\text{ЧСА}}=44,7\pm 2,0$ ; ХМЛ ( $n=30$ ) –  $C_{\text{ЧСА}}=42,9\pm 2,8$ ), то уменьшение значения  $I_{554}/I_{592}$  может быть вызвано как уменьшением концентрации липопротеинов (гиполипидемия), так и большой загруженностью липопротеинов нейтральными гидрофобными лигандами (в работе концентрация липопротеинов не определялась).

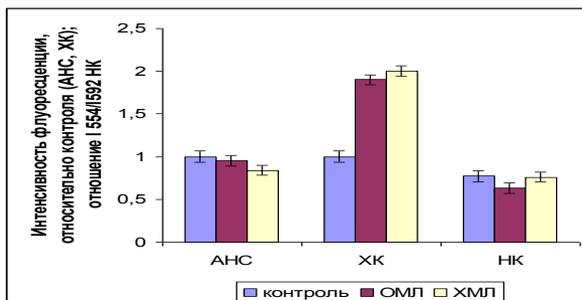


Рисунок 1 – Влияние различных форм лейкоза на флуоресцентные параметры зондов АНС, ХК и НК в плазме крови

Анализ спектров флуоресценции зонда ХК показал, что интенсивность флуоресценции этого зонда в плазме крови больных для ОМЛ и ХМЛ значительно возрастает по сравнению со здоровыми донорами. Это свидетельствует, по-видимому, о повышении концентрации  $\alpha$ -1-кислого гликопротеина в связи с наличием воспалительного процесса. Надо отметить, что гематологические больные характеризуются наличием глубокого иммунодефицита и вероятностью при этом высокого риска инфекционных заболеваний, что может привести к значительному увеличению концентрации  $\alpha$ -1-кислого гликопротеина, как белка острой фазы воспаления.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке БРФФИ.

### Литература

1. Оценка связывающей способности основных транспортных белков плазмы крови при циррозе печени методом флуоресцентного зондирования / Е.А. Короленко [и др.] // ЖПС – 2007. – № 4. – С. 507–511.

## **АПО-ФОРМА ЛАКТОФЕРРИНА ВЫЗЫВАЕТ СТАБИЛИЗАЦИЮ ГИПОКСИЯ-ИНДУЦИБЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ-1/2 АЛЬФА И NRF2**

**Костевич В.А., Соколов А.В., Захарова Е.Т., Васильев В.Б.**

*ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
Санкт-Петербург, Россия*

Введение. Известно, что железо накапливается в мозгу как во время нормального старения, так и в процессе нейродегенерации. Высокая концентрация железа, лабильные формы которого могут запускать окислительный стресс с образованием активных форм кислорода, разрушающих клетку, постоянно наблюдается в мозгу при болезнях Альцгеймера (АБ), Паркинсона (БП), рассеянном склерозе (РС) и при других неврологических заболеваниях. За последние несколько лет появилось много данных о нейропротективных свойствах синтетических хелаторов железа, полученных при клинических обследованиях пациентов, а также на моделях АБ, БП и РС у лабораторных животных, и предложен новый терапевтический подход. Суть его – в лечении хелаторами нейродегенерации и ишемии: связывая Fe, хелаторы предотвращают образование радикалов кислорода и стабилизируют гипоксия-индуцибельный фактор, ГИФ-1а, что лежит в основе их кардио- и нейропротективного действия. Например, феномен прекондиционирования объясняется тем, что в ответ на гипоксию усиливается экспрессия сотен генов и транскрипционных репрессоров, зависящих от ГИФ-1а, многие из которых отвечают за выживание клетки. Механизм индукции ГИФ под действием фармакологических миметиков гипоксии, например, хелатора Fe десферала (ДФО), основан на ингибировании Fe-содержащих пролилгидроксилаз (PHD1-3), отвечающих за гидроксилирование и последующую деградацию ГИФ при нормоксии. Природный хелатор железа семейства трансферринов, лактоферрин (ЛФ) грудного и коровьего молока, слёз, а также других биологических жидкостей и нейтрофилов (где белок находится преимущественно в апо-форме), обладает множеством свойств: антимикробным, иммуномодуляторным, противоопухолевым, противовоспалительным, антианемическим, противодартритным. Была изучена способность апо-формы и насыщенной железом формы ЛФ стабилизировать изоформы ГИФ-1а и ГИФ-2а – сходные, но не идентичные транскрипционные факторы, а также транскрипционный фактор, Nrf2, ответственный за ответ клеток на окислительный стресс. Известно, что именно ГИФ-2а отвечает за гипоксическую толерантность и метаболизм железа, усиливая экс-

прессию эритропоэтина (ЭПО), обладающего нейропротективными свойствами.

Методы. Оценивали способность апо-лактоферрина (апо-ЛФ), природного хелатора Fe, вызывать накопление Nrf2, ГИФ-1a/2a в мозгу мышцей (в сравнении с насыщенным железом белком и трансферрином), вызывать экспрессию мишеней ГИФ, церулоплазмينا и ЭПО. Получали апо-ЛФ из грудного молока хроматографией на CM-Сефадексе, трансферрин выделяли из сыворотки крови. Проводили Вестерн-блоттинг с моноклональными антителами к Nrf2, ГИФ-1a и ГИФ-2a, церулоплазмину и ЭПО мышцы.

Результаты. Впервые показано, что апо-форма ЛФ человека при введении *per os* вызывает накопление Nrf2, ГИФ-1a/2a, усиливает экспрессию церулоплазмينا и ЭПО в мозгу мышцей через 6 дней после употребления белка. Стабилизация ГИФ-1a/2a сопровождалась дозозависимым (1-5 мг апо-ЛФ) антигипоксическим эффектом, увеличивая время жизни старых низкоустойчивых к гипоксии мышцей до 140 % при острой гипоксии с гиперкапнией. Полученные с питьём, насыщенные железом трансферрины и апо-трансферрин человека, который не обладает свойством ЛФ проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), подобным действием не обладали.

Выводы. Впервые обнаружены свойства апо-ЛФ как антигипоксанта и индуктора Nrf2, ГИФ-1a и ГИФ-2a, связанные с его хелаторными свойствами. Также обнаружено повышение содержания известного нейропротектора, ЭПО (мишень ГИФ-2a), в крови мышцей, получавших апо-ЛФ. Учитывая способность ЛФ проникать через ГЭБ, вызывая стабилизацию ГИФ-1a/2a и Nrf2 в мозгу, и отсутствие побочных действий при длительном применении *per os* (в отличие от ДФО), представляется перспективным использовать лактоферрин по новому назначению: для лечения и профилактики нейродегенеративных заболеваний и для ишемического preconditionирования. Нами получен патент на изобретение № 2465004 – «Применение апо-формы лактоферрина человека в качестве антигипоксанта и стабилизатора гипоксия-индуцибельного фактора-1альфа».

Работа поддержана грантами РФФИ № 13-04-01186 и грантом Президента РФ МК-5074.2016.4.

## КАЛЬЦИЕВЫЙ ГОМЕОСТАЗ В ТРОМБОЦИТАХ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ, ОСЛОЖНЕННОЙ ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

**Криволап А.А.<sup>1</sup>, Бакунович А.В.<sup>2</sup>, Бичан О.Д.<sup>1</sup>, Сидоренко В.Н.<sup>3</sup>,  
Лобанок Л.М.<sup>3</sup>, Буланова К.Я.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*УО «Международный государственный экологический институт  
имени А.Д. Сахарова» БГУ, Минск, Беларусь*

<sup>3</sup>*УО «Белорусский государственный медицинский университет»,  
Минск, Беларусь*

Одной из актуальнейших проблем современного акушерства является преэклампсия – осложнение беременности, в основе которого лежат расстройства кровообращения как на микроциркуляторном, так и системном уровне. Преэклампсия стабильно занимает третье место в структуре материнской смертности во всем мире. Нарушения функциональной активности тромбоцитов, связанной с адгезией и агрегацией, приводят к повышенной кровоточивости или усилению тромбообразования и развитию патологических изменений кровообращения. При преэклампсии у беременных женщин возникающая повышенная агрегационная активность тромбоцитов может вызвать компенсаторное снижение их числа. Затяжные процессы в снижении числа тромбоцитов способны привести к процессам декомпенсации, развитию HELLP-синдрома: жизненно несовместимому падению числа тромбоцитов, снижению агрегационной способности тромбоцитов, приводящей к трудно устранимым кровопотерям [1]. Агрегационная активность тромбоцитов напрямую связана с повышенным уровнем цитоплазматического кальция и зависящих от него процессов. Целью исследования явилось изучение изменения кальциевого гомеостаза в тромбоцитах беременных женщин с преэклампсией.

Объектом исследования служили тромбоциты крови здоровых беременных женщин, составивших контрольную группу (23 пациентки) и беременных с установленным на 37-39 неделе беременности диагнозом – преэклампсия (19 пациенток). Забор крови у пациенток проводили при обязательном контроле отсутствия в течение месяца приема препаратов, влияющих на агрегацию тромбоцитов. Внутриклеточную концентрацию свободных ионов кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ) в тромбоцитах определяли флуоресцентным методом с использованием кальциевого зонда флуора 2-AM.

Нами получено, что в тромбоцитах, суспендированных в Хепес-буфере, содержащем 1 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$ , базальный уровень ионов кальция был выше в группе женщин с преэклампсией ( $82,1 \pm 4,2$ ) нмоль/л по сравнению с контрольной группой ( $60,6 \pm 3,5$ ) нмоль/л.

Агрегант-индуцированный переход тромбоцитов из состояния покоя в активированное состояние происходит посредством  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации. Результаты исследования показали, что в среде с кальцием в ответ на действие АДФ (20 мкмоль/л) достигаются более высокие значения внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  при преэклампсии, чем в контрольной группе ( $254,9 \pm 30,6$ ) нмоль/л и ( $215,4 \pm 17,1$ ) нмоль/л, соответственно).

При действии иономицина (50 нмоль/л) в присутствии тапсигаргина (ТГ) (1 мкмоль/л), являющегося ингибитором  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эндоплазматического ретикулума, концентрация ионов кальция в цитоплазме тромбоцитов, суспендированных в бескальциевой среде, здоровых беременных женщин и с преэклампсией, увеличивалась достигая равных, максимальных значений ( $592,1 \pm 67,5$ ) нмоль/л и ( $584,4 \pm 49,2$ ) нмоль/л, соответственно. Поскольку при действии иономицина в присутствии ТГ происходит полное опустошение кальциевых депо тромбоцитов, то полученные данные свидетельствуют о том, что количество цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$ , аккумулированного во внутриклеточных пулах тромбоцитов, для обеих исследуемых групп было одинаковым. Через 5 мин после активации,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в тромбоцитах здоровых беременных и с преэклампсией уменьшалась по сравнению с исходными максимальными значениями до разных уровней: ( $84,5 \pm 6,8$ ) нмоль/л и ( $101,2 \pm 13,7$ ) нмоль/л, соответственно, свидетельствуя о том, что скорость снижения уровня мобилизованного кальция в цитоплазме за счет его удаления  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортными системами плазматической мембраны, была значительно ниже в группе беременных женщин с преэклампсией по сравнению с контрольной группой. Полученные данные позволяют предположить, что в тромбоцитах беременных женщин с преэклампсией нарушены процессы, регулирующие скорость экструзии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  во внеклеточную среду.

Внутриклеточная концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  повышается за счет высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо и/или активации входа внеклеточных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через каналы плазматической мембраны. В настоящее время, методический прием с использованием бескальциевой среды, в которую добавляют 100 мкмоль/л ЭГТА для связывания примесных двухвалентных катионов, широко используется для определения вклада каждого из компонентов. В условиях ингибирования  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы плазматической мембраны снижение уровня мобилизиро-

ванных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле до базального способны обеспечить  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эндоплазматического ретикулума. В тромбоцитах идентифицированы 2 различные изоформы  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз – SERCA2b и SERCA3 [2, 3]. Специфическим ингибитором изоформы SERCA2b, которая является  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазой плотной тубулярной системы, является ТГ. SERCA3, представленная в содержащих кислую фосфатазу органеллах, обладает низкой чувствительностью к ТГ, но высокой к 2,5-ди-(tert-бутил)-1,4-гидрохинону (tBHQ).

Добавление ТГ в низкой концентрации (10 нмоль/л) приводит к росту  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  из-за выхода ионов кальция из плотной тубулярной системы. Данные показали, что концентрация ионов кальция после добавления ТГ была существенно выше у пациенток с преэклампсией (156,5±23,2) нмоль/л, чем в контрольной группе (94,1±7,1) нмоль/л. Аналогичные результаты были нами получены при изучении высвобождения ионов кальция с использованием tBHQ (20 мкмоль/л). После его добавления максимальная концентрация высвободившихся ионов кальция в группе с преэклампсией была (238,8±19,4) нмоль/л и (116,8±12,8) нмоль/л в контрольной группе.

Таким образом, нами установлено, что в тромбоцитах беременных женщин с преэклампсией нарушены процессы, регулирующие снижение уровня мобилизованных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле. Результаты настоящей работы свидетельствуют об изменении процессов регулирования  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза в тромбоцитах беременных женщин с преэклампсией, которое может быть связано с развитием повышенной агрегационной активностью тромбоцитов при данной патологии.

### Литература

1. Change in platelet count predicts eventual maternal outcome with syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count / B. Renhart [et al.] // *J. Matern. Fetal Med.* – 2001. – Vol. 10, № 1. – P. 29-34.
2. Cavallini, L. Two classes of agonist-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  stores in platelets, as identified by their differential sensitivity to 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin / L. Cavallini, M. Coassin, A. Alexandre // *J. Biochem.* – 1995. – Vol. 2. – P. 449-452.
3. Demonstration of two forms of calcium pumps by thapsigargin inhibition and radio-immunoblotting in platelet membrane vesicles / B. Papp [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266. – P. 14593-14596.

## ПОЛУЧЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕЛАНИНОВ ИЗ ТРУТОВЫХ ГРИБОВ

Курченко В.П., Сушинская Н.В., Азарко И.И., Чудновская Е.В.,  
Багманян И.А.

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Введение. Трутовые грибы широко распространены в средней полосе и являются перспективным возобновляемым источником для получения биологически активных веществ: меланинов, гликанов, хитина. Уже сейчас в пищевой и фармацевтической промышленности стран юго-восточной Азии нашли широкое применение представители этой группы грибов: *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Fomitopsis officinalis*, основным компонентом которых являются меланины. Актуальным является поиск новых источников получения меланиновых пигментов из плодовых тел афилофороидных грибов, вызывающих белую и бурую гниль древесины. Меланины – высокомолекулярные гетерополимеры нерегулярного химического строения, образующиеся в результате ферментативного окисления, аутоокисления и поликонденсации простых фенольных предшественников. В зависимости от источника получения меланины обладают различными физико-химическими свойствами, которые обуславливают их уникальные биологические активности: фотопротекторную, генопротекторную, сорбционную и др. [1, 2].

Целью работы являлась оптимизация условий получения меланинов из плодовых тел трутовых грибов, исследование физико-химических свойств и определение возможных путей их практического использования.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлись меланиновые пигменты, полученные из плодовых тел грибов, вызывающих бурую гниль древесины, – трутовика окаймленного (*Fomitopsis pinicola* (Sw.) P.Karst.), и белую гниль – трутовиков настоящего (*Fomes fomentarius* (L.) T.T.Kickx), плоского (*Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.), ложного (*Phellinus* (L.) Quél.) дубового ложного (*Phellinus robustus* (P.Karst.) Boverdot & Galzin), а так же стерильной формы трутовика скошенного – чаги (*Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pil.f.sterilis (Vanin) Nicol).

Меланины из плодовых тел трутовиков выделялись методом щелочной экстракции с последующим их осаждением соляной кислотой. Содержание углерода и водорода определяли сжиганием в быстром токе кислорода. Азот определили микрометодом Дюма в модификации Кли-

мовой [2]. Содержание кислорода рассчитывали по разности между массой беззольной навески и суммарным содержанием С, Н, N. Спектрофотометрические измерения проводили на “ Cary 50 Bio” (Австралия). Исследования электронного парамагнетизма осуществляли на спектрометре “Varian E-112” (США). Содержание парамагнитных центров (ПМЦ) определяли методом сравнения с аттестованным образцом угольного порошка с известным содержанием центров.

Результаты и их обсуждение. Меланиновые пигменты прочно связаны со структурными компонентами клеток грибов, что делает невозможным их полное извлечение без изменения структурно-функциональных свойств [1]. Для получения нативных меланинов, были применены щадящие условия экстракции. Это позволило получить меланины из различных видов трутовых грибов с характерными для них структурно-функциональными свойствами. Выходы меланинов составили: трутовик ложный – 1,7 %, трутовик дубовый ложный – 1,0 %, трутовик плоский – 6,0 %, трутовик настоящий – 8,0 %, трутовик окаймленный – 13 %, чага – 17 %.

Принадлежность полученных пигментов к меланинам была подтверждена комплексным исследованием качественных реакций на присутствие в их структуре хиноидных и фенольных компонентов, наличием парамагнитных центров, спектральными и другими свойствами [1]. С практической точки зрения важной характеристикой является растворимость меланинов. Полученные нами пигменты из трутовых грибов, вызывающих белую гниль, растворимы в воде и не растворимы в эфире. Меланины, выделенные из трутовых грибов, вызывающих бурую гниль, относятся к группе веществ, плохо растворимых в воде и эфирах. Важными характеристиками, определяющими физико-химические свойства полученных меланинов являются их элементный состав, спектральные и парамагнитные свойства. Как видно из таблицы, существуют закономерности элементного состава в зависимости от источника получения меланинов. Содержание углерода в меланинах из грибов, вызывающих бурую гниль значительно выше, чем в меланинах из грибов-возбудителей белой гнили. В содержании кислорода наблюдается обратная зависимость: для меланинов из грибов бурой бурой гнили характерно низкое содержание кислорода, а для меланинов из белых гнилей – высокое. Эти результаты объясняют амфотерные свойства меланинов, полученных из грибов, вызывающих белую гниль.

Таблица – Физико-химические характеристики меланинов из трутовых грибов

Источник меланина	Элементный состав, %					$\varepsilon^{0,001\%}$ , $l=1$ см				[ПМЦ] $\times 10^{17}$ спин/г
	вид гриба	С	Н	N	О	Н/С	УФС 240 нм	УФВ 285 нм	УФА 360 нм	
Трутовик окаймленный	65,9	9,0	1,5	18,1	0,14	0,081	0,044	0,021	0,008	3,6
Трутовик плоский	46,3	6,4	6,0	30,8	0,14	0,130	0,098	0,034	0,013	8,7
Трутовик настоящий	47,4	6,2	5,7	34,9	0,13	0,157	0,118	0,058	0,023	5,9
Трутовик ложный	42,5	5,0	2,0	38,3	0,12	0,196	0,154	0,096	0,028	3,3
Трутовик дубовый ложный	38,5	4,7	3,2	38,7	0,12	0,213	0,169	0,093	0,026	5,2
Трутовик скошенный (чага)	49,4	4,8	0,6	38,7	0,10	0,300	0,197	0,093	0,028	3,5

Полученные меланины обладают уникальными физико-химическими свойствами, которые обуславливают их фотопротекторную, генопротекторную, сорбционную и другие активности. Генерализованное поглощение в широком диапазоне длин волн в сочетании с антиоксидантными свойствами обеспечивает значительное уменьшение токсического действия УФ-излучения. Высокое содержание парамагнитных центров позволяет меланинам дезактивировать природные радикалы, за счет большой электронно-абсорбционной емкости этих соединений. Обратимое окисление-восстановление хинон-гидрохионовых структур позволяет меланинам участвовать в электронообменных процессах. Способность к эффективному комплексообразованию с ионами тяжелых металлов объясняется наличием у этих биополимеров большого количества функциональных групп [2].

### Литература

1. Лях С.П. Микробный меланогенез и его функции. М.:Наука. –1981. – 274 с.
2. Новиков Д.А., Курченко В.П., Азарко И.И. // Радиационная биология. Радиозкология. – 2001. – Т. 41. – № 6. – С. 664-670.

## **АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КАРБОНИЛОВ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЕ МОДИФИКАТОРЫ БИОАМИНОВ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И ДИАБЕТЕ**

**Ланкин В.З., Тихазе А.К.**

*ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный  
комплекс» Минздрава РФ, Москва, Россия*

Липопротеиды низкой плотности (ЛНП) плазмы крови представляют собой природные липид-транспортующие наночастицы. Обогащенные холестерином (атерогенные) ЛНП накапливаются в клетках стенки сосудов, принимая активное участие в формировании липофиброзных атеросклеротических бляшек, причем накопление ЛНП в стенке сосудов усиливается при их окислительной модификации. Нами установлено, что не перекисное окисление полиеновых ацилов фосфолипидного монослоя частиц ЛНП, а альдегид-зависимая модификация апопротеина В-100, входящего в состав ЛНП, ответственна за опознание и поглощение частиц ЛНП клетками стенки сосудов. Высоко реакционно-способные дикарбонилы (активные формы карбониллов) могут накапливаться в организме в качестве вторичных продуктов свободнорадикального окисления полиеновых липидов (малоновый диальдегид, МДА), а также в качестве продуктов автоокисления глюкозы (глиоксаль) и ее окислительных превращений по триозофосфатному пути (метилглиоксаль). Показано, что глиоксаль и метилглиоксаль являются более активными атерогенными модификаторами ЛНП, чем МДА. Кроме того показано, что модификация концевых аминокислотных групп белков при реакции с метилглиоксалем приводит к генерированию супероксидного анионрадикала. Соокисление полиеновых липидов частиц ЛНП (или фосфолипидных липосом) в присутствии глюкозы сопровождается, как показано нами, образованием супероксидных радикалов. В соответствии с этими данными установлено, что окисленность частиц ЛНП у больных сахарным диабетом с гипергликемией значительно выше, чем у больных атеросклерозом с гиперлипидемией. Обнаружено, что снижение активности эритроцитарных антиоксидантных ферментов при диабете связано с модификацией активного центра этих белков природными дикарбонилами, как видно из изменения кинетических характеристик гомогенных ферментных препаратов в процессе инкубации с МДА, глиоксалем и метилглиоксалем. Показано, что МДА увеличивает жесткость культивируемых эндотелиоцитов, тогда как глиоксаль, напротив, существенно

уменьшает ригидность этих клеток. Установлено, что обработка эритроцитов МДА увеличивает устойчивость этих клеток к гипосмотическому гемолизу, в то время как изомер МДА – метилглиоксаль, напротив, делает эритроциты более чувствительными к действию гипосмотической среды. Полученные данные, указывают на возможность разнонаправленного действия близких по строению низкомолекулярных дикарбониллов на структуру и функцию биомембран. Исследованные низкомолекулярные дикарбониллы легко диффундируют сквозь эритроцитарную мембрану и способны участвовать в образовании аддуктов с аминокруппами белков и аминоксодержащих фосфолипидов в мембране, приводя к модификации мембранной структуры. Очевидно, что диальдегид МДА может «сшивать» молекулы мембранных белков или участвовать в образовании «химерных» белок-липидных комплексов в мембране с участием аминоксфосфатидов, приводят к увеличению механической прочности мембран МДА-модифицированных клеток. В то же время, при взаимодействии метилглиоксалия с мембранными аминоксоединениями, кето-группа этого дикарбонила остается свободной, что должно приводить к увеличению общей полярности метилглиоксаль-модифицированной мембраны. Подтверждением такой возможности являются полученные нами ранее данные, указывающие на то, что накопление в липосомальной мембране более полярных, чем неокисленные ацилы, гидроперокси-ацилпроизводных фосфолипидов приводит к существенному уменьшению микровязкости, причем восстановление мембранных ацилгидропероксидов до еще более полярных спиртов сопровождается еще большим снижением микровязкости липосом. По аналогии с описанным процессом, карбонильная модификация аминоксоединений в мембране также должна сопровождаться неизбежным увеличением полярности и, как следствие, уменьшением микровязкости, что может влиять на осмотическую резистентность клеток. Очевидно, что меньшая чувствительность к механическому растяжению при гипосмотическом воздействии у более ригидных МДА-модифицированных эритроцитов вполне объяснима увеличением прочности наружных мембран вследствие образования поперечных сшивок. В то же время, уменьшение резистентности к гипосмосу метилглиоксаль-модифицированных эритроцитов объяснимо повышенной гидратацией мембран вследствие приобретения ими большей полярности, что должно приводить к «разрыхлению» мембран и снижению их механической прочности. При сахарном диабете отмечено увеличение содержания метилглиоксалия не только в плазме крови, но и в цитозоле эритроцитов, что сопровождается увеличением количества аминоксфосфолипида – фосфатидилсерина, экспонируемого на клеточной поверхности. Это приводит

либо к ускоренному апоптозу красных кровяных клеток (эритроптозу), либо к связыванию эритроцитов с эндотелием, что создает препятствия для нормальной микроциркуляции. Существует, вероятно, и другой механизм деградации модифицированных метилглиоксалем эритроцитов: поскольку макрофаги имеют специфические рецепторы для фосфатидилсерина, эритроциты с экспонированным на наружной мембране аминокислотным фосфатидом быстро опознаются, связываются и уничтожаются этими клетками. Можно полагать, что экспонирование фосфатидилсерина на клеточной поверхности эритроцитов обусловлено усиленным связыванием аминокислотного фосфатида с метилглиоксалем, приводящим к увеличению полярности фосфолипида. В соответствии с этим обработка ЛНП продуктом окислительных превращений глюкозы – метилглиоксалем сопровождается увеличением окисляемости ЛНП, вероятно, вследствие «разрыхления» наружного фосфолипидного монослоя, что в конечном итоге приводит к захвату окислительно модифицированных частиц ЛНП клетками стенки сосудов и накоплению в них эфиров холестерина из гидрофобного ядра частиц ЛНП. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о существенных изменениях структуры природных липид-белковых комплексов (биомембран, липопротеидов плазмы крови) при их модификации низкомолекулярными природными дикарбонилами, что может играть важную роль в патогенезе атеросклероза и сахарного диабета. Приведенные результаты свидетельствуют также о едином молекулярном механизме повреждения стенки сосудов при атеросклерозе и сахарном диабете (включающем образование карбонил-модифицированных ЛНП), что согласуется с известным фактом манифестирования атеросклероза при наличии сахарного диабета.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 14-15-00245.

## БИОСОВМЕСТИМЫЕ КОМПОЗИТНЫЕ МАТРИЦЫ НА БАЗЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ

Лялина Е.М.

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
физический факультет, Москва, Россия*

Тканевая инженерия основана на введении в организм тканеинженерной конструкции, состоящей из матриц-носителей, клеток и биологически активных веществ. Тканеинженерная конструкция должна быть биodeградируемая, стимулировать рост нужного типа ткани, чтобы, в конечном итоге, на ее месте была сформирована новая, естественная ткань [1].

Матрицы, которые используются в тканевой инженерии, должны отвечать определенным требованиям. Они должны быть биологически совместимыми и обладать определенной механической прочностью. Для интеграции с окружающими тканями, матрица должна имитировать структуру и морфологию естественной ткани. Для формирования матриц используются натуральные и синтетические биodeградируемые полимеры.

Коллаген является основным белковым компонентом внеклеточного матрикса и распознается клетками как благоприятная среда для роста и пролиферации [2]. Однако добавление коллагена в состав матрицы влияет на ее механические свойства.

Целью данной работы является формирование композитных матриц на базе полилактогликолида и коллагена с помощью сверхкритических флюидных технологий и изучение их механических и биологических характеристик.

Материалы: сополимеры молочной и гликолевой кислот. Биополимер коллаген. Медицинская биорезорбируемая сетка «Викрил».

Методы: формирование матриксов методом монолитизации порошковых материалов в сверхкритическом CO<sub>2</sub> [3]; проведение механических испытаний полученных композитных материалов на испытательной машине EZTest, модели EZ-SX, производства Shimadzu Corporation, Япония; тестирование матриц на цитотоксичность.

Ход работы. Образцы изготавливались из мелкодисперсного (размер частиц 50–100 мкм) порошка полилактогликолида (марки Purasorb PDLG 7507 производство “Puras”, Нидерланды) и его смеси с порошком коллагена I типа (размер частиц 100–200 мкм) в равных по массе пропорциях.

Формирование матриц – их монолитизация – происходило в пресс-формах, помещенных в кювету высокого давления. Обработка полимерных порошков проводилась при давлении  $\text{CO}_2$  – 15 МПа и температуре 42 °С в течение 1 ч. Через 24 ч после сброса давления полученные полимерные пластины извлекались из пресс-форм и из них вырезались образцы для механического тестирования. Для проведения механических испытаний были сформированы образцы в виде пластинок длиной 20 мм и шириной 10 мм. В средней части пластин с двух сторон были сделаны вырезы таким образом, чтобы в центре была образована перетяжка шириной 5 мм. Испытания проводились при комнатной температуре в условиях одноосного растяжения со скоростью перемещения 1 мм/мин.

В таблице представлены результаты механических испытаний 4 видов матриц: из чистого полимера, из полимера, армированного викриловой сеткой, из полимера, смешенного с коллагеном (композитные) и композитные матрицы с викриловой сеткой.

Таблица – Результаты механических испытаний

Толщина, мм	Модуль Юнга, Н/мм <sup>2</sup>							
	Полимер	$\Delta$	Полимер + викрил	$\Delta$	Композит	$\Delta$	Композит + викрил	$\Delta$
1	1,8	0,4	2,7	0,6	1,40	0,18	2,20	0,5
2	1,66	0,28	2,13	0,23	1,04	0,14	1,42	0,3
3	1,54	0,21	1,48	0,14	0,71	0,07	0,78	0,2

Примечание:  $\Delta$  – среднеквадратичное отклонение.

Сравнительно низкая механическая прочность композитных образцов объясняется тем, что во время обработки в сверхкритическом  $\text{CO}_2$  пластифицируется только полимер. Частицы коллагена оказываются включенными в полимерную пластинку (рисунок) и являются инициаторами образования трещин, что снижает механическую прочность конструкции. Включение в матрицы викриловой сетки, напротив, увеличивает их прочность, особенно, при малых толщинах образцов.

На цитотоксичность образцы тестировались *in vitro* с помощью культур фибробластов мыши линии NIH 3T3. Оценка жизнеспособности популяции проводилась с помощью окраски метилтиазолилдифенил-тетразолиум бромидом (МТТ-тест). Метод основан на том, что дегидрогеназы митохондрий восстанавливают желтый МТТ до пурпурного формазана. Реакция происходит только в живых клетках с активными митохондриальными ферментами. Тест показал отсутствие токсичности для всех типов матриц.

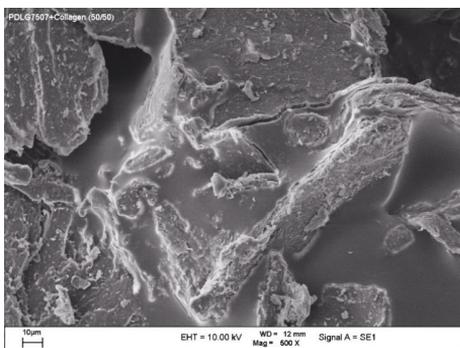


Рисунок – Микрофотография поверхности композитного образца

Выводы. Все исследуемые материалы показали отсутствие токсичности и могут быть использованы для формирования матриц тканеинженерных конструкций. По результатам механического тестирования была выявлена низкая прочность композитных образцов. При внедрении викриловой сетки прочность значительно возрастает, поэтому наиболее перспективными для создания матриц, с точки зрения механической прочности и биосовместимости, являются композиты полилактогликолида и коллагена с викриловой сеткой. Однако для окончательного определения оптимального состава и структуры матриц необходимо проведение дополнительных исследований.

### Литература

1. Henkel, J. Design and fabrication of scaffold-based tissue engineering / J. Henkel, D.W. Hutmacher // *BioNanoMat.* – 2013. – Vol. 14. – P. 171–193.
2. Shekhter, A.B. Connective tissue as an integral system: role of cell-cell and cell-matrix interactions / A.B. Shekhter // *Connect. Tissue Res.* – 1986. – Vol. 15. – P. 23-31.
3. Механические характеристики композитов полилактида и наноразмерных фосфатов кальция, сформированных в сверхкритическом диоксиде углерода / Е.А. Антонов [и др.] // *Сферкритические флюиды – теория и практика.* – 2011. – № 3. – С. 5-14.

**ПОВЫШЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ОРГАНИЗМА КРЫС  
ПРИ ПРЕВЕНТИВНОМ И ЛЕЧЕБНОМ РЕЖИМЕ ВВЕДЕНИЯ  
БИФЕРМЕНТНОГО КОНЬЮГАТА  
СУПЕРОКСИДИСМУТАЗА-ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТ-  
КАТАЛАЗА**

**Максименко А.В., Ваваева А.В., Звягинцева М.А., Абрамов А.А.,  
Лакомкин В.Л.**

*ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*

Использование в качестве лекарственных средств высокомолекулярных соединений открыло новую страницу терапии и инициировало формирование «новой биологии» и биофармакологии. В настоящее время успешно клинически используются ферментные препараты для тромболитика [1], полимерные комплексы на основе фармсополимеров (включая метакриловые) как пероральные терапевтические средства [2], конъюгаты с антителами для лечения онкологических поражений [3], плазменные конструкции с генами физиологически активных веществ для развития ангиогенеза [4]. Накопление значимых и интересных результатов наглядно свидетельствует об актуальности и продуктивности направления биомедицинских разработок новых лекарственных средств на основе высокомолекулярных соединений.

При известной междисциплинарности и многостадийности таких изучений (рисунок 1) они активно развиваются. Интенсивно ведутся работы по получению разных форм высокомолекулярных производных пригодных для медицинского применения. Указанный подход ярко проявляется в модификации природных биокатализаторов – ферментов. Ковалентное присоединение к Cu, Zn-супероксиддисмутазе низкомолекулярного гепарина повышало стабильность фермента против ряда воздействий [5]. Пролонгированное удержание в кровотоке, повышенную (в сравнении с нативным биокатализатором) стабильность против протеолиза и резистентность к действию ингибиторов демонстрирует бычья панкреатическая рибонуклеаза после её конъюгирования с поли [N-(2-гидроксипропил)метакриламидом] [6]. Такой конъюгат рибонуклеазы показывает улучшенную антиопухолевую активность. Модификация белков полиэтиленгликолем часто используется для увеличения времени их пребывания в организме, что отмечалось для производных гиалуронидазы [7] и лизоцима [8]. Антиоксидантный эффект овальбумина и ан-

тимикробная активность лизоцима повышалась после их гликозилирования галактоманнаном [9]. Использование антиоксидантных ферментных производных оказалось весьма эффективным в исследовании их модифицированных форм против поражающего действия окислительно-го стресса [10].

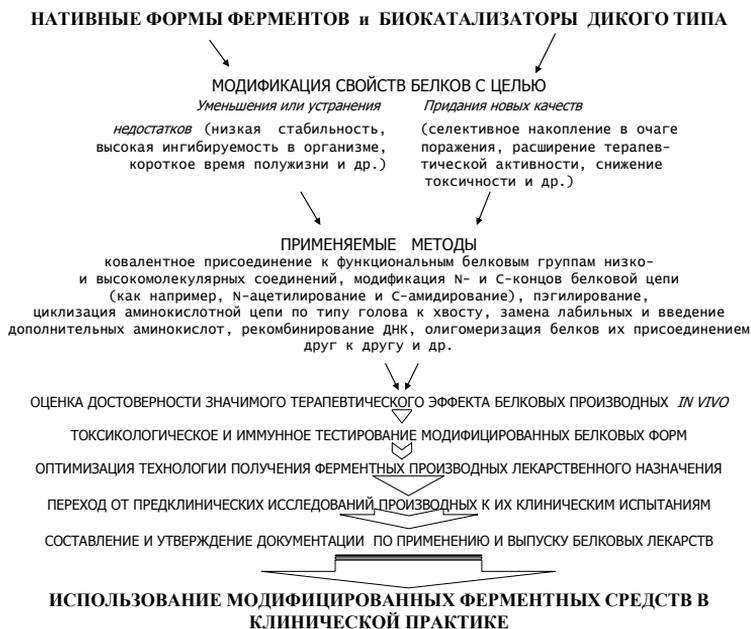


Рисунок 1 – Условное представление многоэтапности разработки и исследования новых модифицированных форм ферментов терапевтического назначения.

Развитие большинства сосудистых патологий сопровождается избыточным образованием активных форм кислорода – окислительным стрессом. Блокированию его развития и ликвидации последствий поражения служат антиоксидантные ферменты [11]. Заметную сосудопротективную активность продемонстрировал полученный и исследованный нами биферментный конъюгат супероксиддисмутазы-хондроитинсульфат-каталаза (СОД-ХС-КАТ) [1, 3, 10]. Интересно отметить, что биомедицинское изучение конъюгата СОД-ХС-КАТ не только способствовало определению режимов его потенциального применения

(рисунок 1), но и обосновывало последующие задачи исследования патогенеза сосудистых нарушений (в частности, определения в нем места и времени действия окислительного стресса).

На модели эндотоксического шока у крыс (индуцированного внутривенным болюсом бактериального липополисахарида (ЛПС)) было обнаружено достоверное повышение жизнеспособности их организма при превентивном (т.е. до введения инфекционного агента) режиме применения конъюгата СОД-ХС-КАТ. Показатель суточной выживаемости животных в группе эксперимента был достоверно в 1,4 ( $p < 0,03$ ) раза выше, чем в группе контроля. Более того, использование лечебного (т.е. с введением конъюгата после, а не до введения ЛПС) режима для внутривенного болюса СОД-ХС-КАТ продемонстрировало большую суточную выживаемость животных в экспериментальной группе в сравнении с контрольной (в 1,5 раза,  $p < 0,04$ ). Определенная значимая терапевтическая эффективность биферментного конъюгата обосновывает задачи последующих этапов изучения его лечебного действия  $\text{NO}$ -зависимым и  $\text{NO}$ -независимым образом и выяснения роли окислительного стресса в патогенезе сосудистых нарушений.

Настоящее исследование было поддержано грантом РФФИ 15-04-03584 и Министерством здравоохранения России.

### Литература

1. Максименко, А.В. Кардиологические биофармацевтики в концепции направленного транспорта лекарств: практические результаты и исследовательские перспективы / А.В. Максименко // Acta Naturae. – 2012. – Т. 4, № 3. – С. 76-86.
2. Мустафин, Р.И. Роль межмолекулярных взаимодействий полимеров фармацевтического назначения в функционировании пероральных систем доставки лекарств / Р.И. Мустафин // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. общ. им. Д.И. Менделеева). – 2012. – Т. LVI, № 3-4. – С. 97-101.
3. Максименко, А.В. Вариации разработок и применения терапевтических белковых конъюгатов нацеленного действия / А.В. Максименко // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. общ. им. Д.И. Менделеева). – 2012. – Т. LVI, № 3-4. – С. 89-96.
4. pCMV-vegfl65 intramuscular gene transfer is an effective method of treatment for patients with chronic lower limb ischemia / Deev R.V. [et al.] // J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. – 2015. – Vol. 20, № 5. – P. 473-282.

5. Characterization and stability investigation of Cu, Zn-superoxide dismutase covalently modified by low molecular weight heparin / Zhang H.W. [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2006. – Vol. 71 (Suppl. 1). – S96-S100.
6. Poly [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] conjugates of bovine pancreatic ribonuclease (RNaseA) inhibit growth of human melanoma in nude mice / Soucek J. [et al.] // *J. Drug Target*. – 2002. – Vol. 10, № 3. – P. 175-183.
7. Accumulation of extracellular hyaluronan by hyaluronan synthase 3 promotes tumor growth and modulates the pancreatic cancer microenvironment / Kultti A. [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 817613.
8. Freitas D., Abrahao-Neto J. Biochemical and biophysical characterization of lysozyme modified by PEGylation // *Int. J. Pharm.* – 2010. – vol. 392, No. 1-2, – P. 111-117.
9. Nakamura, S. Multi-functional biopolymer prepared by covalent attachment of galactomannan to egg-white proteins through naturally occurring Maillard reaction / S. Nakamura, A. Kato // *Nahrung*. – 2000. – Vol. 44, № 3. – P. 201-206.
10. Биофармакология ферментных конъюгатов: вазопротекторная активность супрамолекулярного производного супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза / А.В. Максименко [и др.] // *Acta Naturae*. – 2010. – Т. 2, № 4. – С. 90-103.
11. Maksimenko, A.V. Antioxidant enzymes as potential targets in cardioprotection and treatment of cardiovascular diseases. Enzyme antioxidants: the next stage of pharmacological counterwork to the oxidative stress / A.V. Maksimenko, A.V. Vavaev // *Heart Int.* – 2012. – Vol. 7. – P. 14-19.

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭДЕМОМЕТРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОРОЭЛАСТИЧНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЖИВОЙ ТКАНИ

**Мансуров В.А., Казущик В.Л., Кубарко А.И., Лещенко В.Г., Шотт А.В.**

*Белорусский государственный медицинский университет,  
Минск, Беларусь*

Простой способ установить локальные свойства материала – вдавливание – широко используется для характеристики различных материалов. Используя этот простой прием, А.В. Шоттом с коллегами был предложен метод оценки степени гидратации тканей (эдемометрия) [1] и разработано соответствующее устройство (рисунок 1). Принцип его работы основан на выдавливании жидкости из ткани посредством цилиндрической упругой мембраны, под которую нагнетается воздух под давлением 100 мм. рт. ст. (13,3 кПа). Выдавливание жидкости из ткани сопровождается понижением давления под мембраной, которое измеряется манометром (рисунок 2). Этот метод позволяет точно и быстро выявить нарушения гидратации тканей. Такие данные могут быть использованы для оценки адекватности инфузионной терапии. Усовершенствование устройства заключалось в подключении электронного манометра и микропроцессорной системы с целью сбора и передачи данных в персональный компьютер.



Рисунок 1 – Эдемометр

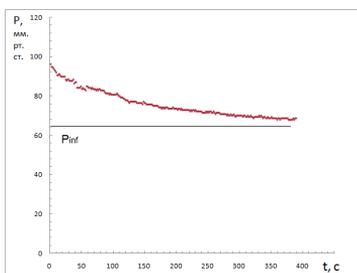


Рисунок 2 – Результат измерения

Это устройство наряду с выявлением нарушения гидратации может еще дать оценку важным механическим характеристикам живой ткани. В последнее время для моделирования механического поведения биологических тканей используют модель пороэластичной среды: твердая (эла-

стичная) среда образует матрицу с открытыми порами, жидкая среда находится в порах и может перетекать между ними [2]. Разработанный в настоящее время математический аппарат порозластичности пригоден для приближенного моделирования мягких биотканей. Данный математический аппарат успешно применялся в биомеханике для моделирования механического поведения при внешних воздействиях на некоторые ткани человеческого организма – хрящ, мозг, внутриклеточный транспорт. В работе [2] предлагается способ вычисления параметров порозластичности по взаимосвязи глубины погружения цилиндрического индентора в порозластичный материал напряжения в этом материале. Этот способ применим и для эдемометра.

Представим гетерогенную среду, состоящую из упругого каркаса и жидкости, заполняющей пространство внутри каркаса, среду, не подвергнутую внешней механической нагрузке [2]. Пусть  $C_0$  количество жидкости, приходящееся на единицу объема этой среды без механической нагрузки, и  $\mu_0$  – химический потенциал этой жидкости. При приложении механической нагрузки среда деформируется с вектором перемещения  $u_i(x_1, x_2, x_3, t)$ , образуя зависимое от времени поле относительной деформации  $\varepsilon_{ij} = (\partial u_i / \partial x_j + \partial u_j / \partial x_i) / 2$ . Закон сохранения масс жидкости, заполняющей каркас, требует выполнения условия  $\partial C / \partial t = -\partial J_k / \partial x_k$ , здесь  $C$  – количество жидкости, приходящееся на единицу объема этой среды, а  $J_k$  – поток жидкости, вызванный нагрузкой. Приращение объема жидкости пропорционально приращению объема среды, поэтому  $\varepsilon_{kk} = \Omega(C - C_0)$ ,  $\Omega$  – объем жидкости в образце среды, тогда химический потенциал жидкости изменится от  $\mu_0$  до  $\mu$  и механическое напряжение среды, в случае линейного приближения, определяется выражением  $\sigma_{ij} = 2G[\varepsilon_{ij} + \varepsilon_{kk}\delta_{ij}\nu / (1 - 2\nu)] - \delta_{ij}(\mu - \mu_0) / \Omega$ , здесь  $G$  – модуль сдвига среды,  $\nu$  – коэффициент Пуассона. Механическое равновесие среды определяется как  $\partial \sigma_{ij} / \partial x_j = 0$ . Однако в среде происходит движение жидкости, вызванное механической нагрузкой. При этом градиент химического потенциала вызывает поток жидкости, согласно закону Дарси:  $J_i = -(k / \mu \Omega^2) \partial \mu / \partial x_i$ , здесь  $k$  – проницаемость среды,  $\eta$  – вязкость жидкости. Комбинация приведенных выше выражений [2] дает выражение, похожее на уравнение диффузии  $\partial C / \partial t = D \cdot \nabla^2 C$ , с коэффициентом переноса  $D = [2(1 - \nu) / (1 - 2\nu)] G \cdot k / \eta$ , с негомогенными граничными и начальными условиями, и не может быть разрешимо без дополнительных взаимосвязей с другими задачами.

Цилиндрический индентор в виде мембраны эдемометра радиуса  $R$  погружается в биологическую ткань на глубину  $h$ , при этом возникает сила  $F(t) = P(t) \cdot 2\pi R^2$ ,  $P(t)$  – давление в эдемометре (рисунок 3). Для механического равновесия в биологической ткани необходимо, чтобы жидкость свободно перемещалась в зоне контакта, соразмерного с площадью мембраны. В момент времени  $t$  жидкость вытесняется на глубину порядка  $\sqrt{D \cdot t}$ , а релаксирующая сила может быть описана выражением:

$$\frac{F(t) - F(\infty)}{F(0) - F(\infty)} = g\left(\frac{D \cdot t}{a^2}\right), \quad (1)$$

здесь  $g(\tau) = 1.304 \cdot \exp(-\sqrt{\tau}) - 0.304 \cdot \exp(-0.254 \cdot \tau)$ ,  $\tau = D \cdot t / a^2$  – эмпирическая функция по результатам численного математического моделирования.

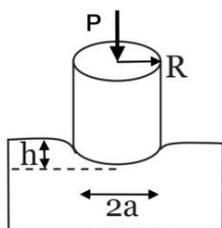


Рисунок 3 – Схема вдавливания в ткань

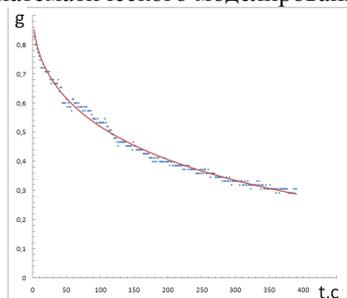


Рисунок 4 – Экспериментальные данные (точки) и выражение (1) (линия)

Уравнение равновесия позволяет вычислить силу в начальный момент времени  $F(0) = 8GhR$  и, следовательно, модуль сдвига, а коэффициент Пуассона выражается простой формулой  $F(0)/F(\infty) = 2(1-\nu)$ . Таким образом, из начальных и конечных условий получаются важные характеристики пороэластичности. Из приведенной на рисунке 4 кривой получилось  $G = 35$  кПа,  $\nu = 0,37$ . Посредством верификации выражения (1) по результатам измерения (рисунок 4) получено значение коэффициента переноса  $D = 2,5 \cdot 10^{-7}$  м<sup>2</sup>/с и из выражения  $D = [2(1-\nu)/(1-2\nu)]G \cdot k/\eta$  была вычислена проницаемость, которая оказалась равной  $k = 1,8 \cdot 10^{-14}$  м<sup>2</sup>, при вязкости жидкости  $\eta = 4$  мПа·с.

Таким образом, простейший прием – вдавливание позволяет получить физические характеристики биологической ткани: модуль сдвига, коэффициент Пуассона и проницаемость. Последняя характеристика, вероятно, связана с микроциркуляторными процессами.

## Литература

1. Основные итоги изучения микроциркуляции / А.В. Шотт [и др.] // Здоровоохранение. – 2012. – № 12. – С. 7–10.
2. Using indentation to characterize the poroelasticity of gels / Y. Hu [et al.] // Applied Physics Letters. – 2010. – Vol. 96. – P. 121904.

## ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФЕНОЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ ГЕМОЛИЗЕ ЭРИТРОЦИТОВ

**Мартинovich И.В.<sup>1</sup>, Дударков А.Н.<sup>1</sup>, Мартинovich Г.Г.<sup>1</sup>,  
Зенков Н.К.<sup>2</sup>, Меньщикова Е.Б.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*НИИ экспериментальной и клинической медицины,  
Новосибирск, Россия*

В соответствии с современными представлениями усиленная продукция активных форм кислорода (АФК) вызывает целый комплекс патологических процессов и ответных реакций клетки, ведущих к развитию окислительного стресса. Раскрытие механизмов окислительного стресса и поиск эффективных фармакологических препаратов, защищающих клеточные структуры от окислительного повреждения, является актуальной проблемой биофизики на протяжении многих лет. Однако регуляция клеточных редокс-процессов с помощью фармакологических препаратов представляет собой сложную и до конца не решенную задачу. На необходимость поиска и изучения механизмов действия новых антиоксидантов указывает и тот факт, что природные и синтетические антиоксиданты, использование которых ориентировано на ингибирование известных окислительных процессов, часто не обладают ожидаемой клинической эффективностью при лечении и профилактике заболеваний, в патогенезе которых важную роль играют окислители.

Эффективными регуляторами клеточных редокс-процессов являются природные и синтетические фенольные антиоксиданты. Несмотря на то, что структурные особенности фенолов, определяющие их антиоксидантные свойства в модельных системах, достаточно хорошо исследованы, взаимосвязь между биологическим действием фенольных препаратов и их антиоксидантными свойствами зачастую не выявляется.

Ранее нами было изучено влияние синтетических водорастворимых фенольных серосодержащих антиоксидантов 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфонат натрия (ТС-13) и 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиоэтанoат калия (БЭК-11-К) на пролиферативную активность опухолевых клеток и роль редокс-зависимых и кальций-зависимых сигнальных механизмов в реализации отклика опухолевых клеток на действие антиоксидантов [1, 2]. Обнаружено, что БЭК-11-К стимулировал пролиферацию, а индуктор сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE фенольный антиоксидант ТС-13 ингибировал рост опухолевых клеток в культуре. Показано, что при действии ТС-13 путем открытия пор высокой проницаемости через редокс-зависимый механизм индуцировался запуск митохондриально-опосредованного апоптоза.

В настоящем исследовании изучено действие синтетических водорастворимых антиоксидантов ТС-13 и БЭК-11-К, а также аскорбата натрия на процессы окислительного гемолиза эритроцитов. В сравнении с другими типами клеток, включая опухолевые, в эритроцитах отсутствуют такие важные внутриклеточные мишени действия фенолов, как белки митохондрий и белки сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE. Отсутствие внутриклеточных органелл и ряда систем внутриклеточной сигнализации позволяет использовать эритроциты в качестве простейшей клеточной модели для изучения действия новых антиоксидантов [3, 4].

Водорастворимые фенольные антиоксиданты ТС-13 и БЭК-11-К синтезированы в НИИ химии антиоксидантов (Новосибирск, Россия), как описано ранее [5]. В работе использовали эритроциты здоровых доноров. Гемолиз проводили в фосфатно-солевом буфере (10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137 мМ  $\text{NaCl}$ , 2,7 мМ  $\text{KCl}$ , 5 мМ D-глюкозы, pH 7,4) путем добавления 0,2 мМ хлорноватистой кислоты к суспензии эритроцитов. При определении влияния антиоксидантных препаратов на гемолиз эритроцитов исследуемое соединение вводили в суспензию клеток за 5 минут до добавления хлорноватистой кислоты. Антиоксидантный эффект ( $I_A$ ) определяли как долю неразрушенных эритроцитов, выраженную в процентах.

Показано, что исследуемые антиоксиданты в микромолярных концентрациях и выше дозозависимо снижали скорость окислительного гемолиза эритроцитов (рисунок 1). При действии синтетических фенольных антиоксидантов ТС-13 и БЭК-11-К наблюдался более сильный протекторный эффект, чем при действии аскорбата. В данной модельной системе из трех исследуемых антиоксидантов наиболее эффективным оказался БЭК-11-К (рисунок 2). Полученные нами результаты указывают на отсутствие взаимосвязи между биологическим действием фенольных

препаратов и их непосредственными антиоксидантными свойствами: так, БЭК-11-К и аскорбат натрия в микромолярных концентрациях стимулировали рост клеток линии НEr-2, а ТС-13, наоборот, вызывал их гибель [1, 2]. Таким образом, при разработке новых антиоксидантных препаратов наряду с изучением их антиоксидантных свойств важным этапом является изучение внутриклеточных сигнальных механизмов, регуляторы которых могут выступать исследуемые соединения.

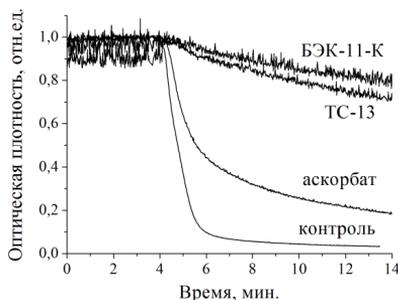


Рисунок 1 – Влияние антиоксидантов на гемолиз эритроцитов, концентрация антиоксидантов – 20 мкМ

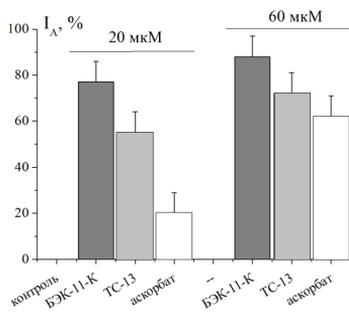


Рисунок 2 – Доля негемолизированных эритроцитов в присутствии антиоксидантов

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке БРФФИ (грант № M16P-022) и РФФИ (16-04-00050).

### Литература

1. Индуктор экспрессии ARE-регулируемых генов фенольный антиоксидант ТС-13 вызывает гибель опухолевых клеток через митохондриально-опосредованный путь / Г.Г. Мартинович [и др.] // Биофизика. – 2015. – Т. 60, № 1. – С. 120–128.
2. Редокс-свойства опухолевых клеток и их пролиферативная активность при действии фенольных антиоксидантов / Г.Г. Мартинович [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2015. – Т. 59, № 3. – С. 82–87.
3. Омарова Е.О. Ингибирование окислительного гемолиза эритроцитов митохондриально направленными антиоксидантами семейства SkQ / Е.О. Омарова, Ю.Н. Антоненко // Биохимия. – 2014. – Т. 79, № 2. – С. 187–195.

4. Способ оценки активности проникающего в клетки водорастворимого антиоксиданта: пат. 18425 Респ. Беларусь, МПК G 01 N 33/52 / Г.Г. Мартинович [и др.]; заявл. 10.06.2011; опубл. 30.08.2014 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2014. – № 4. – С. 154.
5. Антиоксидантные и противовоспалительные свойства новых водорастворимых серосодержащих фенольных соединений / Н.К. Зенков [и др.] // Биохимия.– 2007.– Т. 72, № 6.– С. 790–798

## **РЕГУЛЯЦИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕКТРОН- ТРАНСПОРТНЫХ ПРОЦЕССОВ КАК ОСНОВА РЕДОКС-БИОТЕХНОЛОГИЙ**

**Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Вчерашняя А.В.,  
Дударков А.Н., Черенкевич С.Н.**

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Важная роль редокс-процессов в поддержании жизнедеятельности клеток и необходимость изучения данных процессов для понимания патогенеза и коррекции многих функциональных нарушений, реализуемых при окислительном стрессе, обуславливает актуальность их изучения на протяжении последних лет. Показано, что эндогенные (пероксид водорода, глутатион, аскорбиновая кислота и др.) и экзогенные (антиоксиданты, прооксиданты и др.) редокс-активные соединения участвуют в регуляции широкого спектра биохимических и физиологических процессов, включая регенеративные и адаптационные процессы, иммунный ответ, дифференцировку стволовых клеток, пролиферацию и апоптоз [1-3]. В результате сопряженного функционирования оксидоредуктаз и низкомолекулярных редокс-активных соединений, в клетках поддерживается определяющий их жизнедеятельность редокс-гомеостаз, для количественной характеристики которого нами обоснованы новые физико-химические параметры – эффективный редокс-потенциал и редокс-буферная емкость [4-6].

Показано, что увеличение концентрации окислителей при нарушении редокс-гомеостаза играет важную роль в процессах старения организма и развитии различных заболеваний, включая онкологические, что обуславливает поиск эффективных регуляторов редокс-гомеостаза. С другой стороны, в области противоопухолевой терапии активно ведется

поиск более эффективных методов индуцирования гибели опухолевых клеток, в основе которых лежит не просто запуск окислительного стресса, а реализация «контролируемого окислительного стресса» [7-9]. Однако регуляция редокс-гомеостаза с помощью фармакологических препаратов является сложной и до конца не решенной задачей.

Обнаружено, что многие природные и синтетические антиоксиданты, использование которых ориентировано на ингибирование известных окислительных процессов, часто не обладают ожидаемой клинической эффективностью при лечении и профилактике заболеваний, в патогенезе которых важную роль играет окислительный стресс. Поэтому поиск и разработка эффективных средств и технологий регуляции редокс-гомеостаза является актуальной задачей современной медицинской биологии.

Биологический эффект действия редокс-активных соединений определяется не конкретной молекулой, а группой взаимодействующих участников, образующих электрон-транспортные цепи. Внутриклеточные электрон-транспортные процессы, протекающие с участием редокс-активных соединений, рассматриваются как один из способов передачи информации в клетках [10, 11]. В отличие от вторичных мессенджеров, участвующих во внутриклеточной передаче информационных сигналов, редокс-активные соединения функционируют как мессенджеры, переносящие электроны, или редокс-мессенджеры [3, 11].

Технологии управления функциональными свойствами клеток на основе регуляции клеточных электрон-транспортных процессов представляют собой новую группу биотехнологий, которую можно назвать редокс-биотехнологиями [9]. Установление закономерностей протекания электрон-транспортных процессов при регуляции пролиферации и гибели клеток, а также изучение механизмов действия гидрофобных и гидрофильных редокс-активных соединений, регуляторов активности оксидоредуктаз и регуляторов редокс-гомеостаза является необходимым этапом развития таких технологий.

В результате экспериментальных исследований, проведенных с использованием различных редокс-активных соединений (аскорбиновая кислота, монофенолы, *para*-бензохиноны и др.), нами описан новый путь редокс-регуляции программируемой гибели клеток, согласно которому запуск митохондриально-опосредованного апоптоза происходит в результате кратковременного усиления локальной продукции активных форм кислорода (АФК) за счет участия специфических оксидоредуктаз. Установлено, что образующиеся в митохондриях АФК являются участниками редокс-сигнальных процессов, ведущих к формированию мито-

хондриальных пор высокой проницаемости и запуску программируемой клеточной гибели. Нами показано, что активация данного механизма сопровождается снижением митохондриального мембранного потенциала и блокируется ингибитором пор высокой проводимости – циклоспорин А. Полученные результаты позволяют предположить, что важным условием функционирования установленного редокс-сигнального механизма является колокализация митохондриальных оксидоредуктаз, вовлеченных в образование АФК, и мишеней действия АФК, участвующих в механизме запуска апоптоза. Существенным элементом предложенного нами механизма также является зависимость данного пути передачи сигналов от величин параметров редокс-состояния клетки.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № М15-019).

### Литература

1. Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н. Окислительно-восстановительные процессы в клетках. – Минск: БГУ, 2008.
2. Jones, D.P. Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signaling / D.P. Jones // *J. Intern. Med.* – 2010. – Vol. 268. – P. 432–448.
3. Редокс-регуляция клеточной активности: концепции и механизмы / С.Н. Черенкевич [и др.] // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук.* – 2013. – № 1. – С. 92–108.
4. Martinovich, G.G. Intracellular redox state: towards quantitative description / G.G. Martinovich, S.N. Cherenkevich, H. Sauer // *Eur. Biophys. J.* – 2005. – № 7. – P. 937–942.
5. Мартинович, Г.Г. Редокс-гомеостаз клеток / Г.Г. Мартинович, С.Н. Черенкевич // *Успехи физиологических наук.* – 2008 – Т. 39, № 3. – С. 29–44.
6. Redox buffer capacity of the cell: theoretical and experimental approach / G.G. Martinovich [et al.] // *Cell Biochem. Biophys.* – 2010. – Vol. 58, № 2. – P. 75–83.
7. Trachootham, D. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? / D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2009. – Vol. 8. – P. 579–591.
8. Wondrak, G.T. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities / G.T. Wondrak // *Antioxid. Redox Signal.* – 2009. – Vol. 11. – P. 3013–3069.
9. Редокс-биотехнологии как основа для новой стратегии в противоопухолевой терапии / Г.Г. Мартинович [и др.] // *Известия Нац*

- нальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. – 2012. – № 2. – С. 85–104.
10. Jones, D.P. Radical-free biology of oxidative stress / D.P. Jones // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2008. – Vol. 295. – P. C849–C868.
11. Martinovich, G.G. Redox regulation of cellular processes: a biophysical model and experiment / G.G. Martinovich, I.V. Martinovich, S.N. Cherenkevich // *Biophysics.* – 2011. – Vol. 56, № 3. – P. 444–451.

## **АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ИММУНОСТИМУЛЯТОРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ «ИММУНОВИР»**

**Мартынова М.А.<sup>1</sup>, Бушмакина И.М.<sup>1</sup>, Карпович А.И.<sup>1</sup>,  
Красочко П.А.<sup>2</sup>, Шуканова Н.А.<sup>1</sup>, Борисовец Д.С.<sup>2</sup>, Князева Е.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,  
Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии  
им. С.Н. Вышелецкого», Минск, Беларусь*

Важное значение в поддержании здоровья и продуктивности животных наряду с сердечно-сосудистой, эндокринной, нервной и другими системами имеет иммунная система организма. Развитие различных патологических процессов в организме животных, как правило, сопровождается возникновением иммунодефицита. Зачастую этому способствуют нарушения в рационе, повышенное давление различных ксенобиотиков, вызванное ростом химизации сельскохозяйственного производства и т.п., что приводит к появлению системных патологий, которые требуют коррекции с помощью различных лекарственных средств. Для коррекции иммунодефицита необходимо использовать иммуностимуляторы, которые приводят в норму иммунный статус организма, способствуют повышению эффективности многих лекарственных средств, лучшему заживлению ран, стимулируют процессы регенерации, обладают ростостимулирующими свойствами, оказывают адаптогенное действие и ослабляют влияние стрессов на организм.

В настоящее время в ветеринарии используется широкий спектр иммуностимуляторов различной природы, однако продолжает оставаться актуальной разработка и внедрение в практику новых отечественных вы-

сокоэффективных иммуностимулирующих препаратов для лечения и профилактики вирусных и паразитарных болезней животных.

В РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» создан новый иммуностимулятор бактериального происхождения для ветеринарии «Иммуновир» на основе липополисахаридов штамма № 22 бактерий *Bacillus subtilis*.

Известно, что иммуностимулирующие препараты не только оказывают влияние непосредственно на клетки иммунной системы, но и обладают детоксикационным, гепатопротективным действием и антиоксидантным эффектом [1].

Целью настоящей работы являлось исследование влияния нового бактериального иммуностимулятора на развитие процессов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в плазме и лимфоцитарной фракции крови животных, а также на уровень глутатиона в эритроцитах крови, как одного из ключевых элементов антиоксидантной защиты.

В работе использовали новый препарат «Иммуновир» и коммерческий иммуностимулятор «Альвеозан» – препарат сравнения. Кровь морской свинки в объеме 100 мкл вносили в 2 мл среды RPMI 1640, содержащей 0,1 % гентамицина сульфата, 1 % L-глутамин и 10 % эмбриональной сыворотки телят. К образцу добавляли 200 мкл исследуемого иммуностимулятора в концентрации 500 мкг/мл. Образцы помещали в суховоздушный CO<sub>2</sub>-инкубатор HERAcCell 150 и культивировали в течение 48 часов при 37 °С в присутствии 5 % CO<sub>2</sub>.

Лимфоциты из крови морских свинок выделяли стандартным способом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина. Концентрацию продуктов ПОЛ определяли по содержанию образовавшегося малонового диальдегида (МДА) с помощью теста с тиобарбитуровой кислотой. Концентрацию восстановленного глутатиона в эритроцитах, выделенных методом центрифугирования, определяли стандартным спектрофотометрическим методом с использованием реактива Элмана.

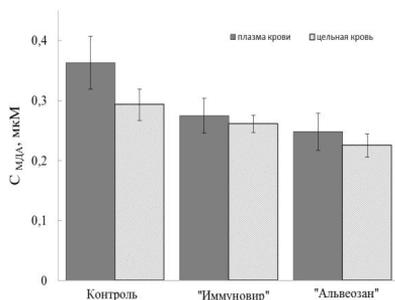


Рисунок 1 – Влияние иммуностимуляторов на накопление МДА в плазме и цельной крови животных

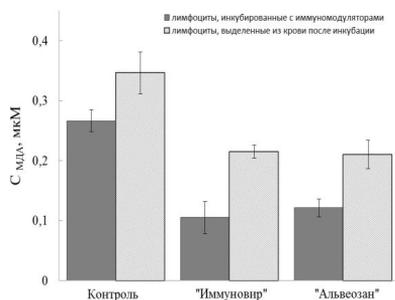


Рисунок 2 – Влияние иммуностимуляторов на накопление МДА в лимфоцитарной фракции крови

Кроме того, следует отметить, что оба иммуностимулятора существенно повышают концентрацию восстановленного глутатиона в эритроцитах крови животных (рисунок 3).

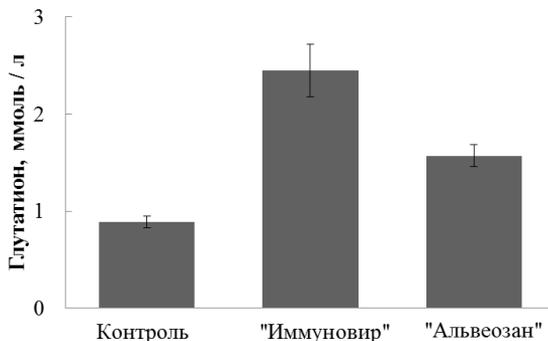


Рисунок 3 – Влияние иммуностимуляторов на концентрацию восстановленного глутатиона в эритроцитах

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ «Microsoft Excel 2010», «Origin 7.5». Результаты опытов обрабатывали статистически с вычислением средней арифметической, стандартного отклонения и достоверности различий (p) по критерию Стьюдента-Фишера.

Установлено, что как коммерческий препарат «Альвеозан», так и «Иммуновир», проявляют выраженный антиоксидантный эффект, т.е. ингибируют свободнорадикальные процессы ПОЛ в плазме крови, причем аналогичное влияние исследованных препаратов, хотя и менее выраженное (на 11,0–23,2 %), наблюдается и в цельной крови животных (рисунок 1).

Существенно больше амплитуда антиоксидантного эффекта иммуностимуляторов проявляется при исследовании лимфоцитов крови – уровень МДА падает на 54,5–60,5 % (рисунок 2). В ходе проведения этой серии экспериментов использовали два варианта: во-первых, инкубировали цельную кровь с препаратами, после чего выделяли лимфоциты и, во-вторых, в начале эксперимента выделяли иммунокомпетентные клетки, которые и культивировали в присутствии «Иммуновира» и «Альвеозана».

Таким образом, новый иммуностимулятор «Иммуновир» бактериального происхождения значительно повышает уровень восстановленного глутатиона в эритроцитах и подавляет процессы свободнорадикального пероксидного окисления липидов как в плазме крови, так и иммунокомпетентных клетках животных, причем его антиоксидантная активность выше, чем у известного коммерческого препарата «Альвеозан».

### Литература

1. Иммунокоррекция в клинической ветеринарной медицине / П.А. Красочко [и др.]; под редакцией П.А. Красочко // Мн. – Техноперспектива. – 2008. – 507 с.

## РЕАКЦИОННЫЕ СВОЙСТВА И АНТИАГРЕГАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ХЛОРАМИНА ТАУРИНА И ЕГО АНАЛОГОВ

**Мурина М.А.<sup>1</sup>, Рощупкин Д.И.<sup>1,2</sup>, Серова Т.М.<sup>1</sup>, Сергиенко В.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва  
<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Минздрава, Москва, Россия

В предупреждении внутрисосудистых тромбозов важную роль играют ингибиторы функций тромбоцитов (антиагреганты) и компонентов коагуляции плазмы крови (антикоагулянты) [1]. Нами обнаружено [2],

что эффективными антитромботическими соединениями являются хлорамины аминокислот и таурина, образующиеся в организме при активации фагоцитов [3]. Изучены физико-химические свойства, определяющие их антитромботическую активность. Хлорамин таурина и его аналоги сильно различаются по реакционной способности с серосодержащими аминокислотами и пептидами. N,N-Дихлортаурин реагирует с метионином гораздо медленнее, чем N-хлортаурин (рисунок 1), а при взаимодействии с глутатионом наблюдается обратная картина.

Непараметрическим квантовомеханическим методом ВЗЛР рассчитаны молекулярные характеристики, в частности, парциальные заряды Малликена для хлораминовой части и смежных атомов, определяющие реакционную способность аминокислотных хлораминов. Получена количественная корреляция реакционной способности исследуемых хлораминов с их молекулярными расчетными характеристиками [4].

Наибольшая антиагрегантная активность в суспензии изолированных тромбоцитов и в обогащенной тромбоцитами плазме характерна для N,N-дихлортаурина что, скорее всего, обусловлено модификацией сульфгидрильных групп в белках–рецепторах плазматической мембраны. Установлено, что модификацию тромбоцитарных рецепторов АДФ (пуринового рецептора P2Y<sub>12</sub>) и фибриногена (интегринa GP IIIa-IIIb) можно обнаружить турбидиметрическим методом, путем исследования кинетики агрегации тромбоцитов: зависимости начальной скорости от концентрации агониста АДФ. Проведено сравнение антиагрегационного действия хлораминов с действием АДФ и интегринa, соответственно конкурентных ингибиторов рецептора АДФ и фибриногена.

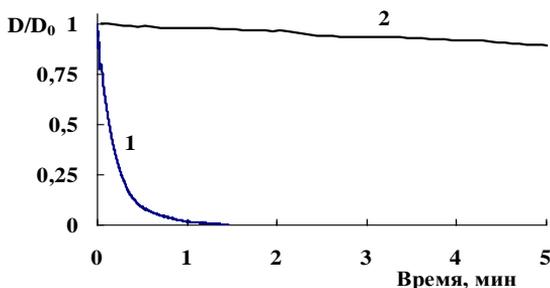


Рисунок 1 – Кинетические кривые взаимодействия N-хлортаурина (1) и N,N-дихлортаурина (2) с метионином (5 мМ). D – оптическая плотность при 260 нм (N-хлортаурин) или при 300 нм (N,N-дихлортаурин).

Концентрация хлораминов по хлору 0,5 мМ.

Из рисунка 2 видно, что при действии на обогащенную тромбоцитами плазму N,N-дихлортаурина максимальная скорость агрегации тромбоцитов не меняется, т.е. не меняется количество активных рецепторов, а уменьшается константа связывания АДФ. Такая картина, как хорошо известно, характерна для случая конкурентного ингибирования. Можно полагать, что модификация рецептора АДФ вне активного центра по остаткам цистеина влечет за собой его конформационные изменения и уменьшение активности. В случае N-хлортаурина картина иная: при слабом угнетении агрегации тромбоцитов максимальная скорость агрегации тромбоцитов существенно не меняется, но уменьшается константа связывания АДФ. С увеличением концентрации N-хлортаурина до 0,75 мМ, когда наблюдается значительное ингибирование агрегации тромбоцитов, максимальная скорость агрегации тромбоцитов снижается примерно в 2–3 раза, и определенной зависимости от концентрации АДФ не наблюдаем. Вероятно, это обусловлено модификацией фибриногенового рецептора. Аналогичное действие на агрегацию тромбоцитов оказывал структурный аналог хлорамина таурина N-метил-N-хлортаурин.

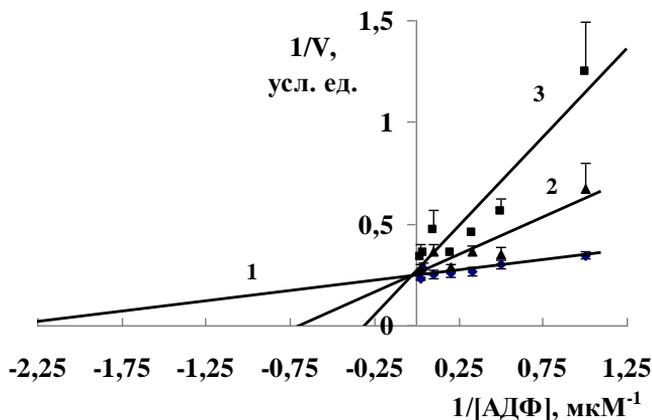


Рисунок 2 – Зависимость скорости агрегации тромбоцитов от концентрации АДФ в двойных обратных координатах: в контроле (1), в присутствии N,N-дихлортаурина в концентрации 0,25 мМ (2) и 0,5 мМ (3).

$V$  – начальная скорость агрегации тромбоцитов;  
 $[АДФ]$  – концентрации АДФ.

Было исследовано действие ингибитора фибриногенового рецептора – интегрилина. Интегрилин (20–26 мкМ) оказывал действие, аналогичное

N-хлортаурину: скорость агрегации тромбоцитов снижалась примерно в 2–2,5 раза и этот эффект существенно не возрастал при увеличении концентрации АДФ. Можно полагать, что хлорамин таурина при низкой концентрации модифицирует рецептор АДФ P2Y<sub>12</sub>, а при повышенной концентрации дополнительно инактивирует рецептор фибриногена.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ, грант № 16-04-00220.

### Литература

1. Kluge, A.F. Acylating drugs: redesigning natural covalent inhibitors / A.F. Kluge, R.C. Petter // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2010. – Vol. 14, № 3. – P. 421–427.
2. Противоагрегационное действие хлораминовых производных аминокислот на тромбоциты в присутствии плазмы крови / М.А. Мурина [и др.] // *Биофизика*. – 1997. – № 6. – С. 1279–1285.
3. Evidence for a role of taurine in the in vitro oxidative toxicity of neutrophils toward erythrocytes / E.L. Thomas [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 260, № 6. – P. 3321–3329.
4. Рошупкин, Д.И. Молекулярные характеристики и предсказание реакционных свойств структурных аналогов N-хлортаурина / Д.И. Рошупкин, К.В. Кондрашова, М.А. Мурина // *Биофизика*. – 2014. – Т. 59. – С. 1045–1050.

## ИННОВАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОТЕРАПИИ ГИПЕРБИЛИРУБИНЕМИИ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

Плавский В.Ю.<sup>1</sup>, Микулич А.В.<sup>1</sup>, Леусенко И.А.<sup>1</sup>, Третьякова А.И.<sup>1</sup>,  
Плавская Л.Г.<sup>1</sup>, Gao Jing<sup>2</sup>, Xiong Daxi<sup>2</sup>, Wu Xiaodong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт биомедицинской инженерии и технологий Китайской академии наук, Сучжоу, Китайская Народная Республика*

Введение. Фототерапия – основной и наиболее распространенный способ лечения гипербилирубинемии новорожденных детей – синдрома, обусловленного избыточным накоплением билирубина в крови и подкожном жировом слое ребенка. Метод основан на тотальном воздействии на поверхность тела младенца светом плотностью мощности 0,5–

2,0 мВт/см<sup>2</sup>, спектральный состав которого соответствует длинноволновой полосе поглощения билирубина ( $\lambda=400\text{--}530$  нм). Считается, что определяющую роль в снижении уровня билирубина в организме новорожденных под действием света играют процессы фотоизомеризации пигмента – образование его конфигурационных и структурных изомеров, которые являются более гидрофильными соединениями, чем нативный билирубин, и быстрее выводятся из организма. Однако, несмотря на широкое использование фототерапевтических технологий для снижения уровня билирубина у новорожденных, разработка эффективных и безопасных для ребенка методов терапии по-прежнему остается актуальной проблемой.

Цель данной работы – разработка инновационных методов повышения эффективности фототерапии за счет расширения (в пределах длинноволновой полосы поглощения билирубина) спектрального диапазона излучения светодиодных источников и оптимизации параметров воздействующего излучения.

Результаты и обсуждение. В настоящее время нет альтернативы использованию светодиодных источников в аппаратуре для фототерапии гипербилирубинемии новорожденных детей. Излучатели данного типа синей и сине-зеленой областей спектра значительно превосходят ламповые источники (ртутные, галогенные, металлогалогидные) по совокупности спектрально-энергетических и эксплуатационных характеристик. Аппаратура для фототерапии желтухи новорожденных детей на основе светодиодных источников: а) не содержит ультрафиолетовой и инфракрасной составляющих (оказывающих побочные неблагоприятные эффекты на новорожденного); б) обеспечивает регулировку интенсивности воздействующего излучения в зависимости от тяжести состояния новорожденного; в) превышает в десятки раз ламповые источники по ресурсу работы; г) характеризуется малыми масса-габаритными показателями; д) устойчива к механическим повреждениям и не представляет (в отличие от ртутных ламп) экологических проблем при нарушении ее целостности и при утилизации. Однако не подлежит сомнению и тот факт, что простая замена ламповых источников на светодиодные в фототерапевтических аппаратах не является гарантией более высокого лечебного эффекта. Как и для любого другого фототерапевтического аппарата эффективность снижения уровня билирубина в крови новорожденных определяется спектральным диапазоном и величиной плотности мощности применяемого излучения, а также долей площади поверхности тела ребенка, которая подвергается световому воздействию.

В последние годы в литературе активно обосновывается положение, что для эффективной фототерапии гипербилирубинемии новорожденных детей спектральный диапазон воздействующего излучения должен соответствовать не максимуму ( $\lambda_{\max}=460$  нм) спектра поглощения билирубина, связанного с альбумином, а его длинноволновому склону ( $\lambda=475$ – $490$  нм). Предполагается, что повышение эффективности фототерапии при переходе в длинноволновую область должно достигаться за счет снижения экранирующего действия гемоглобина и повышения квантового выхода образования люмирубина – фотопродукта билирубина, характеризующегося наибольшей скоростью экскреции. Однако, клинические исследования, выполненные с использованием светодиодных источников, не выявили ожидаемого 1,5-кратного увеличения эффективности фототерапии при переходе от светодиодных излучателей с  $\lambda_{\max}=459$  нм к  $\lambda_{\max}=505$  нм или 497 нм (терапевтическое действие оказалось равнозначным).

В настоящей работе впервые показано, что эффективность фототерапии гипербилирубинемии новорожденных при использовании узкополосных светодиодных источников зависит не только от положения максимума спектра испускания светодиодов в пределах полосы поглощения билирубина, но и от ширины спектра воздействующего излучения. Установлено, что расширение спектрального диапазона излучения (рисунок 1) за счет добавления к свету синего диапазона с  $\lambda_{\max}\approx 462$  нм зеленой компоненты с  $\lambda_{\max}\approx 505$  нм (в условиях одинаковой интегральной плотности мощности) приводит к повышению эффективности снижения уровня общего билирубина в крови новорожденных детей.

По нашему мнению, одна из причин повышения эффективности фототерапии при добавлении зеленой компоненты обусловлена увеличением облучаемых объемов крови и ткани, в которых инициируются реакции фотоизомеризации билирубина с повышенным выходом люмирубина, лежащие в основе терапевтического действия света при лечении гипербилирубинемии. Этот эффект объясняется различной глубиной проникновения оптического излучения синей и зеленой областей спектра в кожу и ткань новорожденного. При этом зеленая компонента способна вызывать фотоизомеризацию билирубина в сосудистом русле, недоступном воздействию излучения синей области. Другая причина повышения терапевтической эффективности света при расширении его спектрального диапазона состоит в гетерогенности спектральных характеристик билирубина в условиях различного микроокружения. Причиной гетерогенности являются: локализация билирубина в 3 различных сайтах молекулы альбумина, способного к тому же находится в различном агрегат-

ном состоянии как в сосудистом, так и внесосудистом руслах; существенное влияние жирных кислот и лекарств, связанных с альбумином, на структуру билирубина. Показано также, что, билирубин, связанный с митохондриальными структурами клеток, характеризуется повышенной фотохимической устойчивостью, отличающимися спектральными свойствами и способен выступать в качестве внутреннего фильтра, экранирующего оптическое излучение.

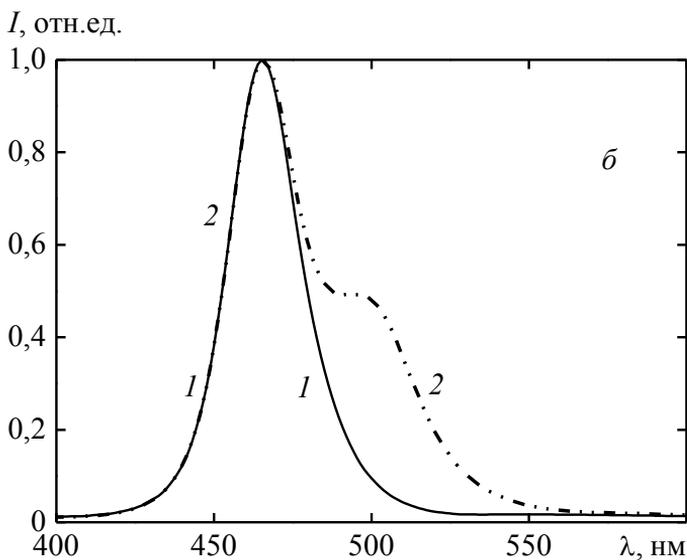


Рисунок 1 – Спектры испускания светодиодных источников синей (1) и сине-зеленой (2) областей спектра (б), используемых в фототерапевтическом аппарате для лечения гипербилирубинемии.

## ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА БЫКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ХЛОРАМИНА ТАУРИНА И ЕГО АНАЛОГОВ

Рошупкин Д.И.<sup>1,2</sup>, Мурина М.А.<sup>2</sup>, Кондрашова К.В.<sup>2</sup>,  
Сергиенко В.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова Минздрава», Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва

Хлорамины аминокислот и таурина (2-аминоэтансульфоновой кислоты) обладают антитромботической активностью благодаря их антитромбоцитным (антиагрегантным) свойствам [1]. Антитромбоцитное действие хлораминов аминокислот и таурина обусловлено ковалентной модификацией поверхностных белков. Из них наиболее важен рецептор P2Y<sub>12</sub> (рецептор АДФ). Хлорамины способны химически модифицировать в белках доступные сульфгидрильные группы и доступные сульфидные группы [2, 3]. Внеклеточная часть пуринового рецептора P2Y<sub>12</sub> вблизи центра связывания АДФ имеет остатки цистеина и метионина [4]. Следовательно хлорамины аминокислот и таурина могут инактивировать тромбоцитный рецептор P2Y<sub>12</sub> путем модификации указанных аминокислотных остатков. Поскольку эти остатки в рецепторе P2Y<sub>12</sub> не входят в центр связывания АДФ, инактивация рецептора хлораминами может произойти как следствие изменения его конформации.

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы методом регистрации спектров триптофановой флуоресценции обнаружить изменения под действием хлораминов таурина конформации сывороточного альбумина быка (САБ) как модели экстраклеточной части рецептора P2Y<sub>12</sub> в тромбоцитах. У поверхности молекулы САБ имеется свободный остаток цистеина и остатки метионина, с которыми взаимодействуют некоторые реактивные оксиданты. Вместе с тем, молекула САБ содержит два остатка триптофана; их состояние сравнительно легко контролировать с помощью спектрофлуориметрии в УФ области спектра. Флуоресцентные характеристики остатков триптофана в белках часто используют в качестве показателя конформации белковых молекул [5].

Флуоресценция САБ ослаблялась при добавлении всех исследуемых хлораминов, как это показано на рисунке в случае N-хлортаурина. Эффект возрастал при увеличении концентрации хлорамина. Однако даже

при молярном соотношении белок-хлорамин 1 к 10 снижение интенсивности флуоресценции составляло всего около 20 %. Это указывает на то, что хлорамин таурина ослабляет флуоресценцию не в результате прямого разрушения остатков триптофана, а косвенно за счет изменения микроокружения. В белках микроокружение остатков триптофана влияет также на спектральное распределение интенсивностей. Прямым измерением длины волны максимума нам не удалось обнаружить такого эффекта. Выявить небольшие сдвиги спектров флуоресценции белков можно путем определения отношения интенсивностей, измеренных в середине коротковолнового и длинноволнового склонах спектра [5]. Мы проверили возможность обнаружения слабых спектральных сдвигов флуоресценции САБ, используя отношение не интенсивностей, а светосумм. Мерой светосуммы флуоресценции была площадь, ограниченная значениями интенсивности и длин волн. Интенсивность измеряли в области 290–380 нм. Находили две светосуммы, рассчитываемые примерно от середины спектра флуоресценции: коротковолновую ( $S_1$ ) для области 291–339,6 нм и длинноволновую ( $S_2$ ) для области 339,8–379 нм. Светосуммы рассчитывали после смещения спектра в красную или синюю области с шагом 0,2 нм. Показателем спектрального смещения флуоресценции мы выбрали отношение светосумм:  $R=S_1/S_2$ . Из таблицы ( $R_0$  – исходное значение отношения) видно, что уже при незначительных смещениях спектра имеет место значительное изменение отношения светосумм.

	Смещение спектра								
	В синюю сторону					В красную сторону			
R/R <sub>0</sub> , %	104,72	103,53	102,34	101,17	100	98,84	97,68	96,54	95,41
Сдвиг, нм	0,8	0,6	0,4	0,2	0	0,2	0,4	0,6	0,8

Хлорамины инкубировали с белком (молярное соотношение 1:1) 3 минуты. Средние значения R/R<sub>0</sub> в случае N-изопропил-N-хлортаурина, N-ацетил-N-хлортаурина и N-хлортаурина после инкубации составили соответственно 98,6; 97,8 и 98,6 % и при увеличении длительности инкубации до 20 минут существенно не изменялись. Эти величины R/R<sub>0</sub> достоверно отличались от контроля. Эти данные показывают, что изученные хлорамины таурина вызывают сдвиг спектра флуоресценции САБ в длинноволновую область на 0,2–0,4 нм. Аминокислотные хлорамины окисляют SH-группу альбумина [6]. Можно предположить, что изученные хлорамины изменяют конфигурацию САБ за счет локальной модификации Цис34.

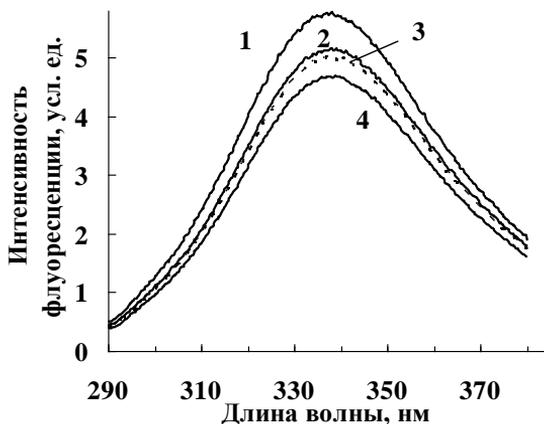


Рисунок – Изменение спектра флуоресценции САБ (16 мкМ) через 3 мин после введения N-хлортаурина. Кривые: 1–контроль; 2, 3 и 4 – конечная концентрация хлорамина 16, 80 и 160 мкМ, соответственно. Возбуждение флуоресценции при 280 нм.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ, грант № 16-04-00220.

### Литература

1. Мурина М.А., Рощупкин Д.И., Кондрашова К.В. Угнетение коагуляции плазмы крови и агрегации тромбоцитов структурными аналогами хлорамина таурина // Бюлл. exper. биол. мед. – 2014. – Т. 157. – С. 169–174.
2. Рощупкин Д.И., Кондрашова К.В., Мурина М.А. Молекулярные характеристики и предсказание реакционных свойств структурных аналогов N-хлортаурина // Биофизика – 2014. – Т. 59. – С. 1045–1050.
3. Peskin A.V, Winterbourn C.C. Histamine chloramine reactivity with thiol compounds, ascorbate, and methionine and with intracellular glutathione // Free Radic. Biol. Med. – 2003. – Vol. 35. – P. 1252–1260.
4. Zhang J., Zhang K., Gao Z.-G., et al. Agonist-bound structure of the human P2Y<sub>12</sub> receptor // Nature – 2014. – Vol. 509. – P. 119–134.
5. Konev S.V, Chernitskii E.A., Aksentsev S.L., Mazhul V.M., Volotovskii I.D., Nisenbaum G.D. Nondenaturational structural transitions of

- proteins and biological membranes // Mol. Cell. Biochem. – 1975. – Vol. 7. – P. 5–17.
6. Carr A.C., Hawkins C.L., Thomas S.R., et al. Relative reactivities of N-chloramines and hypochlorous acid with human plasma constituents // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – Vol. 30. – P. 526–536.

## **ЭЛЕКТРОННЫЙ ПАРАМАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС И СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ: ШЕСТЬДЕСЯТ ЛЕТ СПУСТЯ**

**Рууге Э.К.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва, Россия*

<sup>2</sup>*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*  
*Email: ruuge@mail.ru*

Еще в конце двадцатых годов прошлого века Л. Михаэлис, изучая окислительно-восстановительные реакции ряда металлоорганических соединений, пришел к выводу, что процессы двухэлектронного окисления-восстановления происходят через одноэлектронные стадии с образованием свободных радикалов в качестве промежуточных продуктов [1]. Однако лишь четверть века спустя Б. Коммонером [2] и Л.А. Блюменфельдом [3] вместе с их коллегами было экспериментально показано образование свободнорадикальных центров в биологических системах, благодаря использованию метода спектроскопии ЭПР. Необходимо отметить, что первые спектры ЭПР биологических объектов были зарегистрированы на лиофилизированных (замороженных, а затем высушенных в вакууме) образцах. Прошло всего несколько лет, когда модернизация спектрометров ЭПР уже позволила проводить измерения на водосодержащих образцах биологических тканей и изолированных ферментных систем [4]. В семидесятые годы были разрешены возникшие противоречия между экспериментальными данными, затрагивающими природу свободнорадикальных парамагнитных центров в лиофильно высушенных и водосодержащих биологических объектах. Можно считать доказанным, что вклад в свободнорадикальный сигнал ЭПР клеток и тканей вносят семихиноны коэнзима Q и флавиновых коферментов – переносчиков электрон-транспортной цепи митохондрий, а также свобод-

ные радикалы – промежуточные продукты других окислительно-восстановительных ферментных систем клетки. Значимую лепту в решение этого вопроса внесли работы нашей исследовательской группы [5-7]. Было показано, что вклад убисемихинонов и флавосемихинонов в регистрируемый свободнорадикальный сигнал ЭПР, а также спектральные характеристики этого сигнала зависят существенным образом от условий функционирования дыхательной цепи митохондрий. Нами проведены кинетические исследования свободных радикалов коэнзима Q и флавопротеинов в целых тканях и изолированных митохондриях, исследовано взаимодействие семихинонов коэнзима Q с другими переносчиками электрон-транспортной цепи митохондрий, изучены реакции коэнзима Q и флавопротеинов с активными формами кислорода и азота.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (6 грантов за 1996-2014 гг. и грант № 15-04-05211).

### Литература

1. Michaelis L. Oxidation-reduction systems of biological significance. 6. The mechanism of the catalytic effect of Fe on the oxidation of cysteine // *J. Biol. Chem.* – 1929. – V. 84. – P. 777.
2. Commoner B., Townsend J., Pake G. Free radicals in biological materials // *Nature* – 1954. – V. 174. – P. 689.
3. Блюменфельд Л.А., Калмансон А.Э. Спектры электронного парамагнитного резонанса нативных и денатурированных белков // *ДАН СССР* – 1957. – Т. 117. – С. 72.
4. Commoner B., Hollocher T.C. Free radicals in heart muscle mitochondrial particles: general characteristics and localization in the electron transport system // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1960. – V. 46. – P. 405.
5. Konstantinov A.A., Ruuge E.K. Semiquinone Q in the respiratory chain of electron transport particles // *FEBS Letters.* – 1977. – V. 81. – P. 137.
6. Ruuge E.K., Ledenev A.N., Lakomkin V.L., Konstantinov A.A., Ksenzenko M.Yu. Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion // *Am. J. Physiol.* – 1991. – V. 261. – P. 81.
7. Ruuge E.K., Kashkarov K.P., Lakomkin V.L., Timoshin A.A., Vasil'eva E.V. The redox state of coenzyme Q<sub>10</sub> in mitochondrial respiratory chain and oxygen derived free radical generation in cardiac cells // *Molec. Aspects Med.* – 1997. – V. 18. – P. S41.

## СВОЙСТВА НОВОГО НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ ДЛЯ ОПТИЧЕСКОЙ ТОМОГРАФИИ

**Самцов М.П.<sup>1</sup>, Тарасов С.Д.<sup>1</sup>, Каплевский К.Н.<sup>1</sup>, Жердева В.В.<sup>2</sup>,  
Меерович И.Г.<sup>2</sup>, Ляшенко Л.С.<sup>1</sup>, Луговский А.П.<sup>1</sup>, Луговский А.А.<sup>1</sup>,  
Воропай Е.С.<sup>1</sup>, Савицкий А.П.<sup>2</sup>, Насек В.М.<sup>1</sup>, Петров П.Т.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко БГУ,  
Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия*

Оптическая диагностика является многообещающим методом выявления локализации злокачественных новообразований. Необходимым условием его эффективного применения является наличие в сигнале от биологического объекта информации, которая позволяет различать нормальные и патологические ткани. В ряду известных оптических методов исследований биообъектов флуоресцентная диагностика ближнего ИК-диапазона обладает высокой чувствительностью и селективностью раннего обнаружения рака. По существу указанный метод основывается на анализе флуоресценции зондов в спектральном диапазоне 700–900 нм. В этой области наиболее низкий уровень поглощения света тканями при максимальной глубине проникновения излучения. Для решения задачи оперативного выяснения области локализации злокачественных новообразований могут использоваться флуоресцирующие соединения, обладающие заметно отличающимися свойствами в опухолевых тканях по сравнению с нормальными. Перспективными для такого рода исследований представляются полиметиновые красители (ПК), которые имеют полосы поглощения и флуоресценции в спектральной области прозрачности биологических тканей. Необходимо выяснить, насколько ощутимо различаются спектрально-люминесцентные свойства этих люминофоров в опухолевых и нормальных тканях. Настоящая работа посвящена выяснению обозначенных выше задач в отношении нового индотрикарбоцианинового красителя.

В качестве объекта исследований использован разработанный в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ симметричный индотрикарбоцианиновый краситель, который содержит в качестве заместителей полиэтиленгликоли. Фармакокинетика распределения фотосенсибилизатора в тканях после внутривенного введения водного раствора исследована на мышах линии Nu/Nu с помощью диффузного флу-

оресцентного томографа FMT 4000 (Perkin Elmer, США) при возбуждении на  $\lambda=745$  нм и регистрации в полосе 770–800 нм.

В работе использовались беспородные белые крысы с перевитыми в области бедра опухольями следующих штаммов: саркома M1 (SM-1), альвеолярный рак печени PC-1, карциносаркома Уокера (W-256). Для исследований отбирались группы из 6–8 животных с опухолевыми узлами правильной формы. Препарат вводили внутривенно в соотношении 0,3–1 миллиграмм на килограмм массы животных.

Спектры флуоресценции красителя *in vivo* регистрировались с помощью спектрометра, разработанного в НИИПФП им. А.Н. Севченко, в котором подвод возбуждающего излучения к исследуемому объекту и флуоресценции в полихроматор осуществлялись с помощью оптического волокна. Для учета уровня рассеянного света и собственной флуоресценции биологических тканей проводились контрольные измерения на интактных животных. Коэффициенты коррекции спектрометра по спектральной чувствительности определялись путем сравнительного анализа спектров испускания красителя в образцах тканей, которые регистрировались с помощью спектрометра и калиброванного по спектральной чувствительности спектрофлуориметра Fluorolog. Спектры поглощения красителей в растворах и образцах тканей регистрировались с помощью спектрофотометра PV 1251A, спектры флуоресценции – с помощью спектрофлуориметра Fluorolog фирмы Spex.

Максимум спектра поглощения красителя в этаноле  $\lambda=723$  нм, в хлороформе на  $\lambda=733$  нм, молярный десятичный коэффициент для обоих растворителей равен  $2,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ . Максимум спектра флуоресценции красителя в этаноле расположен на  $\lambda=749$  нм, в хлороформе на  $\lambda=761$  нм. Квантовый выход флуоресценции красителя в этаноле и в хлороформе имеет близкие значения 0,25 и 0,26, соответственно. В клетках HeLa максимум полосы поглощения красителя расположен на  $\lambda=735$  нм, а спектра флуоресценции практически совпадает со спектром в хлороформе, а также со спектром в тканях животных *in vivo* и расположен на  $\lambda=761$  нм.

При введении крысам разного количества красителя интенсивность его флуоресценции *in vivo* для мышц бедра и опухолей M1 и PC-1 увеличивалась пропорционально введенной дозе. Линейная зависимость этих параметров наблюдалась для всего промежутка времени проведения эксперимента. Соответствие интенсивности флуоресценции *in vivo* и концентрации красителя в опухолевых, мышечных тканях и в коже наблюдалось также при его экстракции из этих тканей. В совокупности полученные данные свидетельствуют, что регистрируемый сигнал флуоресценции красителя в тканях *in vivo* пропорционален его концентрации.

Содержание красителя как в опухолевых тканях, так и в нормальных максимально в течение первых 5 ч после введения, затем начинается плавный спад, через 2 суток наблюдаются только следовые его количества. Для саркомы М1 индекс контрастности через 1 ч после введения красителя составляет 3, затем увеличивается до 4. Содержание красителя в карциносаркоме Уокера на всем протяжении наблюдения в 1,2–3,6 раза выше, чем в тканях бедра крыс. И только в опухоли РС-1 содержание красителя в опухолевой и в мышечных ткани бедра примерно на одинаковом уровне, за исключением временного интервала 60–90 мин, когда индекс контрастности равен или близок 2. Следовательно, существуют временные интервалы после введения красителя, когда возможно определение границы опухолей путем регистрации интенсивности их флуоресценции.

В ходе экспериментов *in vivo* на флуоресцентном томографе получены данные по распределению красителя в органах Nu/Nu мышей с трансплантированной подкожно на левой стороне спины опухолью. В контроле до введения фотосенсибилизатора изображение в целом выглядит темным, с низким уровнем сигнала. После внутривенного введения красителя и двухчасового накопления на изображениях отчетливо визуализируется опухоль. С помощью томографа также зарегистрирована флуоресценция красителя локализованного в органах брюшной полости и определена концентрации фотосенсибилизатора. Полученные результаты подтверждены путем анализа спектров флуоресценции красителя в органах с помощью спектрометра с волоконным вводом. Минимальный уровень флуоресценции фотосенсибилизатора наблюдался в мышечных тканях.

Таким образом, краситель, обладающий поглощением света и флуоресценцией в области прозрачности биологических тканей, можно использовать в качестве флуоресцентного зонда опухолевых тканей. Интенсивность зарегистрированной с поверхности тела животных флуоресценции при введении красителя в диапазоне 0,3–1 мг/кг прямо пропорциональна его концентрации в опухолевых узлах и мышцах. В течение 2 суток после введения краситель практически полностью выводится как из организма животных. Наблюдаемые особенности накопления красителя в опухолях позволяют определять области локализации опухолевых узлов на фоне окружающих нормальных тканей.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ и РФФИ, а также Министерства образования РБ.

## ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ С НАКОПЛЕНИЕМ ЖЕЛЕЗА

Семенович Д.С.<sup>1,3</sup>, Лукиенко Е.П.<sup>1</sup>, Солонец К.В.<sup>2</sup>, Збирухович А.О.<sup>3</sup>,  
Смирнов А.А.<sup>3</sup>, Ястремская Н.С.<sup>3</sup>, Канунникова Н.П.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Институт биохимии биологически активных соединений  
НАН Беларуси», Гродно, Беларусь*

<sup>2</sup>*Гродненский государственный медицинский университет;  
Гродно, Беларусь*

<sup>3</sup>*Гродненский государственный университет им.Я.Купалы,  
Гродно, Беларусь*

При нейродегенеративных патологиях происходит активация внутриклеточных систем генерации активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА), которые приводят к модуляции про- и антиоксидантного статуса в нейронах и их дегенерации [1]. Эффективным способом моделирования окислительного стресса в головном мозге является введение липополисахарида (ЛПС) *Escherichia coli*, действие которого сопровождается индукцией перекисного окисления липидов (ПОЛ) и развитием системного воспаления.

Одним из пусковых механизмов развития окислительного стресса в головном мозге является накопление железа в базальных ганглиях. Избыточное накопление железа в базальных ганглиях способствует образованию устойчивых комплексов железа с цистеином, активирующих ПОЛ. Индукция ПОЛ и гиперпродукция АФК и АФА, в конечном итоге, приводят к запуску апоптоза и гибели нейронов [2]. Инициация ПОЛ в данных условиях протекает по механизму реакции Фентона. Подобным образом происходит повреждение нейронов при синдроме Галлевордена-Шпатца, связанного с нарушением экспрессии пантотенаткиназы-2 (PANK-2), играющей ведущую роль в биосинтезе кофермента А (КоА) [3].

Целью настоящего исследования явилось изучение возможного протекторного действия производных пантотеновой кислоты D-пантетина (ПТ) и D-пантенола (ПЛ) на показатели про/антиоксидантного статуса в плазме крови крыс при окислительном стрессе, моделируемом введением карбонильного железа (Fe) и ЛПС *E. coli*.

Постнатальным 10-дневным крысам линии Вистар массой 20±5 г в течение 5 дней внутрижелудочно вводили суспензию Fe (30 мг/кг в 1 %-

ном растворе крахмала). Контрольные крысы аналогично получали только раствор крахмала. Спустя 20 дней 30-дневным крысам, получавшим Fe, внутрибрюшинно вводили ЛПС (200 мкг/кг), с последующим 14-дневным пероральным введением ПЛ (группа Fe+ЛПС+ПЛ) или ПТ (группа Fe+ЛПС+ПТ) в дозах 200 мкг/кг. Повторное введение ЛПС в дозе 200 мкг/кг осуществляли за 24 ч до эвтаназии крыс.

Интенсивность процессов ПОЛ в плазме крови оценивали по содержанию ТБК-реагирующих соединений (ТБКРС) [4] и N,N-диметил-*n*-фенилендиамин-реагирующих соединений (ДФАРС) [5]. Содержание общих (белковых и небелковых) SH-групп измеряли колориметрически [6]. Феррооксидазную активность плазмы крови оценивали по содержанию церулоплазмينا (ЦП) [7]. Определение общей антиокислительной активности (ОАА) осуществляли в модельной системе по уровню торможения ПОЛ *in vitro* [8].

Исследования ПОЛ в плазме крови крыс выявило, что введение Fe и особенно Fe в комбинации с ЛПС сопровождалось увеличением содержания ДФАРС на 10 % и ТБКРС более чем на 45 % по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Введение крысам ПЛ на фоне введения Fe+ЛПС привело к снижению уровня ТБКРС на 26 % по отношению к группе Fe+ЛПС ( $p < 0,05$ ). Аналогичным образом проявился эффект ПТ, однако не столь выраженный, как у ПЛ. Увеличение содержания продуктов ПОЛ, очевидно, является следствием индукции окислительного стресса под влиянием Fe+ЛПС, а введение модуляторов биосинтеза КоА – ПЛ и ПТ – способствует ослаблению процессов свободнорадикального окисления *in vivo*.

Модулирование прооксидантно-антиоксидантного баланса в условиях окислительного стресса и системного воспаления оценивали также по показателю ОАА плазмы крови. Оказалось, что действие только ЛПС сопровождалось повышением ОАА на 16 %, тогда как на фоне действия Fe+ЛПС ОАА оказалась ближе к контрольным значениям. Производные пантотеновой кислоты способствовали дальнейшему возвращению ОАА к уровню контроля. По-видимому, сдвиги этого показателя были обусловлены в первую очередь системным воспалением, но не явлениями ОС.

Нами установлено, что введение и ЛПС, и Fe+ЛПС крысам способствовало повышению феррооксидазной активности плазмы, о чем можно судить по повышению уровня церулоплазмينا. Действие ПЛ способствовало возвращению данного показателя до значений, близких значениям в группе контроля. Влияние ПТ было более слабым.

Введение и одного ЛПС, и комбинации Fe+ЛПС привело к снижению содержания общих SH-групп в плазме крови более чем на 20 % в опытных группах ( $p < 0,05$ ), что можно расценить как следствие активации ПОЛ в плазме крови и сдвиг редокс-баланса в окисленную сторону. Действие на этом фоне и ПТ, и ПЛ не привело к модуляции данного показателя.

Таким образом, введение препаратов железа и ЛПС в использованных нами дозах приводит к напряженному состоянию прооксидантно-антиоксидантного баланса в организме, проявляющемуся в накоплении конечных продуктов ПОЛ, увеличении уровня церулоплазмина, снижении содержания общих SH-групп, но сохранившейся способности антиоксидантных систем в плазме крови. Производные пантотеновой кислоты – ПЛ и ПТ – проявляют в данных условиях определенное протекторное действие в отношении показателей активности ПОЛ.

### Литература

1. Васенина, Н.Е. Окислительный стресс в патогенезе нейродегенеративных заболеваний: возможности терапии / Н.Е. Васенина, О.С. Левин // *Соврем. терап. в псих. и неврол.* – 2014. – № 3-4. – С. 39–46.
2. Levi, S. Neurodegeneration with brain iron accumulation: update on pathogenic mechanisms / S. Levi, D. Finnazi // *Frontiers in Pharmacology.* – 2014. – Vol. 5. – № 99. – P. 1–20.
3. Chemical Knockout of Pantothenate Kinase Reveals the Metabolic and Genetic Program Responsible for Hepatic Coenzyme A Homeostasis / Y.-M. Zhang [et al.] // *Chemistry and Biology.* – 2007. – Vol. 14. – P. 291–302.
4. Стальная, И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Д. Гаришвили // *Современные методы в биохимии* / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина. – 1977. – С. 66–68.
5. Verde, V. Use of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine to evaluate the oxidative status of human plasma / V. Verde // *Free Radic. Res.* – 2002. – Vol. 36, № 8. – P. 869–873.
6. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – Vol. 82. – P. 70–77.
7. Ravin, H.A. An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin / H.A. Ravin // *J. Lab. Clin. Med.* – 1961. – Vol. 58. – P. 161–168.

8. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids / J. Stocks [et al.] // Clin. Science and Mol. Med. – 1974. – Vol. 47. – P. 215–222.

**ВОЗМОЖНОСТИ МОДУЛИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ  
ГЛУТАТИОНА И ЕЕ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛА В ЦНС  
В УСЛОВИЯХ СЕКВЕСТИРОВАНИЯ УНИВЕРСАЛЬНОГО  
КОФАКТОРА МЕТАБОЛИЗМА**

**Семенович Д.С., Омелянчик С.Н., Бородина Т.А., Шляхтун А.Г.,  
Сатановская В.И., Кондыба Н.И., Гуринович В.А., Пронько П.С.,  
Мойсеёнок А.Г.**

*ГП «Институт биохимии биологически активных соединений  
НАН Беларуси», Гродно, Беларусь*

Редокс-потенциал клеточных и тканевых систем приобретает роль ключевого биофизического фактора, регулирующего процессы иницирования и генерализации воспалительных реакций, клеточной адгезии, пролиферации и дифференциации клеток и их соотношения с развитием и степенью выраженности окислительного стресса [1, 2]. Объем окислительно-восстановительных реакций значительно превосходит сопровождающиеся двуэлектронным переносом, что с учетом массива тиолдисульфидных превращений различного уровня (прежде всего, опосредованных системой глутатиона и редокс-парой цистеин-цистин) объясняет широкий спектр редокс-чувствительных биообъектов и физиолого-биохимический феномен редокс-сигналирования. Число редокс-зависимых элементов функционирования и защиты нейронов исключительно велико, что позволяет формировать гипотезу о редокс-опосредованности важнейших нейродегенеративных синдромов [3, 4]. Впервые выявленный генетически детерминированный синдром нейродегенерации обусловлен дефектом биосинтеза кофермента А (КоА) – универсального кофактора более 100 метаболических реакций, среди которых образование ацетилхолина из ацил-КоА, рассматриваемого в качестве вторичного мессенджера [5]. Наконец, получил признание и стал экспериментальной технологией феномен «секвестирования КоА», т.е. образование неметаболизируемых ацил-КоА т.н. CASTOR (Coenzyme A sequestration, toxicity or redistribution), что с учетом редокс-свойств системы биосинтеза КоА и его роли в стабилизации внутриклеточного глу-

татиона открывает новые возможности для модулирования редокс-зависимых реакций при экстремальных и патологических состояниях организма [4].

Осуществлено моделирование сочетанного интоксикационно-дисметаболического синдрома на белых крысах посредством субхронической алкогольной интоксикации с развитием алкогольной зависимости и применения вальпроевой кислоты «секвестрирующей» свободный КоА в форму вальпроил-КоА и блокирующей редокс-трансформацию  $\text{CoA} \leftrightarrow \text{CoASSCoA}$  (КоASS-глутатион) и, вероятно, обратимое превращение глутатиона (GSH) и его дисульфидной формы (GSSG). Избыточное образование из алкоголя ацетальдегида в алкогольдегидрогеназной (АДГ) реакции и последующее окисление в альдегиддегидрогеназной (АлДГ) реакции в ацетат и, далее, в ацетил-КоА позволяют обосновать гипотезу о возможности в дисметаболической ситуации модулировать систему глутатиона и его редокс-статус в ЦНС как сочетанным применением алкоголя и «секвестатора», так и применением на этом фоне ксенобиотического предшественника КоА – D-пантенола, являющегося субстратом АДГ с высоким сродством к ферменту.

Форсированная алкогольная интоксикация (АИ) по Majchrowicz в модификации Е.Б. Тезикова (1991) осуществлена на половозрелых крысах-самках с начальной дозой этанола 5,0 г/кг внутрижелудочно и в течение последующих 4 суток в дозах от 1 до 5 г/кг в зависимости от индивидуальной переносимости. Одновременно с этанолом назначали вальпроат натрия в дозе 200 мг/кг/сутки или его композицию с D-пантенолом в дозе 400 мг/кг/сутки. Показатели системы КоА, глутатиона и активность ферментов метаболизма этанола исследовали в больших полушариях мозга используя верифицированные методы исследования и цитированные ранее.

Установлено, что в ЦНС алкоголизованных крыс происходит увеличение фракций кислоторастворимого КоА (КРКоА), что соответствует возросшему массиву метаболизма ацетата без его трансформации в длинноцепочечные ацил-КоА. Однако на фоне вальпроата наблюдается секвестирование свободной фракции кофермента, что обусловило падение КРКоА. Дополнительное назначение D-пантенола (ПЛ) предупредило эффект «секвестирования».

Подтверждены ранее известные для АИ проявления активации системы глутатиона при использовании неспецифического метода анализа (с нитробензоатом): увеличение GSH, GSSG, GSH+GSSG со значительной активацией глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ). Эта активация практически нивелировалась при назначении вальпроата

или его композиции с ПЛ. В отличие от эффекта этанола, в последних 2-х группах падало соотношение небелковых SH/SS групп, тогда как соотношение этих групп в белках больших полушарий мозга существенно возрастало. При этом выявлено нарастание процесса S-глутатионилирования белков не подвергшееся воздействию только АИ. На основании расчетных данных исходя из соотношения GSH/GSSG и  $E_0 = -240$  мВ величина редокс-потенциала (Eh) глутатиона увеличилась с  $-264,0 \pm 2,8$  (контроль) до  $-268,5 \pm 2,0$  (АИ) мВ. Возвращение показателя к нормальным значениям отмечено в группах с назначением вальпроата.

Дополнительное исследование фракций глутатиона с использованием глутатионредуктазного метода и модифицированного способа пробоподготовки выявило иную направленность изменения соотношения фракций и редокс-показателя. Установлено, что при АИ уровень GSH в ЦНС двукратно снижается при аналогичном возрастании GSSG и практически 4-х кратном падении соотношения GSH/GSSG. Степень модулирования показателей возрастает при композиции вальпроата с ПЛ. Величина Eh значительно снижена до  $-248 \pm 5$  мВ ( $-322 \pm 3$  мВ – контроль) возростала до  $-308 \pm 2$  мВ в группе сочетанного применения вальпроата и ПЛ.

На фоне развития интоксикационно-дисметаболического синдрома в организме подопытных животных активность ферментов метаболизма этанола оставалась практически стабильной, что показали результаты их исследования в печени за исключением группы с назначением ПЛ, где выявлен значительный рост активности АлДГ с высокой Км и АДГ. Активность первого фермента в ЦНС, напротив, снижалась в группах, подвергнутых «секвестированию» КоА и имеющих увеличенный редокс-потенциал глутатиона и нарушенный тиол-дисульфидный метаболический статус.

### Литература

1. Мартинович, Г.Г. Редокс-регуляция клеточной активности: концепции и механизмы / Г.Г. Мартинович [и др.] // Весті Нац. Акад. наук Бел. Сер. біял. навук. – 2013. – № 1. – С. 92–108.
2. Мартинович, Г.Г. Окислительно-восстановительные процессы в клетках / Г.Г. Мартинович, С.Н. Черенкевич. – Мн.: БГУ, 2008. – 155 с.
3. Chiurchiù, V. Is Modulation of Oxidative Stress an Answer? The State of the Art of Redox Therapeutic Actions in Neurodegenerative Diseases / V. Chiurchiù, A. Orlacchio, M. Maccarrone // Oxid. Med. Cell Longev. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1–11.

4. Hereditary and acquired diseases of acyl-coenzyme A metabolism / G.A. Mitchell [et al.] // Mol. Genet. Metab. – 2008. – Vol. 94. – P. 4–15.
5. Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger / F. Pietroccola [et al.] // Cel. Metab. – 2015. – Vol. 21. – P. 805–821.

## **ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ АМИЛОИДНЫХ СТРУКТУР И ИОНОВ СВИНЦА**

**Скоробогатова А.С., Зубрицкая Г.П., Лукьяненко Л.М.,  
Слобожанина Е.И.**

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,  
Минск, Беларусь*

Как известно, ряд веществ различной структуры, в том числе и металлы, могут вызывать генерацию активных форм кислорода (АФК) в клетках, в том числе и в эритроцитах. При этом в организме человека постоянно функционирует система антиоксидантной защиты, которая компенсирует активность процессов радикалообразования и поддерживает изначально низкий уровень АФК. При патологических состояниях или действии на клетки различных агентов (металлы, избыток кислорода и др.) возникает дисбаланс между активностью ферментов антиоксидантной защиты и генерацией АФК, что может привести к развитию окислительного стресса. На эритроцитах крыс было показано, что *in vitro* воздействие А $\beta$ -амилоида приводит к снижению активности ферментов антиоксидантной системы [1]. С другой стороны, известно, что ионы свинца могут индуцировать образование АФК в эритроцитах путем взаимодействия с оксигемоглобином и последующим перекисным окислением мембран; свинец способен изменять активность ферментов антиоксидантной защиты, а также концентрацию в клетках низкомолекулярных антиоксидантов [2].

С целью выявления эффектов сочетанного воздействия амилоидных структур и ионов токсичных металлов на эритроциты в данной работе изучено образование АФК в суспензии эритроцитов человека при воздействии на них зрелых фибрилл лизоцима в сочетании с ацетатом свинца в концентрации 7,5 мкМ. Для моделирования развития окислительного стресса в эритроцитах была использована третбутилгидроперекись (ТВН).

Материалы и методы. В работе использована кровь здоровых доноров в гепарине, полученная из ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий».

Амилоидные структуры были получены по методу [3] из растворенного в 10 мМ НСl (рН 2,0) лизоцима куриного яйца (Fluka) и выдержанного при 65 °С в течение 7 суток при постоянном перемешивании. Для определения уровня внутриклеточного образования АФК нами был использован флуоресцентный зонд 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (СМ-Н<sub>2</sub>DCFDA) [4]. Флуоресцентные измерения проведены на спектрофлуориметре СМ2203 («СОЛАР»)

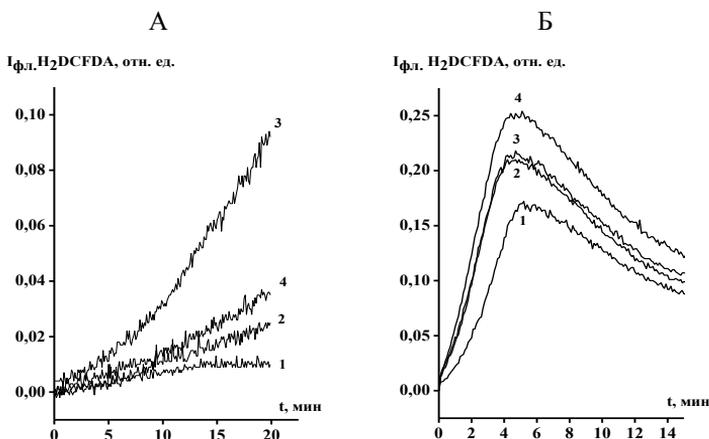


Рисунок 1 – Кинетика интенсивности флуоресценции СМ-Н<sub>2</sub>DCFDA в эритроцитах в зависимости от воздействия на клетки различных факторов: А: 1 – эритроциты в PBS-буфере (контроль) и при добавлении в среду инкубации: 2 – амилоидных фибрилл на основе лизоцима; 3 – 7,5 мкМ Рb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>; 4 – амилоидных фибриллы на основе лизоцима + 7,5 мкМ Рb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>; Б: 1 – эритроциты в PBS-буфере (контроль) и при добавлении в среду инкубации: 2 – амилоидных фибрилл на основе лизоцима + 1 мМ ТВН; 3 – 7,5 мкМ Рb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> + 1 мМ; 4 – амилоидных фибрилл на основе лизоцима + 7,5 мкМ Рb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> + 1 мМ ТВН.

Результаты. Известно, что СМ-Н<sub>2</sub>DCFDA не флуоресцирует в неизменном виде. Этот зонд свободно проникает через клеточную мембрану

и остается во внутриклеточном пространстве, где окисляется эстеразами до флуоресцентной формы (DCF).

Нами установлено, что воздействие амилоидных структур из лизоцима на эритроциты *in vitro*, а также их сочетание с ионами свинца не оказывает существенного влияния на параметры флуоресценции DCF в эритроцитах человека по сравнению с контрольными клетками (рисунок 1 А, кривые 2 и 4). При выдерживании эритроцитов в среде, содержащей только ионы свинца (7,5 мкМ), в течение 20 мин наблюдали значительное увеличение интенсивности флуоресценции используемого зонда по сравнению с контрольными клетками, а также с клетками, подверженными воздействию амилоидов и сочетанному воздействию амилоидов и ионов свинца.

Из рисунка 1 Б видно, что добавление 1 мМ ТВН приводит к возрастанию интенсивности флуоресценции DCF в контрольных клетках, что демонстрирует нарастание окислительных процессов в эритроцитах (кривая 1). После стимуляции клеток 1 мМ ТВН показано сокращение времени выхода на максимум кинетических кривых интенсивности флуоресценции DCF при воздействии на клетки амилоидных фибрилл и ацетата свинца. Особенно ярко это было выражено на суспензии эритроцитов, подвергшихся воздействию 7,5 мкМ ацетата свинца (рисунок 1 Б, кривая 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию амилоидных фибрилл из лизоцима, а также сочетанному воздействию ионов свинца и амилоидов, значительных изменений уровня свободнорадикальных соединений по сравнению с контролем не происходит. Обнаружено, что воздействие на эритроциты человека *in vitro* 7,5 мкМ ацетата свинца стимулирует образование АФК. При этом совместное воздействие ионов свинца и амилоидных структур на эритроциты, подвергшиеся окислительному стрессу (инкубация с трет-бутилгидроперекисью), повышает уровень свободнорадикальных процессов в клетках.

### Литература

1. Impact of amyloid  $\beta_{25-35}$  on membrane stability, energy metabolism, and antioxidant enzymes in erythrocytes / L.A. Tikhonova [et al.] // American journal of Alzheimer's disease and other dementias. – 2014. – Vol. 29, № 8. – P. 685-695.
2. Биоэлементный статус населения Беларуси: экологические, физиологические и патологические аспекты / Под редакцией Н.А. Гресь, А.В. Скального. – Минск, 2011. – 350 с.

3. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross – linking / B. Huang [et al.] // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48. – P. 5794-5800.
4. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry / A. Wojtala [et al.] // *Methods in enzymology*. – 2014. – P. 243-245.

## **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСА ЛАКТОФЕРРИНА И ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ С ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ**

**Соколов А.В.<sup>1</sup>, Власенко А.Ю.<sup>1</sup>, Костевич В.А.<sup>1</sup>, Луценко В.Е.<sup>2</sup>,  
Старикова Э.А.<sup>1</sup>, Васильев В.Б.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Ранее нами было показано, что катионный трансферрин экзокринных секретов и гранул нейтрофилов, лактоферрин (ЛФ), формирует специфический комплекс с медь-содержащим белком плазмы крови, церулоплазмином (ЦП), *in vivo* и *in vitro* [1]. Для многих белков молока, например альфа-лактальбумина, показано формирование комплексов с олеиновой кислотой (HAMLET) с выраженной активностью против раковых клеток [2]. Недавно цитотоксический комплекс с олеиновой кислотой был описан и для ЛФ из молока коров [3]. Целью нашей работы было сравнение возможности и специфичности образования *in vitro* и *in vivo* многокомпонентных комплексов, включающих ЛФ (человека и коровы), ЦП и олеиновую кислоту, а также функциональные последствия такого взаимодействия.

В течение 1-5 часов после внутрибрюшинной инъекции крысам ЛФ человека либо ЛФ коровы (100 мг/кг) мы обнаружили увеличение концентрации неэстерифицированных жирных кислот в 1,5-4,2 раза, а также образование гетерологичных комплексов ЦП крыс с ЛФ по данным Вестерн-блоттинга и специфической окраски активности ЦП *o*-дианизидином. В комплексе ЦП-ЛФ, выделенном из сыворотки крыс, была обнаружена олеиновая кислота, что подтверждает наше предположение о возможности образования комплекса между ними *in vivo*.

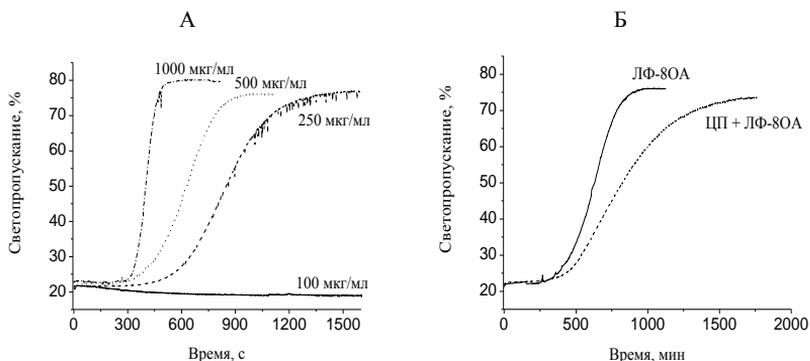


Рисунок 1 – Влияние ЛФ с олеиновой кислотой на эритроциты крови человека: А – типичные кинетические кривые гемолиза эритроцитов в фосфатно-солевом буфере, содержащем 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 мМ  $\text{MgCl}_2$  (рН 7,4), при добавлении различных концентраций ЛФ, содержащего 8 моль олеиновой кислоты на 1 моль ЛФ; б – типичные кинетические кривые гемолиза эритроцитов, инициированного добавлением 500 мкг/мл ЛФ, содержащего 8 моль олеиновой кислоты на 1 моль ЛФ, в отсутствие и в присутствии 300 мкг/мл ЦП

При добавлении раствора олеиновой кислоты в этаноле к ЛФ мы не наблюдали образования мицелл, характерного для смешивания олеиновой кислоты с водой и физиологическим раствором. Титрование ЛФ олеиновой кислотой показало, что один моль ЛФ может связать до 8 моль олеиновой кислоты. При этом ЛФ человека и коровы практически не отличались по способности к связыванию жирной кислоты. Оба комплекса показали практически идентичную аффинность к ЦП по данным электрофореза, поверхностного плазмонного резонанса и аффинной хроматографии на агарозном геле с иммобилизованным ЦП. Комплексы ЛФ с олеиновой кислотой индуцировали апоптоз раковых клеток (HL-60, ТНР-1, Jurkat) и лимфоцитов, выделенных из периферической крови человека, а также дозо-зависимым образом инициировали гемолиз эритроцитов (рисунок 1 А). Однако присутствие ЦП в среде предотвращало описанные цитотоксические эффекты. На рисунке 1 Б представлены данные по влиянию ЦП на гемолиз эритроцитов, индуцированный комплексом ЛФ и олеиновой кислоты.

Таким образом, взаимодействие ЦП с комплексом ЛФ и олеиновой кислоты может модулировать его цитотоксическую активность.

Исследование поддержано грантом Президента РФ МК-5074.2016.4.

### Литература

1. Sokolov, A.V. et al. // *Biometals*. – 2014. – Vol. 27. – P. 815-828.
2. Rath, E.M. et al. // *J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2015. – Vol. 18. – P. 773-824.
3. Fang, B. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1841. – P. 535-543.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГАЛОГЕНИРУЮЩЕГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Соколов А.В.<sup>1,2,3</sup>, Костевич В.А.<sup>1,2</sup>, Григорьева Д.В.<sup>4</sup>, Горудко И.В.<sup>4</sup>, Черенкевич С.Н.<sup>4</sup>, Васильев В.Б.<sup>1,3</sup>, Панасенко О.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России,  
Москва, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Сердечно-сосудистые заболевания сопровождаются развитием галогенирующего/окислительного стресса, опосредованного галогенирующей активностью фермента нейтрофилов, миелопероксидазы (МПО) [1]. Продукты катализа МПО,  $\text{HOCl}$  и  $\text{NOBr}$ , модифицируют практически все типы биомолекул, в том числе белки и липиды в составе липопротеинов низкой плотности (ЛНП) крови. Для модификации ЛНП с участием МПО важны как связывание фермента с их поверхностью, так и уровень активности МПО [2], регулируемый рядом факторов плазмы, в том числе ее физиологическим ингибитором, церулоплазмином (ЦП) [3]. Проведенные нами исследования показали, что ЛНП, модифицированные продуктами катализа МПО ( $\text{HOCl}$  и  $\text{NOBr}$ ) и карбонильными соединениями (малоновым диальдегидом, МДА и метилглиоксалем, МГ), являются

провоспалительными факторами, индуцирующими секрецию МПО активированными нейтрофилами и моноцитами-макрофагами.

Целью данной работы было получение специфических антител против ЛНП и ЦП, модифицированных НОС1 и НОВг (далее ЛНП/ЦП-С1 и ЛНП/ЦП-Вг); разработка методов иммуноферментного анализа (ИФА) для измерения концентрации ЛНП-С1, ЛНП-Вг, ЦП-С1 и ЦП-Вг; анализ корреляционных связей между показателями, измеренными в плазме пациентов с различной степенью тяжести сердечно-сосудистых заболеваний.

Нами были разработаны оригинальные методы оценки содержания МПО (ИФА) и ее активности (пероксидазная активность с использованием субстрата *o*-дианизидина), концентрации ЛНП-С1, ЛНП-Вг, ЦП-С1 и ЦП-Вг (ИФА), а также методы оценки соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем плазмы крови (пероксидазная активность плазмы с использованием субстрата *o*-дианизидина и доля непротеолизованного ЦП, обладающего антимиелопероксидазной активностью).

Для получения антигенов ЛНП либо ЦП инкубировали с НОС1 либо НОВг при мольном соотношении окислитель:апоВ-100=50:1, окислитель:ЦП=20:1 в течение 30 мин при 37 °С. Модифицированные ЛНП отделяли от нативных с помощью электрофореза в 1 % геле агарозы, вырезали из геля зону модифицированных ЛНП. Далее подвергали препаративному электрофорезу с SDS содержащийся в них апоВ-100, вырезали его зону из геля и использовали для иммунизации кроликов. Модифицированный ЦП отделяли от не окисленного белка с помощью диск-электрофореза в ПААГ, вырезали из геля зону модифицированного ЦП. Далее ЦП подвергали препаративному электрофорезу с SDS, вырезали белок из геля и использовали для иммунизации кроликов. Контролем служили препараты ЦП и апоВ-100 из нативных ЛНП, которыми иммунизировали крыс. После 4 иммунизаций с интервалом в 2 недели были получены антисыворотки против апоВ-100 из ЛНП-С1, ЛНП-Вг, а также ЦП-С1 и ЦП-Вг от кроликов. От крыс получали антисыворотку против нативных ЛНП и ЦП. Из сывороток выделили фракцию IgG. Для очистки антител от реакции с ЛНП либо ЦП, модифицированными МДА, проводили негативную аффинную хроматографию на агарозе с МДА-ЛНП либо МДА-ЦП. В качестве стандарта использовали препараты ЛНП и ЦП, модифицированные 20-молярным избытком НОС1 либо НОВг. Концентрацию модифицированных ЛНП и ЦП в образце плазмы крови выражали в нг/мл после сравнения оптической плотности образцов с калибровочными прямыми для модифицированных ЛНП и ЦП. Петля ЦП, соединяющая 5 и 6 домены (882-894, RRPYLKVFNPRRKL), содержит

связь лизин887-валин888, которая в первую очередь атакуется сериновыми протеиназами, лишаящими ЦП способности ингибировать МПО. В качестве антигена использовали пептид ЦП, CRRPYLKVFNPRRKL (881-894), конъюгированный по N-концевому остатку цистеина с аминокетонами гомоцианина виноградной улитки за счет малеимидного агента (сульфо-SMCC кросслинкер). Кроликов иммунизировали конъюгатом и после 4-ой иммунизации собирали антисыворотку, из которой выделяли фракцию IgG. Антитела очищали от примесей антител против гомоцианина улитки с помощью негативной хроматографии на колонке, содержащей агарозу с иммобилизованным гомоцианином улитки. Полученные антитела по данным Вестерн-блоттинга реагировали исключительно с 132 кДа зоной непротеолизованного ЦП и не реагировали ни с одним из протеолитических фрагментов ЦП.

При сопоставлении измеренных показателей на репрезентативном количестве образцов плазмы крови (n=69) от пациентов с различной степенью тяжести сердечно-сосудистых заболеваний нам удалось проследить ряд корреляционных связей, хорошо согласующихся с данными, полученными на экспериментальных моделях исследования проатерогенных свойств МПО. Во-первых, пероксидазная активность МПО в плазме крови положительно коррелировала с концентрацией МПО и отрицательно – с долей непротеолизованного ЦП, являющегося эффективным ингибитором МПО. Во-вторых, концентрация МПО положительно коррелировала с показателями галогенирующего стресса (концентрации ЛНП-С1, ЛНП-Вг, ЦП-С1 и ЦП-Вг) и отношением концентрации МПО к общей пероксидазной активности плазмы. В-третьих, показатели галогенирующего стресса демонстрировали высокий уровень корреляционных связей между собой (коэффициенты корреляции от 0,89 до 0,96). Наконец, соотношение концентрации МПО к пероксидазной активности МПО положительно коррелировало со всеми показателями галогенирующего стресса и отрицательным образом зависело от доли непротеолизованного ЦП в плазме. Пероксидазная активность гемоглобина, измеренная в образцах плазмы больных, не коррелировала ни с одним из показателей галогенирующего стресса и антиоксидантной защиты, что подкрепляет гипотезу об участии МПО в проатерогенной модификации ЛНП. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли галогенирующего стресса в атерогенной модификации ЛНП. ЦП, выполняя функцию природного ингибитора МПО, препятствует такой модификации, а значит и развитию атеросклероза.

Работа поддержана РФФИ (14-04-00807, 15-04-03620, 16-54-00038).

## Литература

1. Панасенко, О.М. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах / О.М. Панасенко, И.В. Горудко, А.В. Соколов // Успехи биологической химии. – 2013. – Т. 53. – С. 195-244.
2. Proatherogenic modification of LDL by surface-bound myeloperoxidase / A.V. Sokolov [et al.] // Chem. Phys. Lipids. – 2014. – Vol. 180. – P. 72-80.
3. Ceruloplasmin and myeloperoxidase in complex affect the enzymatic properties of each other / A.V. Sokolov [et al.] // Free Rad. Res. – 2008. – Vol. 42. – P. 989-998.

## КОМПЛЕКСЫ БЕЛКОВ НЕЙТРОФИЛОВ И МЕДИАТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ С ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ

Соколов А.В., Костевич В.А., Козлов С.О., Захарова Е.Т.,  
Васильев В.Б.

*ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
Санкт-Петербург, Россия*

Введение. Первым ответом на появление чужеродных микроорганизмов является стимуляция нейтрофилов, что сопровождается изменением их формы, адгезией, направленным движением в очаг повреждения, усиленным потреблением кислорода («кислородным взрывом»), дегрануляцией. Дегрануляция характеризуется слиянием цитоплазматических гранул с фагосомой, поступлением содержащихся в гранулах ферментов в фагосому и частичной секрецией этих ферментов во внеклеточное пространство. Примером патологической активности нейтрофилов является отторжение донорских органов при неэффективном удалении нейтрофилов из кровеносных сосудов во время перфузии. Логично предположить, что активация нейтрофилов непосредственно в кровяном русле должна сдерживаться в норме и при воспалении. Белки острой фазы, концентрация которых повышается при воспалении, могут выступать регуляторами функций иммунных клеток. Увеличение молярной концентрации церулоплазмينا (СР, ферро:O<sub>2</sub>-оксидоредуктаза) во время острой фазы воспаления (с 3 до 10 мкМ) уступает только увеличению концентрации таких мажорных белков плазмы, как фибриноген и гаптоглобин. Вместе с тем, в литературе нет однозначной точки зрения на функции СР

при воспалении. Как фермент, СР активно препятствует образованию и существованию свободных радикалов, обладая активностями ферроксидазы, купроксидазы, супероксиддисмутазы, глутатион-зависимой пероксидазы и NO-оксидазы. От присутствия гена СР зависит выживание нейронов при острофазном ответе на липополисахарид. С другой стороны, прооксидантные свойства приписывают меди, лабильно связанной с СР.

Методы. В работе использовали СР, выделенный из плазмы крови с помощью хроматографии на UNO-Sphere Q и неомицин-агарозе. Идентификацию белков проводили с помощью масс-спектрометрии фрагментов трипсинолиза. Трехмерные модели получали в сотрудничестве с к. ф.-м. н. В.Р. Самыгиной методами рентгеноструктурного анализа и рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами.

Результаты. Были охарактеризованы комплексы СР с катионными белками нейтрофильных лейкоцитов и медиаторами воспаления: лактоферрином, миелопероксидазой, эластазой, катепсином G, протеиназой 3, азуроцидином, 5-липоксигеназой, тромбином (FIIa). Анионный СР ( $pI \sim 4,7$ ) взаимодействует с катионными белками довольно стереотипно, но при этом наблюдается определенное разнообразие комплексов. Была показана высокая аффинность компонентов в образующихся комплексах. Так, сродство СР к лактоферрину и к азуроцидину характеризуется  $K_d \sim 13$  нМ. СР способен как *in vitro*, так и *in vivo* формировать мультимерные комплексы, включающие в себя лактоферрин и миелопероксидазу. Была изучена трехмерная структура таких комплексов, определены сайты взаимодействия, включающие контакт N-концевого катионного кластера лактоферрина с доменами 1 и 6 СР, лигандирующими ионы меди его активного центра, а также контакт лабильной к протеолитической атаке петли СР, соединяющей 5 и 6 домены белка с входом в гемовый карман миелопероксидазы. Лактоферрин, образовав комплекс с СР, увеличивает его ферроксидазную активность. Связывая лабильные ионы меди, лактоферрин защищает СР от деградации пероксидом водорода, индуцирующим в присутствии меди СР сайт-специфическую продукцию гидроксильных радикалов. Взаимодействие СР с миелопероксидазой приводит к ингибированию ее прооксидантной активности. Ингибируя хлорирующую активность миелопероксидазы, СР уменьшает проатерогенную модификацию липопротеинов низкой плотности. Ингибирующий эффект СР зависит от целостности его молекулы: частично протеолизированный СР не эффективен как ингибитор хлорирующей активности миелопероксидазы, а также не ингибирует синтез лейкотриенов 5-липоксигеназой. Нами было изучено взаимодействие СР с ключевыми

медиаторами воспаления – FIIa и MIF. Образование комплекса CP с FIIa приводит к ингибированию ферроксидазной активности CP. Конкурентное вытеснение CP из комплекса с FIIa с помощью лигандов экзосайтов I и II показало их участие в комплексообразовании. Протеолиз CP, опосредованный FIIa, приводит к выходу прооксидантных ионов меди из молекулы CP. Наличие протеолизованного CP в синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом совпадает с наличием активных FIIa и активной миелопероксидазы. В синовиальной жидкости обнаруживается как апо-форма CP, так и свободная медь.

Выводы. Таким образом, провоспалительные факторы, взаимодействующие с CP, влияют на целостность его молекулы и присутствие связанной с ним лабильной меди, что, в конечном итоге, определяет способность CP регулировать функции нейтрофилов в кровяном русле и очаге воспаления.

Работа поддержана грантами РФФИ № 15-04-03620, 16-04-01182 и грантом Президента РФ МК-5074.2016.4.

## **ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЙ ОБРАЗ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

**Стародубцева М.Н.<sup>1</sup>, Константинова Е.Э.<sup>2</sup>, Стародубцев И.Е.<sup>1</sup>,  
Кужель Н.С.<sup>2</sup>, Петренёв Д.Р.<sup>3</sup>, Егоренков Н.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Гомельский государственный медицинский университет,  
Гомель, Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт тепло- и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси,  
Минск, Беларусь*

<sup>3</sup>*Институт радиобиологии НАН Беларусь, Гомель, Беларусь*

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является методом внешнего силового зондирования наноиндентором твердых тел, позволяющим определять морфологические (структурные, геометрические) и физико-механические (упругие, фрикционные, адгезионные и др.) свойства поверхности. В АСМ наиболее часто используется опции топографии (запись рельефа поверхности), микроскопии латеральных сил (фрикционных сил – сил трения скольжения острия иглы-зонда, включая зонды со специально модифицированной поверхностью, по исследуемой поверхности), а также статической силовой спектроскопии. В последние годы АСМ начинает применяться в биологических и медицинских исследова-

ниях, наблюдается быстрый рост объема публикаций, посвященных работам по АСМ-изучению физико-механических характеристик клеток человека и животных, включая раковые клетки. Повышенный интерес исследователей к АСМ-анализу клеток объясняется не только его доступностью в связи с освоением производства АСМ во многих странах, включая Республику Беларусь (ОДО «Микротест машины», г. Гомель), уникальной возможностью исследования на микро- и наномасштабном уровнях клеток в мазках и в жидких средах, так и простотой подготовки клеток к АСМ-исследованиям. При АСМ-исследовании клеток получают характерный набор не взаимозаменяемых параметров их физико-механических свойств и связанных с ними структурных свойств клеточной поверхности, которые вместе составляют физико-механический образ поверхности (поверхностного слоя) клетки. Так как входящие в него параметры отражают способность материала клеточной поверхности отвечать на механическое воздействие, поэтому их значения зависят как от ее состава и структуры, так и условий осуществления тестирующего механического воздействия. Основной вклад в механические свойства поверхностного слоя клетки вносит кортикальный слой цитоскелета, как опорного элемента клетки.

Цель исследования – оценка эффективности использования физико-механического АСМ-образа клеточной поверхности для анализа типа и состояния клеток человека, включая раковые клетки.

Материалы и методы. В работе с помощью методов АСМ (микроскопии латеральных сил, топографии и силовой спектроскопии) изучены параметры локальных сил трения скольжения и адгезии между острием АСМ-зонда и поверхностью клетки, ее упругие характеристики (модуль Юнга), фрактальная размерность карт латеральных сил и карт рельефа участков поверхностного слоя клеток, геометрические параметры (контуры, топография, диаметр, высота и др.) целых клеток. Изучались адгезированные к стеклянным пластинам и обработанные в 0,5 % растворе глутарового альдегида раковые эпителиальные клетки карциномы легкого человека (A549), карциномы молочной железы человека (MCF-7), карциномы гортани человека (HEp-2c), а также мезенхимальные стволовые клетки (МСК), первичные фибробласты (ФБ) человека.

Результаты и их обсуждение. В мировой науке сейчас активно развивается метод анализа онкологической патологии на уровне клеток с использованием, в основном, одного параметра – локального модуля упругости, оцениваемого с помощью силовой спектроскопии. Дополнительная оценка параметров сил адгезии расширяет возможности выявления различия в механических ответах поверхностных слоев клеток

(например, раковых эпителиальных клеток различных типов). Так, выявлены различия параметров сил адгезии клеток линий A549 и HEp-2c при отсутствии различия параметров сил упругости для этих клеток. Значения локального модуля упругости определяли, как правило, при комнатных или физиологических температурах (обычно, 20 и 37 °C). Известно, что физико-механические свойства поверхности клеток существенно зависят от температуры окружающей среды, а характер их температурных зависимостей определяется типом и состоянием клетки. Вследствие этого АСМ-анализ клеток целесообразно дополнять анализом температурных зависимостей изучаемых свойств.

Наиболее информативным для анализа клеток является включение в набор АСМ-параметров физико-механического образа клеточной поверхности зависимости параметров сил трения скольжения между острием АСМ-зонда и поверхностью клетки от температуры ( $F_{тр}=\varphi(T)$ ) в широком диапазоне температур (15-90 °C) и зависимости фрактальной размерности карт латеральных сил поверхности клетки от коэффициента масштабирования оси  $z$  ( $D_F=\varphi(t)$ ). Эти параметры позволили дифференцировать разные типы клеток: не только клетки нормальных тканей (ФБ и МСК) и раковые клетки (A549, HEp-2c, MCF-7), а также раковые клетки одного типа, но разных подтипов (например, клетки с разной степенью активности цитоскелета, отражающей их потенциал метастазирования – 1-ый и 2-ой подтипы клеток линии A549) [1].

Нами показано, что при температурах 20-30 °C значения модуля упругости, сил адгезии, сил трения и фрактальной размерности карт латеральных сил для раковых клеток (A549, HEp-2c, MCF-7) меньше, чем значения соответствующих параметров для фибробластов, что свидетельствует о большей степени мягкости раковых клеток и лабильности их цитоскелета в сравнении с фибробластами [2]. Установлено, что по физико-механическим свойствам раковые клетки MCF-7 схожи с раковыми клетками A549 1-ого подтипа, а раковые клетки HEp-2c – раковыми клетками 2-ого подтипа.

**Заключение.** Выявлено различие физико-механических образов разных типов и подтипов раковых клеток, а также раковых и нераковых клеток. Физико-механический образ клетки может эффективно использоваться для контроля однородности культуры клеток, анализа изменения их состояния под действием факторов различной природы, а также для обнаружения патологии клеток, включая онкологическую патологию.

Авторы благодарят Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований за финансовую поддержку (Б14-042).

### Литература

1. Морфогеометрические и физико-механические параметры опухолевых клеток человека линий А549 и НЕР-2с, оцененные с помощью атомно-силовой микроскопии / М.Н. Стародубцева [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. – 2016. – № 1. – С. 60-66.
2. Физико-механические свойства поверхностного слоя раковых эпителиальных клеток, фибробластов и стволовых клеток человека / М.Н. Стародубцева [и др.] // Вестн. Фонда фундам. исследований. – 2016. – № 1. – С. 87-96.

### **ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА**

**Тарасов Д.С., Красненкова Т.П., Луговский А.П.,  
Каплевский К.Н., Самцов М.П.**

*Институт прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко БГУ,  
Минск, Беларусь*

Инфаркт миокарда и острое нарушение мозгового кровообращения являются основными причинами смертности в мире. Их доля в структуре летальных исходов превышает 25 % [1]. Значительным фактором в успешной терапии нарушения церебрального кровотока является своевременная и качественная диагностика. Для исследования дисфункции кровообращения с успехом используется ряд методик, к которым относятся транскраниальная доплерография, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, ангиография [2]. Эффективным методом для диагностики указанных нарушений является метод рентгенографии с введением контрастного вещества. Существенным недостатком метода является непереносимость пациентом в ряде случаев контрастного вещества [3], содержащего йод, а также высокая эффективная доза радиационной нагрузки (до 10 мЗв) [4]. Одним из перспективных направлений в решении данной проблемы является использование контрастных веществ, которые регистрируются методами оптической спектроскопии. Ряд исследований посвящен свойствам индоцианинового зеленого красителя с регистрацией его в кровотоке методами инфракрасной спектроскопии в ближней области [5].

Цель данного исследования заключалась в изучении элиминации индотрикарбозианинового красителя из церебрального кровотока у крыс с индуцированной глобальной ишемией мозга при регистрации изменения интенсивности сигнала в максимуме полосы флуоресценции красителя, возбуждаемой полупроводниковым лазером с длиной волны 683 нм.

Подвод возбуждающего излучения к мозгу животного и сбор света флуоресценции в спектрометре осуществлялись с помощью световода, свободный конец которого был закреплен по оси цилиндрического держателя (наконечника) с внутренним диаметром 3 мм на расстоянии нескольких миллиметров от среза. Применение такого наконечника, примерно, на порядок уменьшает разброс интенсивности в спектрах флуоресценции красителя при съеме информации от одной точки образца и составляет около 7 %. Регистрация спектров начиналась сразу после введения красителя и производилась непрерывно около четырех раз в секунду на протяжении всего времени наблюдения. Информация о величине сигнала в максимуме полосы флуоресценции оперативно поступала на монитор компьютера и затем сохранялась для дальнейшей обработки.

Экспериментальная модель глобальной ишемии мозга достигалась временной (10 мин) билатеральной перевязкой сонных артерий у крыс самцов Вистар ( $n=5$ ) под наркозом. До начала процедуры животным в хвостовую вену устанавливался катетер. Через 20 минут после формирования ишемии на поверхность затылочной области черепной коробки, тщательно освобожденной от покровных тканей и высушенной, устанавливался держатель со световодом. Через катетер вводился раствор индотрикарбозианинового красителя (2 мг/кг) и регистрировался сигнал убывания интенсивности контрастного вещества в церебральном кровотоке. Группой сравнения (контроль) являлись крысы самцы Вистар ( $n=7$ ), которые не подвергались операции.

Количественный показатель – константа элиминации ( $K_{el}$ ) красителя из кровотока. Данные обрабатывались методами непараметрической статистики и представлены в виде медианы с интерквартильным размахом  $M [25 \% : 75 \%]$ . Различия являются достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Полученные графики изменения интенсивности сигнала флуоресценции красителя от времени фитировались биэкспоненциальной зависимостью  $I(t)$ , коэффициент аппроксимации  $R_2=0,99$ . Такая кривая характерна для двукамерной фармакокинетической модели изменения концентрации лекарственного средства в крови, отражающей наличие фазы распределения и медленной фазы элиминации. В данном случае  $K_{el}$  ин-

дотрикарбоцианинового красителя в группе крыс, подвергнутых глобальной ишемии мозга, составил  $13,8 [10,8;19,4] \text{ с}^{-1}$ , тогда как в контрольной группе данный показатель –  $4,5 [3,8;7,9] \text{ с}^{-1}$  (различия достоверны,  $p=0,043$ ).

При глобальной ишемии мозга происходит разрушение гематоэнцефалического барьера, что приводит к быстрому выведению красителя из кровеносного русла в ткани мозга, что подтверждается 3-х кратным увеличением  $K_{el}$  по сравнению с контрольной группой.

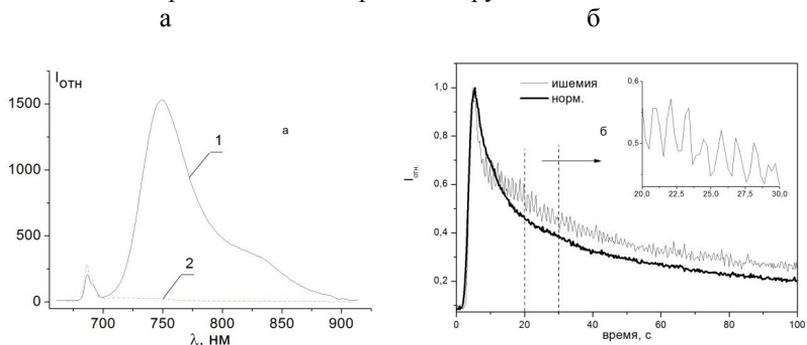


Рисунок – а – Спектр флуоресценции индотрикарбоцианинового красителя (1) и собственной люминесценции биотканей; б – динамика изменения интенсивности сигнала флуоресценции индотрикарбоцианинового красителя в тканях мозга крыс в условиях индуцированной глобальной ишемии

Метод регистрации изменения интенсивности сигнала флуоресценции индотрикарбоцианинового красителя в системе мозгового кровообращения крыс с помощью полупроводникового лазера длиной волны 683 нм в условиях экспериментальной церебральной ишемии позволяет оценить степень нарушения кровотока по изменению фармакокинетических параметров флуоресценции красителя.

## Литература

1. Mathers, C WHO. The Global Burden of Disease: 2004 Update / C. Mathers, D.M. Fat, J.T. Boerma – World Health Organization, 2008. – 146 p.
2. Mills, J.N. Advanced Imaging Modalities in the Detection of Cerebral Vasospasm / J.N. Mills [et al.] // Neurology Research International. – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 415960, 15 pages.
3. Синицын, В.Е. Применение ионных рентгеноконтрастных средств в современной лучевой диагностике. Вопросы клинической эффективности, безопасности и фармакоэкономики / В.Е. Синицын // Медицинская визуализация. – 2003. – № 1. – С. 121–127.
4. Einstein, A.J. Estimating risk of cancer associated with radiation exposure from 64-slice computed tomography coronary angiography / A.J. Einstein, M.J. Henzlova, S. Rajagopalan // JAMA. – 2007. – Vol. 298, № 3. – P. 317–323.
5. Mudra, R. Near-infrared spectroscopy extended with indocyanine green dye dilution for cerebral blood flow measurement: Median values in healthy volunteers / R. Mudra [et al.] // Opto-Electronics Review. – 2008. – Vol. 16, Issue 3. – P. 297–308.

## ИЗМЕНЕНИЯ КОНФОРМАЦИИ ТРОМБИНА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПОЛИАМИДОАМИННЫХ ДЕНДРИМЕРОВ

Терехова М.<sup>1</sup>, Брышевска М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,  
Минск, Беларусь,*

<sup>2</sup>*Кафедра Общей биофизики, Лодзьский университет, Лодзь, Польша*

Дендримеры – это сильноразветвленные синтетические макромолекулы, структуру которых можно точно контролировать при синтезе, что позволяет успешно использовать их в нанобиотехнологии в качестве посредников для целевой доставки препаратов в клетки при терапии различных заболеваний. Однако в определенных концентрациях дендримеры могут сами проявлять цитотоксичность, сводя на нет всю свою полезность при доставке лекарств. В данной работе исследовалось влияние полиамидоаминовых (РАМАМ) дендримеров на конформацию белка методом измерения флуоресценции. Флуоресценцию растворов белков обеспечивают ароматические аминокислоты (триптофан, тирозин, фе-

нилаланин), которые в третичной структуре могут быть ориентированы по-разному, что обеспечивает зависимость положения и интенсивности пиков флуоресценции от конформации белка. Таким образом можно установить факт изменения конформации белка под действием различных агентов, а также оценить степень этого изменения.

Цель работы: установить влияние гидрофильных и гидрофобных ПАМAM дендримеров на конформацию белка тромбина методом измерения флуоресценции раствора.

Материалы и методы. В эксперименте использован белок тромбин ( $M_w$  36,7 кДа), полученный в РНПЦ гематологии и трансфузиологии МЗ РБ. Дендримеры ПАМAM G4 (формула  $[NH_2(CH_2)_2NH_2]_n$  ( $G=4$ ),  $M_w$  14214,17 Да, содержат 64 поверхностных первичных аминогрупп) и ПАМAM-25 %  $C_{12}$  G4 (формула  $C_{1006}H_{2016}N_{250}O_{156}$ ,  $M_w$  20112,35, содержат на поверхности 48 первичных аминогрупп и 16 групп  $[N-(2-гидроксидодецил)]$ ), были приобретены в фирме Sigma-Aldrich (USA). Измерение флуоресценции раствора белка производилось на приборе Jasco-F6300 (Japan). Возбуждение молекул белка осуществлялось на длине волны 280 нм, измерение флуоресценции происходило на длинах волн от 310 нм до 450 нм с шагом 1 нм. Длина оптического пути составляла 1 см. Конечный объем раствора в кварцевой кювете составлял 2 мл. Конечная концентрация тромбина составляла 0,136 мкмоль/л, конечная концентрация дендримеров варьировалась по отношению к концентрации белка в следующем виде: 0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 10. Для дендримера ПАМAM G4 было произведено дополнительное измерение с отношением концентраций дендример-белок равным 15. Растворы тромбина и дендримера ПАМAM G4 готовились в фосфорном буферном растворе с pH 7,4, раствор дендримера ПАМAM-25 %  $C_{12}$  G4 готовился в этиловом спирте. В данном эксперименте измеряемыми параметрами выступали длина волны, при которой наблюдался пик флуоресценции, и интенсивность пика. В качестве контроля для ПАМAM G4 выступал раствор тромбина в фосфорном буфере, в качестве контроля для ПАМAM-25 %  $C_{12}$  G4 выступал раствор тромбина с добавлением этилового спирта.

Результаты. Обнаружено, что при добавлении дендримеров к растворам белка при повышении молярного соотношения "дендример:белок" для ПАМAM G4 наблюдается постепенное и небольшое снижение интенсивности основного пика при варьирующейся длине волны от 338 до 342 нм. В то же время при добавлении ПАМAM-25 %  $C_{12}$  G4 отмечалось резкое уменьшение длины волны пика до 329 нм, которое за-

тем оставалось постоянным, в то время как интенсивность пика возрастала по сравнению с контрольным образцом (рисунок).

Помимо этого, при добавлении дендримеров возникал второй пик флуоресценции в районе длин волн 410–434 нм. В случае с РАМАМ G4 этот пик обнаруживался лишь при высоких соотношениях концентраций дендримеров и белка (10 и 15), а также наблюдался в одном повторе в серии при соотношении концентраций 1:1. Для дендримера РАМАМ-25 % C<sub>12</sub> G4 второй пик появлялся начиная с самых низких соотношений и при увеличении концентрации дендримеров наблюдалось постепенное увеличение как длины волны, так и интенсивности пика.

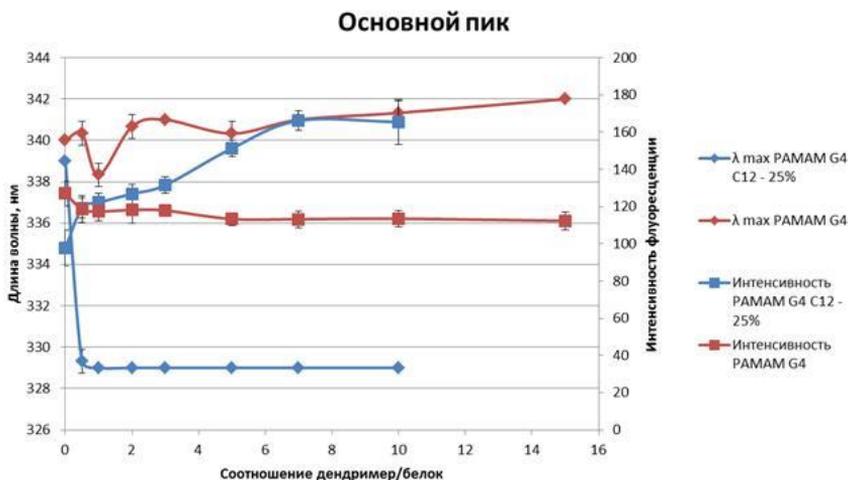


Рисунок – Изменения интенсивности и положения максимума флуоресценции тромбина в присутствии дендримеров в различных концентрациях.

Обсуждение. При сравнении графиков зависимости длины волны и интенсивности пиков флуоресценции раствора тромбина при добавлении различных дендримеров можно заметить, что изменения по сравнению с контрольным образцом при добавлении гидрофильного дендримера менее выражены, чем при добавлении гидрофобного. Особый интерес представляет появление второго пика флуоресценции, который отсутствовал в контрольных опытах и при добавлении низких концентраций дендримера РАМАМ G4. Следовательно, дендример РАМАМ-25 % C<sub>12</sub> G4 оказывал денатурирующее влияние на тромбин начиная с минималь-

ных концентраций, в то время как подобное влияние дендример РАМАМ G4 оказывал только начиная с 10-кратной молярной концентрации по отношению к концентрации белка, тогда как влияние низких концентраций было менее выраженным. Из этого можно сделать вывод, что применение в медицине гидрофобных полиамидаминных дендримеров может привести к нежелательным побочным эффектам в результате денатурации, а следовательно, к утрате функции белков (в частности тромбина), в то время как гидрофильные дендримеры потенциально могут не оказывать столь негативного влияния при низких концентрациях.

## **ГИПОТЕНЗИВНОЕ И ЦИТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ГЛУТАТИОНОМ ПРИ ИХ ВВЕДЕНИИ В ОРГАНИЗМ КРЫС РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ**

**Тимошин А.А.<sup>1</sup>, Лакомкин В.Л.<sup>1</sup>, Абрамов А.А.<sup>1</sup>, Рууге Э.К.,  
Ванин А.Ф.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*ФГБУ "Российский кардиологический научно-производственный  
комплекс" Минздрава России, Москва, Россия*

<sup>2</sup>*ФГБУН "Институт химической физики имени Н.Н.Семёнова" РАН,  
Москва, Россия*

Известно, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами являются одной из основных стабилизированных форм NO в организме животных и человека. Такие соединения осуществляют депонирование NO и перенос его к мишеням действия, а также обладают собственным антиоксидантным действием [1]. Целью работы являлось исследование переноса и накопления данных комплексов в ткани органов, а также их гипотензивного и защитного действия в результате введения препарата ДНКЖ с лигандом глутатионом (ДНКЖ-Глт) в организм крыс различными способами.

Эксперименты проводились на крысах линии Wistar. В ходе опытов осуществлялся мониторинг среднего АД (АДср) и его изменений в результате введения ДНКЖ-Глт. Содержание связанных с белками ДНКЖ в крови и ткани органов после инъекции данного препарата определялось исходя из их сигналов ЭПР при  $g=2,03$ . Для оценки уровня NO, включая его стабилизированные формы, применялась спиновая ловушка

на основе комплексов ионов железа и диэтилдитиокарбамата, а для регистрации спиновых аддуктов использовался метод ЭПР.

Ранее нами было показано, что внутривенное введение ДНКЖ-Глт способно инициировать существенный и пролонгированный гипотензивный эффект, сопровождающийся значительно более слабым увеличением уровня свободного NO в организме, по сравнению с другими препаратами [2].

В данной работе проводился анализ действия ДНКЖ-Глт при его введении в организм путём внутривенной, внутривнутрибрюшинной, внутримышечной и подкожной инъекций, а также ректально.

Установлено, что в результате внутривенного, внутривнутрибрюшинного, внутримышечного и подкожного введений ДНКЖ-Глт регистрируется существенный и продолжительный гипотензивный эффект, причем характер данного эффекта ДНКЖ зависит от способа его введения в организм. На начальном этапе опыта (в период до 20 мин после введения) наблюдается наиболее сильный гипотензивный эффект ДНКЖ-Глт, вводимого внутривенно, а на более позднем (от 40 мин после инъекции) – внутривенное и подкожное введения приводят к появлению практически одинаковых эффектов снижения АДср [3]. В результате ректального введения ДНКЖ-Глт гипотензивный эффект отсутствует.

Установлено, что после подкожной инъекции снижение АДср и накопление связанных с белками ДНКЖ в крови и ткани органов происходят более медленно, по сравнению с внутривенным введением, причём по общей продолжительности гипотензивного эффекта эти два способа введения препарата практически не отличаются друг от друга. Кроме того, подкожное введение препарата не приводит к образованию высоких концентраций ДНКЖ с белковыми лигандами в крови в начале опыта и характеризуется более эффективным накоплением этих форм депонирования NO в легких, по сравнению с внутривенной инъекцией.

Вероятно, что после подкожного введения эти комплексы депонируются, и далее сравнительно медленно переходят в кровь и в органы животного, причем наиболее вероятными местами их первичного депонирования могут быть подкожная жировая клетчатка и лимфа.

В другой части работы изучалось защитное действие ДНКЖ-Глт в условиях гиперпродукции NO в организме. Ранее нами было показано, что при введении данного препарата перед началом региональной ишемии миокарда в зоне окклюзии происходит избирательное накопление ДНКЖ с белковыми лигандами, инициирующими антиоксидантное действия, а также подавление гиперпродукции NO [2].

Кроме того, защитное действие ДНКЖ-Глт изучалось при естественном кровоснабжении организма в условиях воспаления, вызванного инъекцией липополисахаридов (ЛПС). При этом через 6 часов после введения крысам ЛПС содержание общего уровня NO в сердце, легких, печени и почках было существенно выше, чем в контроле, и наиболее заметный эффект наблюдался в печени животного. В другой экспериментальной группе, через 6 часов после последовательного введения животным ДНКЖ-Глт и ЛПС для сердца и почки уровень общего NO практически не менялся, а для легких и печени регистрировалось существенное снижение уровня NO, по сравнению с инъекцией только одного ЛПС [4].

Вероятно, что полученный эффект можно объяснить несколькими причинами. Так, увеличение уровня NO в ткани органов крыс, получавших ЛПС, обусловлено образованием оксида азота с помощью iNOS. При этом синтез самих iNOS провоцируется прооксидантным статусом тканей, инициированным действием ЛПС. Поскольку вводимые ДНКЖ-Глт характеризуются антиоксидантной активностью [1, 2], это может приводить к подавлению синтеза iNOS, следствием чего является снижение уровня NO в ткани легких и печени. Кроме того, присутствие в крови избыточного количества ДНКЖ и S-нитрозотиолов, связанных с белковыми лигандами [3], может выполнять роль эффективного переносчика NO в почки в условиях воспаления. Следовательно, введение ДНКЖ с глутатионом в условиях эндотоксического шока не приводит к увеличению уровня общего NO в органах крыс, и даже оказывает противовоспалительное действие, подавляя гиперпродукцию NO в лёгких и печени животных.

Таким образом, наиболее существенный и продолжительный эффект ДНКЖ-Глт наблюдается в результате внутривенного и подкожного введения данного препарата. В результате подкожной инъекции данного соединения снижение АДер и накопление связанных с белками ДНКЖ в крови и ткани органов происходит более медленно, по сравнению с внутривенным введением, при этом подкожная инъекция характеризуется также более эффективным накоплением этих форм депонирования NO в ткани лёгких. Кроме того, данные комплексы способны инициировать защитный эффект, оказывая антиоксидантное действие и подавляя гиперпродукцию NO в ткани органов.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ, грант № 14-04-00332а.

## Литература

1. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами. Физикохимия, биология, медицина // Москва-Ижевск: Институт компьютерных исследований. – 2015. – 220 с.
2. Vanin A.F., Timoshin A.A. Determination of in vivo nitric oxide levels in animal tissues using a novel spin trapping technology // Methods in Molecular Biology. Humana Press. New York. – 2011. – Vol. 704. – P. 135-149.
3. Timoshin A.A., Lakomkin V.L., Abramov A.A., Ruuge E.K., Kapel'ko V.I., Chazov E.I., Vanin A.F. The hypotensive effect of the nitric monoxide donor Oxacom at different routs of its administration to experimental animals // European Journal of Pharmacology. – 2015. – Vol. 765. – P. 525-532.
4. Тимошин А.А., Лакомкин В.Л., Абрамов А.А., Рууге Э.К., Ванин А.Ф. Влияние динитрозильных комплексов железа на уровень NO в ткани органов крыс в условиях эндотоксического шока // Доклады Академии Наук (Раздел – Биофизика). – 2015. – Т. 462, № 2. – С. 241-244.

## ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ МЕХАНИЗМ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ОКСИДА АЗОТА В МИОГЕНЕЗЕ

**Титов В.Ю.<sup>1,2</sup>, Кондратов Г.В.<sup>3</sup>, Борхунова Е.Н.<sup>3</sup>, Осипов А.Н.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*ВНИТИП, Сергиев Посад, Россия, vtitov43@yandex.ru*

<sup>2</sup>*РГМУ, Москва, Россия*

<sup>3</sup>*МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, Москва, Россия*

В настоящее время показано, что эмбриогенез сопровождается интенсивной продукцией оксида азота. В эмбриональных тканях показано наличие NO-синтаз [1]. Также установлено, что пролиферация миобластов и клеток – сателлитов, образование миофибрилл – NO зависимые процессы [2].

Наиболее удобны для таких исследований птичьих эмбрионы, имеющие большие размеры и развивающиеся независимо от материнского организма. Нами с помощью высокочувствительного ферментного сенсора, способного определять в биообъектах содержание основных физиологически значимых групп нитро- и нитрозосоединений, установлены следу-

ющие закономерности изменения концентрации этих соединений в различных частях эмбриона птиц [3]:

Доноры NO в составе нитрозотиолов, динитрозильных комплексов железа, а также ряда высокомолекулярных нитратов начинают накапливаются в птичьем эмбрионе с 1 по 3 сутки инкубации до общей концентрации около 150 мкМ. Они накапливаются в амнионе эмбриона [3]. С 3 по 11 сутки содержание нитро- и нитрозосоединений в эмбрионе стабильное. С 11 суток до конца эмбриогенеза происходит резкое и многократное увеличение их содержания в эмбрионе до 700–1000 мкМ перед выводом. У птиц мясного направления продуктивности, начиная с 3 суток инкубации до конца эмбриогенеза, идет интенсивная трансформация доноров NO до нитрата. У яичных форм этот процесс многократно менее интенсивен. Нитрат накапливается, преимущественно, в мышцах, а оттуда поступает в аллантаоис [3]. Но интенсивность синтеза доноров NO в эмбрионах всех форм примерно одинакова. В тканях цыплят яичных и мясных пород, после вывода, содержание доноров NO и нитрата выравнивается [3].

Эти данные дают основание для предположения, что процесс трансформации доноров NO до нитрата в эмбрионе птиц, в основном, связан с интенсификацией миогенеза. Но какова природа этой взаимосвязи? Ответ на этот вопрос и является целью нашего исследования.

Было исследовано влияние зеленого света – известного экзогенного стимулятора мясной продуктивности, на содержание нитро- и нитрозосоединений в тканях эмбриона [4]. Механизм стимуляции миогенеза под действием видимого света не известен. Но очевидно, что видимый свет не может внести каких-либо изменений в генотип. В наших экспериментах (использовалась энергосберегающая лампа NCL-SH10 Navigator мощностью 15 Вт, с зеленым светофильтром, со световым потоком 975 лм.) установлено, что освещение стимулирует деструкцию доноров NO до нитрата в тканях эмбриона, не влияя на интенсивность их синтеза. Также нитрат накапливается, в основном, в мышцах и оттуда поступает в аллантаоис [4]. Причем, интенсификация начинается не сразу, а на 3–5 сутки развития эмбриона. Отмена освещения после этого срока никак не сказывалась на интенсивности деструкции доноров NO до нитрата в течение всего оставшегося срока эмбриогенеза. Она была такой же, как и при сохранении освещения. Но если освещение начиналось позже 5 суток, оно не влияло на интенсивность деструкции доноров NO [4].

Следовательно, деструкция доноров NO в тканях эмбриона связана с факторами, появляющимися на 3–5 сутки развития птичьего эмбриона, и до 5 суток могут быть активированы либо внутренним, генетически обу-

словленным механизмом, либо внешними причинами – светом. В дальнейшем процесс, опосредующий деструкцию доноров NO, идет до конца эмбриогенеза без какой-то внешней поддержки. Что же это за процесс?

Гистологические исследования показали, что развитие мышц в эмбрионах всех форм птиц идет с одинаковой скоростью, вне зависимости от интенсивности деструкции доноров NO до нитрата. То есть скорость морфологического развития мышц не связана с этим показателем. Но в эмбрионах с высокой интенсивностью деструкции доноров NO на 8 сутки эмбриогенеза зафиксировано на 10–15 % меньшее содержание мышечной ткани в мышечных волокнах на продольном срезе, чем в эмбрионах с низкой интенсивностью. В дальнейшем эта разница исчезала [4]. Можно предположить, что в первом случае имеет место задержка дифференцировки клеток, которая также NO-зависима [3]. Также у пород с высокой интенсивностью эмбриональной деструкции доноров NO имело место некоторое увеличение числа волокон в поле зрения микроскопа на продольном срезе на первые сутки после вывода, по сравнению с формами, характеризующимися низкой интенсивностью [4]. Заметим, что пролиферация миобластов заканчивается к 12 суткам эмбриогенеза, а окислительная деструкция NO в эмбрионе длится в течение всего эмбриогенеза. Возможно, наблюдаемый метаболизм NO связан с активацией пролиферации клеток – сателлитов. Последняя тоже является NO зависимым процессом, и активация одних клеток стимулирует активацию других. Все эти процессы активации пролиферации клеток регулируются различными гуморальными факторами с синтезом, либо активацией которых, возможно, и связано окисление NO [2].

### Литература

1. Embryonic production of nitric oxide and its role in implantation: a pilot study / C. Battaglia [et al.] // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2003. – Vol. 20 – P. 449-454.
2. Nitric oxide drives embryonic myogenesis in chicken through the up-regulation of myogenic differentiation factors / D. Cazzato [et al.] // Exp. Cell Res. – 2014. – Vol. 320. – P. 269-280.
3. Nitric oxide (NO) in bird embryogenesis: physiological role and ability of practical use / V.Yu. Titov [et al.] // World's Poultry Science Journal – 2012. – Vol. 68. – P. 83-95.
4. Воздействие света на эмбриональный метаболизм оксида азота у птиц / В.Ю. Титов [и др.] // Предполагаемая физиологическая роль. // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. – 2015. – Т. 159, № 6. – С. 667-671.

## МЕХАНИЗМ ОСЦИЛЛИРУЮЩЕГО ДВИЖЕНИЯ ЖИДКОСТИ В ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОМ ПРОСТРАНСТВЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Титовец Э.П.

*РНПЦ неврологии и нейрохирургии, Минск, Беларусь*

Фундаментальные данные и клиническая практика указывают на большую важность исследования механизмов движения жидкостей головного мозга. Механизм объемного переноса (ОП), обеспечивающий межклеточный транспорт информационных биологически активных молекул, питательных веществ, газов, теплоперенос и тканевой гомеостаз, имеет в своей основе конвекцию интерстициальной жидкости (ИЖ).

Нарушения конвекции ИЖ неизбежно присутствуют при различных патологиях головного мозга: травмах, опухолях, нейродегенеративных заболеваниях и др. При этом универсальной патофизиологической реакцией головного мозга является развитие его отека – одна из основных причин летального исхода [1].

Неинвазивными способами магнитно-резонансной томографии были получены данные, которые показывают осциллирующий характер движения жидкостей головного мозга, что невозможно объяснить на основе устоявшихся классических представлений [2]. Было также показано, что процессы конвекции ИЖ зависят от активности аквапорина AQP4, который выполняет кинетически лимитирующую роль в церебральном водном обмене [3, 4].

В настоящей работе осуществлено моделирование осциллирующего движения ИЖ между капилляром и межклеточным пространством ГМ. Здесь принимается во внимание пульсирующий характер колебаний внутри-черепного гидростатического давления (ВГД), кинетическая роль AQP4 и то, что движение межклеточной жидкости в межклеточном ИП осуществляется по закономерностям нанофлюидики [5]. Рассматривается изоосмотический перенос жидкости на основе уравнения Кедем-Качальского:

$$J_v = -L_p(p_a - p_t(t) - \frac{P_a - P_v}{L}x - \pi_c + \pi_t),$$

где  $J_v$  – объемный поток жидкости;  $L_p$  – коэффициент гидравлической проводимости;  $p_a$  и  $p_v$  – гидростатическое давление, соответственно, на артериальном и венозном концах капилляра;  $p_t(t)$  – пульсовые колебания ВГД;  $L$  – длина капилляра;  $\pi_c$  и  $\pi_t$  – онкотическое давление, соответ-

ственно, в плазме крови и ИЖ. Результаты моделирования представлены на рисунке приведенном ниже.

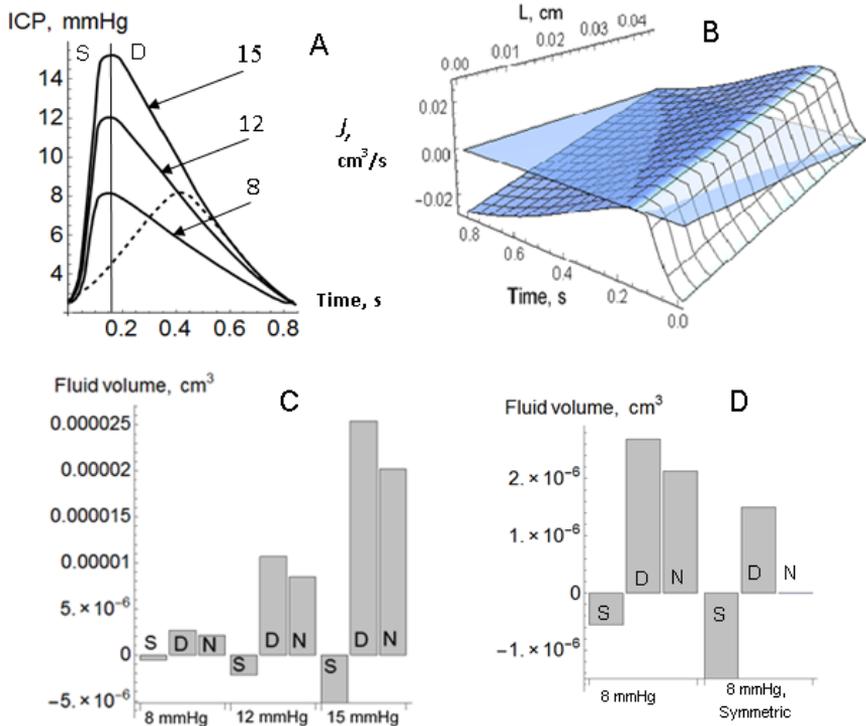


Рисунок – Моделирование обмена жидкости между капилляром и ИПГМ.  $p_a=36$  mmHg,  $p_v=15$  mmHg,  $L=0,074$  cm,  $\pi_i=1$  mmHg,  $\pi_c=22$  mmHg;  $0 \leq x \leq L$ ;  $Lp=0,00217$  cm/(smmHg).

А. Формы волн внутричерепногогидростатического давления,  $p_i(t)$ . Значения 8, 12, 15 (в mmHg) соответствуют пиковым интенсивностям соответствующих волн. В. Трех-мерное представление водного обмена между капилляром и интерстициальными пространствами головного мозга на протяжении одного полного сердечного цикла. С и D. Величины систолического (S), диастолического (D) и интегрального (N) потоков. Моделирование выполняли с использованием программы Mathematica 10.02.

Представленная модель описывает колебательный характер движения ИЖ, наблюдаемый при использовании неинвазивных методов. Она показывает, каким образом величина и направление потоков жидкости связаны и определяются параметрами пульсовых волн ВД. Интересно отметить, что при симметричной волне ВД (показана пунктирной линией на А и далее на D) интегральный поток жидкости равен нулю. Кинетическое влияние AQP4 реализуется через величину  $L_p$ . Модель хорошо соответствует современным клиническим и экспериментальным данным о характере водного обмена тканей головного мозга в норме и патологии.

### Литература

1. Stokum J., Gerzanich V. and Simard J. Molecular pathophysiology of cerebral edema / *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2015. – Vol. 26. – DOI: 10.1177/0271678X15617172.
2. Титовец Э.П., Смянович А.Ф., Пархач Л.П., Босякова Е.В. Исследование нарушений водного обмена головного мозга методами функциональной магнитно-резонансной визуализации / *Известия национальной Академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. – 2015. – № 1. – С. 65-72.
3. Титовец, Э.П. Аквапорины человека и животных. Фундаментальные и клинические аспекты: монография/ Э.П. Титовец. – Мн. : Белорусская Наука. – 2007. – С. 239.
4. MacAulay N., Zeuthen T. Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters / *Neuroscience*. – 2010. – Vol. 168. – P. 941-956.
5. Eijkel J., Van den Berg A. Review: Nanofluidics: what is it and what can we expect from it? / *Microfluid Nanofluid*. – 2000. – Vol. 1. – P. 249-267. – DOI 10.1007/s10404-004-0012-9.

# ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ ЛАЗЕРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭНДОВЕНОЗНОЙ ЛАЗЕРНОЙ АБЛЯЦИИ

**Трифанов П.В.<sup>1</sup>, Молчанов М.Д.<sup>1</sup>, Яшкин М.Н.<sup>2</sup>,  
Захаркина О.Л.<sup>3</sup>, Игнатъева Н.Ю.<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>*МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

<sup>2</sup>*НМХЦ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

<sup>3</sup>*ИПЛИТ РАН, Москва, Россия*

В настоящее время традиционные хирургические методы устранения хронических заболеваний вен нижних конечностей заменяются на миниинвазивную эндовенозную лазерную абляцию (ЭВЛА). Метод ЭВЛА основан на термической деградации стенки вены под действием лазерного излучения. Однако остаются спорные вопросы, касающиеся влияния параметров лазерного воздействия на эффективность процедуры [1], что не позволяет принять единый протокол проведения процедуры.

Цель данной работы – выявление роли длины волны и мощности лазерного излучения, а также типа среды в эффективности ЭВЛА. В качестве критерия эффективности выступала полнота деградации ткани, которую оценивали по степени денатурации коллагена – основного структурного белка каркаса венозной стенки. В экспериментах контролировали степень денатурации, усадку вены и динамику температурных полей на внешней поверхности вены.

Экспериментальная часть. В качестве источников излучения использовали лазеры с длинами волн 0,97 мкм (диодный лазер), 1,56 мкм (допированный эрбием волоконный лазер) и 1,68 мкм (волоконный Рамановский лазер). Все лазеры изготовлены ИРЭ «Полюс» (Фрязино, Россия). Мощность излучения контролировали измерителем мощности UP12-N (Gentec Electro-Optics).

Для моделирования ЭВЛА *ex vivo* сегмент вены длиной 5 см фиксировали и термостатировали в пластиковом контейнере, заполненном 0,15 М раствором NaCl. В венозные сосуды вводили 0,5 мл гепаринизированной крови или 0,15 М раствора NaCl и вставляли оптическое волокно. Включение лазерного излучения и автоматической тракции волокна со скоростью 0,75 мм/с происходило одновременно. Корректность регистрации температурного поля на поверхности ткани радиометрическим методом обеспечивали покрытием части ткани полимерной пленкой, прозрачной в ИК области чувствительности детектора термографа.

Динамику температурного поля регистрировали с помощью термографа ИРТИС 2000 («ИРТИС», Россия) с частотой кадров 1 Гц.

В исследовании использованы 85 фрагментов варикозно измененных стволов больших подкожных вен, удаленных при флебэктомии. Для каждого набора параметров воздействию лазерного излучения подвергали 2-3 сегмента вен.

Степень денатурации коллагена в обработанных образцах оценивали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) в ячейке калориметра DSC204F (Netzch, Германия) и характеризовали величиной  $\alpha_i = \frac{\Delta H_{int} - \Delta H_i}{\Delta H_{int}} \times 100\%$ , где  $\Delta H_{int}$  и  $\Delta H_i$  – энтальпии денатурации коллагена в интактных и обработанных образцах, соответственно. Значения  $\alpha$  получали для трех образцов обработанной части каждого сегмента.

Математическая модель. Для численного моделирования процессов распространения тепла от источника излучения до стенки вены была разработана математическая модель. В отличие от использованных ранее моделей [1], в нашей модели уравнение теплопроводности было дополнено слагаемым, описывающим кипение. Задача решалась с помощью программы, реализующей метод переменных направлений. Расчет производили для всех длин волн.

Результаты и обсуждение. Анализ динамики температуры показал, что пик температуры смещается одновременно с движением торца световода. Значения температуры вблизи торца волокна в разные моменты времени совпадают и равны  $T_{max}$ . Величина  $T_{max}$  увеличивалось по мере увеличения выходной мощности лазера вплоть до постоянного значения, лежащего в интервале  $92 \pm 2$  °С для всех режимов воздействия.

Степень денатурации  $\alpha$  возрастала с увеличением мощности излучения и достигала 100 % при некоторой пороговой мощности  $P_{пор}$ . Значения  $P_{пор}$ , соответствующего полной деградации каркаса стенки сосуда, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Пороговые значения мощности для разных режимов лазерного воздействия, Вт

Поглощающая среда	$\lambda$ , мкм		
	0,97	1,56	1,68
кровь	11,0	5,0	6,0
вода	15,0	7,0	7,5

Отметим отрицательную корреляцию между значениями  $P_{\text{пор}}$  и  $\mu_{\text{эфф}}$  – эффективными коэффициентам поглощения среды для разных  $\lambda$  [2] (таблица 2) и меньшие значения  $P_{\text{пор}}$  для крови при одном значении  $\lambda$  излучения лазера.

Таблица 2 – Эффективные коэффициенты поглощения для разных режимов лазерного воздействия, 1/см

Поглощающая среда	$\lambda$ , мкм		
	0,97	1,56	1,68
кровь	5,1	19,4	12,6
вода	0,8	16,8	9,6

Значения рассчитаны на основе данных [2].

Мы предлагаем следующую последовательность событий в условиях ЭВЛА:

- поглощение лазерного излучения в объеме с характерным линейным размером  $1/\mu_{\text{эфф}}$  и нагрев этого объема;
- нагрев венозной стенки происходит в результате теплообмена между прогреваемым объемом и окружающей средой.

Различия величин  $P_{\text{пор}}$  в крови и в воде, по-видимому, обусловлены коагуляцией крови при 80 °С [3] и карбонизацией коагулята при 300 °С [4]. Следствием этого является неселективное поглощение лазерного излучения коагулятом, его разогрев до температур  $\geq 700$  °С [1] и ускорение процессов теплопереноса. В результате пороговая мощность уменьшается. Численное моделирование теплопроводности подтверждает предложенный механизм нагрева ткани.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 16-02-00236).

### Литература

1. Malskat W.S., Poluektova A.A., Neumann H.A., Weiss R.A., van Gemert M.J. Endovenous laser ablation (EVLA): a review of mechanisms, modeling outcomes, and issues for debate // *Lasers Med. Sci.* – 2014. – Vol. 29. – P. 393-403.
2. Roggan A., Friebel M., Dörschel K, Hahn A., Müller G. Optical Properties of Circulating Human Blood in the Wavelength Range 400-255 nm // *J. Biomed. Opt.* – 1999. – Vol. 4. – P. 36-46.
3. Pfefer T.J., Welsh A.J. Mechanisms of Laser-Induced Thermal Coagulation of Whole Blood in vitro // *SPIE.* – 1999. – Vol. 3590. – P. 20-31.

4. Mothé C.G., Carestiato T., Águila M.-B. Thermoanalytical Investigation of Blood // J. Therm. Anal. Cal. – 2006. – Vol. 85. – P. 247-250.

## **ФОТОИНДУЦИРОВАННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ ТИОЛОВ В КЕРАТИНАХ ВОЛОС**

**Федоркова М.В.<sup>1</sup>, Смолина Н.В.<sup>1</sup>, Балабушевич Н.Г.<sup>2</sup>,  
Ибрагимова Г.А.<sup>1</sup>, Михальчик Е.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия*

<sup>2</sup>*МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия*

Ультрафиолетовое излучение вызывает повреждение кератинов и тканей, содержащих кератины – кожи, роговицы, волос. Наиболее чувствительны к действию УФ света ароматические аминокислоты и цистин. Кератины составляют до 85 % веса волоса, что наряду с доступностью материала (нет необходимости в инвазивных процедурах) делает волос удобным объектом для исследования механизмов фотодеградации этих белков. Протекающие в присутствии кислорода реакции повреждения цистина приводят к образованию целого ряда окисленных продуктов – сульфеновых, сульфиновых, сульфоновых кислот и цистеиновой кислоты [1]. Однако при облучении волос в лабораторных условиях было обнаружено повышение содержания тиолов в растворимых фракциях кератинов [2]. Один из возможных механизмов образования тиолов – реакция тиильного радикала с углеводами и аминокислотами с переносом водорода [3]. Для оценки тиолов используют чувствительный спектрофотометрический метод Элмана, основанный на превращении 5,5'-дитионитробензойной кислоты (ДТНБ) в тионитробензойную кислоту (ТНБ) и смешанный дисульфид [4]. Реакция сопровождается ростом оптического поглощения при 412 нм, соответствующего поглощению ТНБ.

Целью работы было оценить влияние УФ-света на количество ДТНБ-активных продуктов в разных фракциях белков волоса человека.

Методы. Объектом исследования были седые волосы добровольца без трихологических проблем. Использование седых волос позволяло исключить эффекты меланина. В отдельном эксперименте использовали волосы 5 здоровых добровольцев с естественной пигментацией волос (без искусственного окрашивания). Облучение волос проводили с использованием бактерицидной лампы в течение 6 часов, интенсивность линии лампы на длине волны 254 нм составляла 28 мкВт/см<sup>2</sup>. Облучен-

ные и необлученные образцы волос гомогенизировали в 0,1 М карбонатном буфере (pH 10,3) и отделяли фракцию растворимых белков центрифугированием (30 минут, 900 g). Осадок нерастворимых кератинов волос седого добровольца трехкратно промывали водой и высушивали до постоянного веса. Для оценки содержания тиолов аликвоту фракции растворимых белков или суспензии нерастворимых кератинов седого добровольца смешивали с Трис-НСl буфером (0,4 М, pH 8,9) и добавляли реактив Элмана (раствор ДТНБ). Количество ДТНБ-активных продуктов оценивали по изменению поглощения проб при 412 нм. При анализе нерастворимых кератинов перед измерением оптической плотности пробы центрифугировали.

Результаты. Предварительные эксперименты по облучению УФ светом раствора окисленного глутатиона (GSSG) в течение 30 минут показали образование ДТНБ-активных продуктов в количестве  $4,8 \pm 0,2$  мольных %.

При анализе облученных и необлученных седых волос различия, связанные с УФ-облучением исходных образцов, были обнаружены и в растворимых и в нерастворимых фракциях кератинов (таблица 1).

Из представленных в таблице 1 данных видно, что ДТНБ-активные продукты распределены между растворимыми и нерастворимыми кератинами волос, при этом эффекты облучения УФ для растворимых и нерастворимых белков имеют близкий порядок (196 % и 152 % от соответствующих контрольных значений, соответственно).

Таблица 1 – Содержание растворимого белка и ДТНБ-активных продуктов в облученных и необлученных седых волосах и их фракциях. Количество ДТНБ-активных продуктов выражали в пересчете на SH, используя калибровочную зависимость, построенную с использованием восстановленного глутатиона (GSH)

Показатель	Единицы измерения	До облучения волос	После облучения волос
Растворимый белок	мг/г веса волоса	400±14	454±34
ДТНБ-активные продукты в растворимом белке	мкг/г растворимого белка	389±28	766±56
ДТНБ – активные продукты в осадке*	мкг/г веса	790±10	1200±20

\* осадок после гомогенизации волос, высушенный и ресуспендированный в карбонатном буфере.

Полученные результаты позволяют рассматривать оценку ДТНБ-активных продуктов в растворимых и/или нерастворимых белках волоса как показатель реакции дисульфидной связи на УФ излучение. В соответствии с механизмом реакции Эллмана и из сопоставления результатов экспериментов по фотодegradации окисленного глутатиона и кератинов стержня волоса наиболее вероятными ДТНБ-активными продуктами являются тиолы.

В пигментированных волосах меланин защищает белки от действия УФ света, выступая в роли перехватчика фотонов и антиоксиданта. Для проверки гипотезы о возможности использования измерения содержания тиолов в кератинах волоса при оценке эффектов УФ света использовали пигментированные волосы 5 добровольцев. Образцы волос облучали по описанной схеме и оценивали содержание тиолов во фракции растворимого белка. В контрольных (необлученных) волос содержание тиолов составляло  $1,0 \pm 0,2$  мг/г белка, а после облучения волос –  $1,9 \pm 0,7$  мг/г. Таким образом, содержание ДТНБ-активных продуктов (предположительно, тиолов) в растворимых белках увеличилось до  $181 \pm 80$  %, что сопоставимо с эффектом УФ при облучении образца седых волос.

#### Литература

1. Kerwin B.A., Remmele R.L. Protect from light: photodegradation and protein biologics // *J. Pharmaceutical Sciences*. – 2007. – Vol. 96. – P. 1468-1479.
2. Fedorkova M.V., Smolina N.V., Mikhhalchik E.V., Balabushevich N.G., Ibragimova G.A., Gadzhigoroeva A.G., Dmitrieva E.I., Dobretsov G.E. Effects of ultra violet radiation on the soluble proteins of human hair // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. – 2014. – Vol. 140. – P. 390-395.
3. Zhao R., Lind J., Merényi G., Eriksen T.E. Kinetics of one-electron oxidation of thiols and hydrogen abstraction by thyl radicals from  $\alpha$ -amino C-H bonds // *J. Am. Chem. Soc.* – 1994. – Vol. 116. – P. 12010-12015.
4. Riddles P.W., Blakkeley R.L., Zerner B. Reassessment of Ellman's reagent // *Methods in Enzymology* – 1983. – Vol. 91. – P. 49-58.

## ПРОЦЕССЫ СВЯЗЫВАНИЯ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО ПОЛИМЕТИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ С КОМПОНЕНТАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Хлудеев И.И.<sup>1</sup>, Самцов М.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>НИИПФП им. Севченко БГУ, Минск, Беларусь

Избирательность воздействия является одним из основных преимуществ метода фотодинамической терапии (ФДТ) при лечении злокачественных новообразований. Достигается она, в том числе благодаря селективному накоплению фотосенсибилизаторов (ФС) в ткани-мишени. Стандартный протокол ФДТ предусматривает введение препарата в организм путем внутривенной инъекции, поэтому локализация и контрастность накопления ФС зависит от процессов транспорта в кровеносной системе. Большинство используемых в клинической практике ФС в кровотоке находятся в виде комплексов с различными типами белков сыворотки крови [1].

Полиметиновые красители (ПК) считаются перспективными для использования в ФДТ, поскольку эти соединения имеют интенсивную полосу поглощения в дальней красной области (720-750 нм) – в так называемой «полосе прозрачности», где глубина проникновения света в биологические ткани существенно повышена. Однако большинство ПК являются гидрофобными соединениями, которые слабо- или нерастворимы в воде. Это приводит к агрегации ПК в водной среде, следствием которой может являться значительное изменение их фотофизических характеристик. Образование комплексов ПК с белками сыворотки крови также может влиять как на их фармакокинетическое поведение в крови, так и на фотофизические характеристики данных соединений.

В данной работе исследовано связывание полиметиновых красителей с белками сыворотки крови и проведена оценка влияния комплексобразования на спектральные и фотохимические характеристики полиметиновых красителей в процессе фотовоздействия в условиях *in vitro*.

В работе использовали индотрикарбоцианиновые красители, синтезированные в лаборатории спектроскопии НИИ ПФП им. Севченко [2] – P154 и его производное P220, полученное путем замещения двух карбоксильных групп молекулами полиэтиленгликоля с молекулярной массой 400 кДа. Стоковые растворы ПК с концентрацией  $5 \times 10^{-4}$  моль/л готовили в этаноле (P154) и в дистиллированной воде (P220). Спектры по-

глощения и люминесценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра СОЛАР СМ 2203. Оценку связывания ПК с компонентами сыворотки крови человека проводили методом эксклюзионной гель-хроматографии на колонках Sigma (1,5×50 см) с гелем Sephadex G-200, уравновешенным фосфатно-солевым буфером Дюльбекко рН 7,4 (ФСБ). Фотооблучение образцов проводили, используя полупроводниковые лазеры ( $\lambda_{\text{изл}}=660$  нм и 740 нм) с регулируемой (2-400 мВт) мощностью излучения.

Гель-хроматографическое разделение образцов сыворотки, окрашенной ПК, позволило установить, что исследуемые соединения образуют комплексы с белками сыворотки крови человека и выходят из колонки вместе с фракциями сывороточного альбумина (САЧ) и липопротеинов высокой и низкой плотности (рисунок 1).

Для P154 относительное количество пигмента, связанного с САЧ, почти в 2 раза больше, чем доля пигмента, связанного с липопротеинами. В то же время P220 проявляет более высокое в сравнении с P154 сродство к липопротеинам – с этими компонентами сыворотки крови связывается более половины суммарного количества пигмента. Анализ характеристик связывания методом тушения флуоресценции показал, что расположение мест связывания на молекуле САЧ для катионных ПК отличается от мест связывания, характерных для молекул хлоринов, имеющих анионные боковые группы.

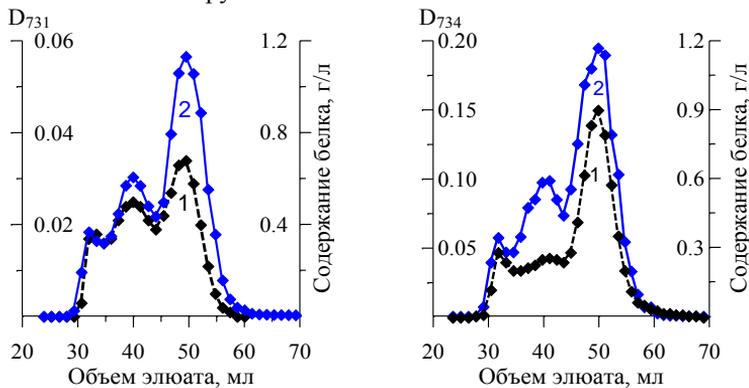


Рисунок 1 – Связывание красителей P220 (левая панель) и P154 (правая панель) с белками сыворотки крови человека:  
 1 – оптическая плотность фракций в максимуме поглощения ПК,  
 2 – концентрация белка во фракциях

Исследование спектральных характеристик ПК показало, что в водном растворе (ФСБ рН 7,4) максимумы поглощения красителей смещены в коротковолновую область. По мере роста концентрации сыворотки в образце от 0 до 0,5 % наблюдается сдвиг максимума полосы поглощения Р154 от 704 нм (в ФСБ) до 730 нм. Дальнейший рост содержания сыворотки в водной среде вызывает незначительное смещение положения максимума, достигая 732 нм при  $C_{\text{сыв}} \geq 0,95$  %.

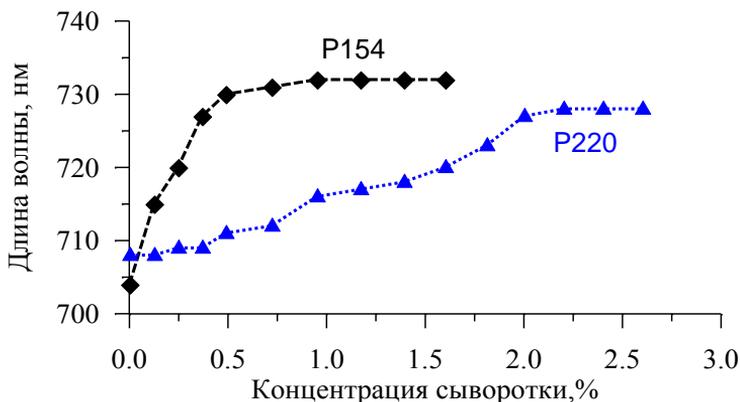


Рисунок 2 – Влияние сыворотки на спектральные характеристики ПК

Следует отметить, что для получения схожего эффекта для Р220 требуется существенно большие количества сывороточных белков. Так, при росте концентрации сыворотки в образце с 0 до 0,95 % положение максимума полосы поглощения данного красителя смещается от 709 нм до 716 нм. Максимальный длинноволновой сдвиг максимума поглощения для Р220 (до 729 нм) в водных растворах наблюдается при концентрации сыворотки  $\geq 2$  %.

Представленные результаты показывают, что образование комплексов с белками плазмы крови существенно влияет на фотофизические характеристики полиметиновых красителей, что необходимо учитывать при разработке протоколов применения данных соединений в ФДТ.

### Литература

1. Hasan T., Ortel B., Moor A.C.E., Pogue B.W. Photosensitizer Transport and Distribution // Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. Kufe D.W., Pollock R.E., Weichselbaum R.R., et al., editors. Hamilton: BC Decker; 2003.
2. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics / A.A. Lugovski [et al.] // J. Photochem. and Photobiol. A: Chem. – 2016. – Vol. 316, № 1. – P. 31-36.

## ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ

**Шишкина Л.Н., Бабкин А.Ю., Козлов М.В., Хватов А.В.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,  
Москва, Россия*

Эритроцит, являющийся высокоспециализированной клеткой, активно участвует в метаболических процессах, связанных с поддержанием гомеостаза на уровне целого организма. Эритроциты чувствительны к окислительным повреждениям, поскольку в их липидах достаточно высока концентрация субстратов окисления (полиненасыщенные жирные кислоты), а в составе эритроцита присутствует потенциальный промотор окислительных процессов – гемоглобин. Именно эти обстоятельства делают эритроциты чрезвычайно удобной клеточной моделью для исследования как механизмов развития окислительных повреждений, так и для оценки антиоксидантных (АО) и мембранопротекторных свойств различных соединений [1-3]. Ранее было установлено существование физико-химической системы регуляции процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) на уровне клеток и тканей различных биологических объектов [4, 5]. Показано, что соотношение сумм более легко (ЛО) – и более трудноокисляемых (ТО) фракций фосфолипидов (ФЛ), т.е.  $\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$ , характеризует способность липидов к окислению, а соотношение основных фракций ФЛ тканей млекопитающих фосфатидилхолин/фосфатидилэтанолламин (ФХ/ФЭ) и мольное отношение [стерины]/[ФЛ] отражают структурное состояние мембранной системы клетки или органа [4]. Как известно, эритроциты должны обладать, с одной стороны, механической стабильностью, что необходимо для сохранения це-

лостности клетки, а, с другой стороны, способностью к обратимым изменениям формы и размера, что наблюдается при прохождении эритроцита в микроциркуляционном русле через кровеносные капилляры. При этом возвращение к исходному состоянию мембраны эритроцита после деформации должно происходить достаточно быстро [6].

Целью работы явилось выявление взаимосвязей как между параметрами системы регуляции ПОЛ в эритроцитах крови лабораторных мышей, так и формой эритроцитов и составом их липидов.

Объектами исследования явились белые беспородные мыши (самцы и самки) в возрасте 2 и 5 месяцев, забой которых проводили декапитацией. Общее количество мышей в экспериментах 60 особей. Кровь отбирали в пробирки, обработанные 5 %-ным раствором цитрата натрия. Эритроциты отделяли от других элементов крови центрифугированием. Для фиксации структурного состояния клеток использовали 25 %-ный раствор глутарового альдегида. Изображения эритроцитов от каждой мыши индивидуально регистрировали, используя оптический микроскоп Axio Imager Z2m (Carl Zeiss, Германия), находящегося в ЦКП «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН. Липиды выделяли по методу Блая и Дайера в модификации Кейтса. Содержание пероксидов определяли методом йодометрического титрования. Анализ антиокислительной активности (АОА) липидов проводили на метилолеатной окислительной модели. Об интенсивности процессов ПОЛ в плазме крови мышей судили по содержанию продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой. Количество белка определяли модифицированным биуретовым методом. Разделение ФЛ на фракции осуществляли методом ТСХ. Количественный состав ФЛ ит стерина определяли спектрофотометрически (ПЭ-5400ви, Россия). Модификацию АО статуса крови осуществляли либо проведением экспериментов в разные сезоны, либо однократным *per os* введением мышам оливкового масла в расчете 0,2 мл на 20 г массы мыши.

Коэффициенты линейной регрессии обратной корреляции между величиной АОА липидов и содержанием в них пероксидов для разных групп мышей различаются при достоверных различиях способности липидов к окислению и отношения ФХ/ФЭ, а также интенсивности ПОЛ в плазме крови. Величины коэффициентов линейной регрессии обратной корреляции между отношениями  $\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$  и ФХ/ФЭ также существенно различаются в группах мышей с разным АО статусом. Выявлено наличие прямой корреляции между относительным содержанием лизоформ ФЛ и сфингомиелином (СМ) в группах 5-ти месячных мышей. Очевидно, способность СМ стабилизировать мембрану нивелирует лизирующий эффект лизоформ ФЛ, что обеспечивает поддержание архитекто-

ники эритроцитов крови у более старых мышей в форме дискоцитов и эхиноцитов (формы обратимой трансформации эритроцитов) (рисунок 1) [1]. Наиболее вариабельными показателями внутри группы мышей являются доля ФЛ в составе общих липидов, отношения ФХ/ФЭ и особенно [стерины]/[ФЛ], т.е. параметров, отражающих структурное состояние мембран эритроцитов.

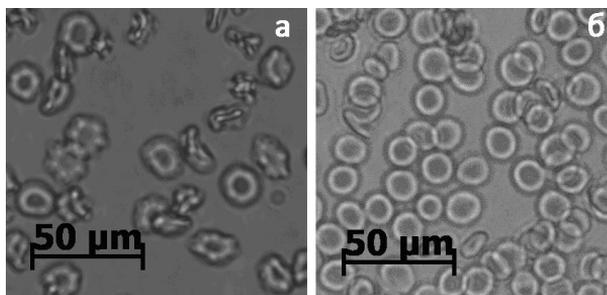


Рисунок 1 – Эритроциты крови 5-ти месячных мышей:  
а – самка; б – самец

Таким образом, взаимосвязанные изменения АО статуса, состава липидов и формы эритроцитов крови обуславливают использование параметров их системы регуляции ПОЛ для оценки последствий воздействия факторов разной природы на организм.

#### Литература

1. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во Том. ун-та, – 2004. –202 с.
2. Шевченко О.Г., Шишкина Л.Н. Липиды эритроцитов крови как модель для оценки биологических последствий воздействия физических и химических факторов // Технологии живых систем. – 2009. – Т. 6, № 8. – С. 21-32.
3. Шевченко О.Г., Шишкина Л.Н. Анализ метода окислительного гемолиза эритроцитов крови для оценки антиоксидантной и мембранопротекторной активности природных и синтетических соединений // Успехи соврем. биологии. – 2014. – Т. 134, № 2. – С. 133-148.
4. Шишкина Л.Н. Особенности функционирования физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов в биологических объектах разной степени сложности в норме и при

- действии повреждающих факторов. Автореф. дис. ... д-ра хим. наук. – М., 2003. – 45 с.
5. Шишкина Л.Н., Кушнирева Е.В., Смотряева М.А. Новые подходы к оценке биологических последствий воздействия радиации в малых дозах // Радац. Биология. Радиоэкология. – 2004. – Т. 44, № 3. – С. 289-295.
  6. Сторожок С.А., Санников А.Г., Захаров Ю.М. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. Тюмень: Изд-во Тюменского гос. ун-та. – 1997. – 140 с.

## **АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ РАКОВОЙ ТКАНИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПАЦИЕНТКИ – ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ПОКАЗАТЕЛЬ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА НА ПОЛИХИМИОТЕРАПИЮ**

**Шуканова Н.А.<sup>1</sup>, Мартынова М.А.<sup>1</sup>, Бушмакина И.М.<sup>1</sup>,  
Молчан М.М.<sup>1</sup>, Козловская Н.А.<sup>2</sup>, Шаповал Е.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,  
Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии  
им. Н.Н. Александрова», МЗ РБ, Минск, Беларусь*

Злокачественные опухоли молочной железы имеют существенные различия в морфологическом строении, рецепторном статусе и молекулярно-генетических признаках. В зависимости от наличия или отсутствия рецепторов эстрогенов (ER), прогестерона (PR) и гена *HER2*, кодирующего белок – рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 типа (Her-2/neu), в клиниках определяют 4 основных молекулярно-генетических подтипа рака молочной железы (РМЖ): люминальный А, люминальный Б, Her2-положительный и базально-подобный или трижды-негативный. Однако сходные по гистологическому строению опухоли нередко имеют различную химиочувствительность, поэтому индивидуализация химиотерапии онкологических пациентов в настоящее время является крайне актуальной задачей. В настоящее время в мире интенсивно ведутся исследования по изучению роли ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в процессах онкогенеза, которая участвует в клеточной пролиферации, дифференцировке, адгезии и апоптозе злокачественных клеток опухолей различной этиологии.

В данной работе методами мануального обследования, маммографии и ультразвукового исследования (УЗИ) оценивали степень регрессии злокачественно трансформированной молочной железы после проведения неoadьювантной полихимиотерапии (НПХТ) и сравнивали полученные клинические показатели с чувствительностью клеток РМЖ в первичной культуре из биоптатов железы пациентки к назначенным химиопрепаратам до начала терапии.

Первичную культуру получали из трепан-биоптатов опухоли молочной железы пациенток с первично верифицированным диагнозом РМЖ. Образцы помещали в суховоздушный  $\text{CO}_2$ -инкубатор HERAcell 150 и культивировали во влажной атмосфере, содержащей 5 %  $\text{CO}_2$ , при 37 °C в течение 48 ч. Культивирование клеток в условиях *in vitro* проводили в отсутствие и в присутствии противоопухолевых лекарственных средств, которые были в дальнейшем использованы при НПХТ пациенток. Лекарственные средства вносили в первичную культуру клеток РМЖ в концентрациях, соответствующих клинически значимым дозам, применяемым в онкологической практике.

Концентрацию белка  $[C_6]$  в суспензии клеток оценивали по стандартному методу Лоури.

Активность АХЭ определяли стандартным методом с использованием реактива Элмана. Измерение активности АХЭ во всех образцах проводилось в одинаковом временном интервале, в котором оптическая плотность в клеточной суспензии линейно зависела от количества гидролизованного субстрата, поэтому процедуру пересчета активности фермента в абсолютных единицах (нмоль/мг белка в мин) упростили до оценки увеличения оптической плотности в минуту в пересчете на 1 мг белка:  $A_k = \Delta D_k / [C_6] \cdot t$  для образцов, культивируемых без химиопрепаратов, и  $A_x = \Delta D_x / [C_6] \cdot t$  для образцов, культивируемых в присутствии назначенных пациентке химиопрепаратов, где  $t$  – время измерения оптической плотности в процессе гидролиза в минутах. При отношении  $A_x/A_k < 1$  наблюдалось ингибирование активности АХЭ в результате действия химиопрепаратов. При отношении  $A_x/A_k \geq 1$  химиопрепараты или не влияли на опухолевые клетки в первичной культуре, или усиливали клеточную пролиферацию.

Нами были сопоставлены данные по чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам в условиях *in vitro* до назначения НПХТ ( $A_x/A_k$ ) пациенткам с РМЖ (46 человек) и результаты посттерапевтического клинического обследования этих же больных. Совпадение предварительного прогноза по значению  $A_x/A_k$  и степени регрессии опухоли после НПХТ составило при мануальном обследовании 75 %, при рентге-

нологическом – 67 % и УЗИ – 60 %. Оценка степени регрессии после НПХТ в клинике не всегда однозначна для разных методов обследования. Например, для отдельной пациентки с Her2-позитивным подтипом РМЖ мануальное обследование свидетельствовало о полном отсутствии регрессии после НПХТ, маммография – о 63 % регрессии, а УЗИ – о регрессии в 81 %. Результаты обследования пациенток с наиболее агрессивным трижды-негативным подтипом РМЖ представлены в таблице.

Таким образом, разработанный нами метод определения чувствительности клеток РМЖ в первичной культуре к химиопрепаратам [1] позволяет дополнительно оценить вероятную регрессию опухоли молочной железы отдельной пациентки после НПХТ.

Таблица – Показатели чувствительности клеток РМЖ к химиопрепаратам в первичной культуре  $A_x/A_k$  и данные клинического обследования пациенток с трижды-негативным подтипом опухоли после НПХТ

№	$A_x/A_k$	Мануальное обследование (%)	УЗИ (%)	Маммография (%)
1	0,53	60	89	92
2	0,85	57	0	71
3	0,50	62	68	68
4	1,24	38	71	50
5	0,28	0	93	67
6	0,18	100	83	100
7	0,67	56	рост на 9 %	рост на 30 %
8	1,57	40	63	0
9	0,52	40	66	64
10	0,02	20	22	13
11	0,28	28	34	0
12	0,27	20	100	0
13	0,41	40	90	100
14	0,46	рост на 20 %	рост в 3,5 р	10
15	0,65	0	0	0
16	0,68	40	82	–
17	0,27	100	88	41
18	0,60	43	89	рост в 7,3 р
Совпадение (%)		83	83	65

## Литература

1. Способ определения у больного чувствительности клеток рака молочной железы к химиопрепарату или к группе химиопрепаратов / Н.А. Шуканова [и др.] // Патент № 17447С2; G01N 33/48. – Официальный бюллетень «Изобретения. Полезные модели. Промышленные образцы». – 2013. – № 4 (93). – С. 164.

## АНТИОКСИДАНТНОЕ И АНТИРАДИКАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

**Шумаев К.Б.<sup>1,2</sup>, Дудылина А.Л.<sup>1</sup>, Пугаченко И.С.<sup>2</sup>, Гречникова М.А.<sup>2</sup>,  
Космачевская О.В.<sup>1</sup>, Топунов А.Ф.<sup>1</sup>, Ванин А.Ф.<sup>3</sup>, Рууге Э.К.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биохимии им. А.Н. Баха «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия*

<sup>2</sup>*ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва, Москва, Россия*

<sup>3</sup>*Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия*

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются одними из важнейших физиологических производных оксида азота (NO). Эти комплексы являются вазодилататорами, участвуют в транспорте NO и редокс-регуляции метаболизма различных организмов [1, 2]. В живых системах лигандами ДНКЖ чаще всего являются SH-группы тиолов [1]. Вместе с тем, особый интерес представляет изучение антиоксидантного действия ДНКЖ, которое может определять их протекторные свойства.

С помощью ЭПР-спектроскопии спиновых ловушек исследовали влияние ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (формула:  $(RS)_2Fe(NO)_2$ ) на продукцию супероксидных радикалов в изолированных митохондриях сердец крыс. В качестве спиновой ловушки использовали *TIRON* [3].

Показано, что при нормоксии (~21 % O<sub>2</sub>) скорость образования свободных радикалов (семихинонов) *TIRON* существенным образом зависит от концентрации ДНКЖ в суспензии митохондрий (рисунок 1). В концентрации  $\geq 1$  мМ эти комплексы вызывали практически полное исчезновение сигнала ЭПР семихинона *TIRON*. Нужно отметить, что для спиновой ловушки *TIRON* характерна высокая константа скорости взаимодействия с супероксидными радикалами [3]. Таким образом, исследуемые ДНКЖ должны иметь сравнимую или даже более высокую константу

скорости взаимодействия с супероксидом, чем *TIRON*. На рисунке 1 представлена зависимость интенсивности сигнала ЭПР семихинона *TIRON* в суспензии митохондрий миокарда крысы от содержания кислорода в газовом потоке и концентрации ДНКЖ в среде инкубации. Из рисунка видно, что глутатионовые ДНКЖ эффективно перехватывают супероксидные анион-радикалы при разных значениях парциального давления кислорода, включая условия глубокой гипоксии. При концентрациях этих комплексов, равных 0,1-1 мкМ, в течение более длительной инкубации наблюдалось постепенное увеличение сигнала ЭПР семихинона *TIRON*. Представляется вероятным, что при низких концентрациях ДНКЖ происходит их более полное разрушение в реакции с супероксидом, причём в других условиях нельзя исключить возможность регенерации комплексов NO с участием митохондрий [2].

Кроме того, как видно из рисунка 2, глутатионовые ДНКЖ уже в концентрации 20 мкМ эффективно ингибируют медь-индуцированное перекисное окисление липопропротеидов низкой плотности (ЛНП). Уровень окислительной модификации ЛНП оценивали по образованию диеновых конъюгатов, которые являются вторичными продуктами перекисного окисления липидов и имеют максимум оптического поглощения при 234 нм. Важно, что восстановленный глутатион (GSH) был существенно менее эффективен, чем содержащие этот тиол ДНКЖ. Окисление ЛНП подавляли также ДНКЖ с фосфатными лигандами (рисунок 2). Однако после задержки, накопление диеновых конъюгатов возобновлялось, что может быть обусловлено меньшей стабильностью фосфатных ДНКЖ.

Эти результаты согласуются с антиоксидантным действием ДНКЖ в системе перекисного окисления липосом из яичного фосфатидилхолина, которое индуцировалось гидрофобным азоинициатором (*AIBN*). Кинетику образования свободных радикалов оценивали по люминол-зависимой хемилюминесценции. Установлено, что глутатионовые и фосфатные ДНКЖ существенно снижают уровень образующихся в этих условиях свободнорадикальных интермедиатов, в том числе и супероксида. Вместе с тем, GSH и NO усиливают люминол-зависимую хемилюминесценцию. Этот факт может быть связан с образованием тиольных радикалов при окислении GSH, а также продукцией пероксинитрита в реакции NO с супероксидом. Важно, что ДНКЖ с различными лигандами ингибировали хемилюминесценцию, вызванную *SIN-1*, при декомпозиции которого продуцируется NO и супероксид.

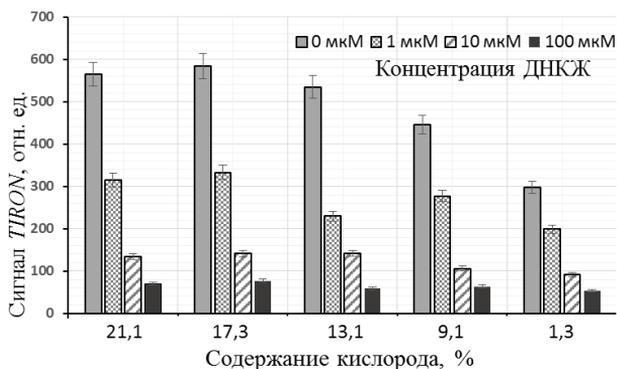


Рисунок 1 – Влияние различных концентраций глутатионовых ДНКЖ на продукцию супероксида митохондриями при различном парциальном давлении  $O_2$ . Добавки в инкубационную смесь: сукцинат и антимицин А.

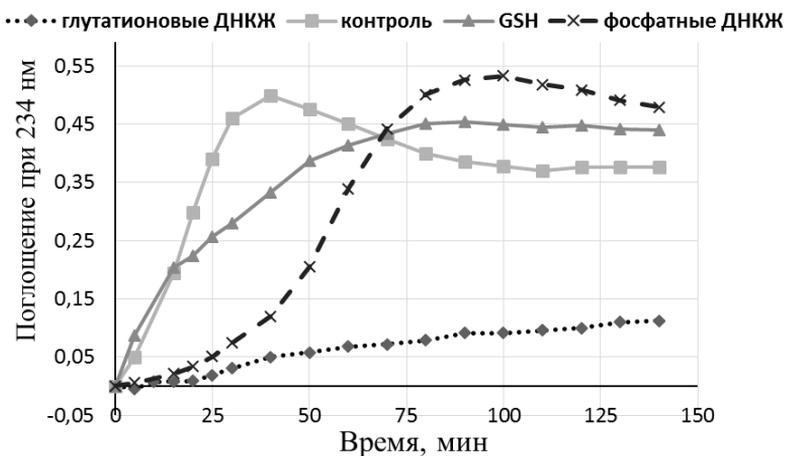


Рисунок 2 – Влияние глутатионовых и фосфатных ДНКЖ (20 мкМ) и GSH (40 мкМ) на  $Cu^{2+}$ -индуцированное перекисное окисление липидов в ЛНП из крови человека. Концентрация  $Cu^{2+}$  равна 20 мкМ

Таким образом, в различных системах генерирования свободных радикалов динитрозильные комплексы железа проявляют свойства эффективных антиоксидантов, причём эти свойства ДНКЖ не сводятся к антирадикальному действию входящих в них компонентов.

Работа поддержана грантами РФФИ № 14-04-01710 и 15-04-05211.

### Литература

1. Vanin, A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working form” of endogenous nitric oxide / A.F. Vanin // Nitric Oxide. – 2016. – Vol. 54. – P. 15-29.
2. Образование динитрозильных комплексов железа в митохондриях сердца / К.Б. Шумаев [и др.] // Биофизика. – 2010. – Т. 55. – С. 460-466.
3. Коркина, О.В. Генерация супероксидных радикалов митохондриями сердца: исследование методом спиновых ловушек в условиях непрерывной оксигенации / О.В. Коркина, Э.К. Рууге // Биофизика. – 2000. – Т. 45. – С. 695-699.

## ПРОЦЕССЫ ЛОКАЛИЗАЦИИ В КЛЕТКАХ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ

**Яковец И.В.<sup>1</sup>, Кравченко И.Е.<sup>1</sup>, Самцов М.П.<sup>2</sup>, Луговский А.А.<sup>2</sup>,  
Воропай Е.С.<sup>1</sup>, Зорин В.П.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*  
<sup>2</sup>*НИИПФП им. А.Н. Севченко, Минск, Беларусь*

Полиметиновые красители являются перспективными фотосенсибилизаторами (ФС) для целей фотодинамической терапии [1, 2]. Такие соединения обладают интенсивной полосой поглощения в области 700-800 нм, т.е. в спектральном диапазоне наибольшей «прозрачности» биологических тканей. Это позволяет значительно увеличить глубину фотоактивации молекул ФС. Использование полиметиновых красителей в фотодинамической терапии во многом осложняется их слабой растворимостью в водных растворах. Для решения данной проблемы можно использовать в качестве ФС конъюгаты полиметиновых красителей с различными водорастворимыми соединениями (полимеры, углеводы и т.д.). Подобная химическая модификация красителей позволяет не только по-

высить водорастворимость, но и в ряде случаев увеличить селективность их накопления в опухолях. Изменения физико-химических свойств ФС при конъюгации должны оказывать значительное влияние на процессы их взаимодействия с различными биологическими структурами, процессами локализации в клеточных и тканевых структурах. Целью данной работы являлось исследование влияния введения полиэтиленгликоля в структуру молекул индотрикарбоцианиновых красителей на процессы их накопления и локализации в клетках *in vitro*.

В работе исследовали наноструктурированный индотрикарбоцианиновый краситель, конъюгированный с двумя молекулами полиэтиленгликоля (ПКм), а также исходный краситель (ПК) без таких заместителей (рисунок 1) [2]. Указанные соединения разработаны и синтезированы в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ. Локализацию ФС в клетках изучали методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии на флуоресцентном микроскопе Leica TCS SPE (Германия). Накопление красителей в клетках регистрировалась с использованием проточной цитофлуориметрии на цитометре FC 500 (США).

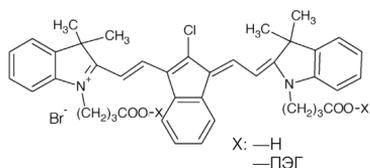


Рисунок 1 – Структурные формулы ПК и ПКм

Поскольку спектрально-флуоресцентные характеристики исследуемых красителей отличаются незначительно, то анализ средней интенсивности флуоресценции клеток с использованием техники проточной цитометрии позволяет количественно сравнивать кинетики накопления пигментов. Результаты исследований показали, что скорость и равновесный уровень накопления в клетках K562 исследуемых красителей существенно различаются. При физиологических условиях, скорость накопления наноструктурированного полиметинового красителя в клетках в несколько раз больше. Вследствие этого, равновесный уровень его накопления в клетках K562 в 5 раз больше.

Процесс накопления индотрикарбоцианиновых красителей является температурно-зависимым. Уменьшение температуры среды инкубации приводит к значительному торможению процессов накопления исследуемых красителей. При температуре 40 °С максимальный уровень накоп-

ления ФС в клетках наблюдается спустя 10 минут после начала инкубации и отличается более чем в 3 раза по сравнению с уровнем накопления при физиологических условиях.

Результаты флуоресцентной конфокальной микроскопии свидетельствуют о существенных различиях в характере внутриклеточной локализации исследуемых ФС (рисунок 2). В случае инкубации клеток K562 в присутствии ПК наблюдается слабая флуоресценция плазматической мембраны. Свечение цитоплазмы незначительно, в ней наблюдаются лишь отдельные сайты, флуоресцирующие в области испускания ФС. При окраске ПКм наблюдается диффузная прокраска всех цитоплазматических структур клеток.

Идентификация преимущественных сайтов внутриклеточной локализации ФС возможна с использованием метода флуоресцентной колокализации. С этой целью использовались флуоресцентные зонды, обладающие избирательностью накопления в митохондриях (Mito Tracker Green FM) и эндоплазматическом ретикулуме (ER-tracker Green). Исследовалось перекрытие флуоресцентных изображений клеток, при их одновременной окраске ФС и колокализаторами. Математическая обработка полученных изображений осуществлялась в программе ImageJ. Полученные результаты свидетельствуют, что сайты с повышенной флуоресценцией ПК в цитоплазме соответствуют митохондриальным структурам, тогда как в эндоплазматическом ретикулуме данный краситель практически не накапливается. Использование техники колокализации для клеток, окрашенных ПКм, подтверждает вывод об отсутствии преимущественной окраски каких-либо цитоплазматических структур.

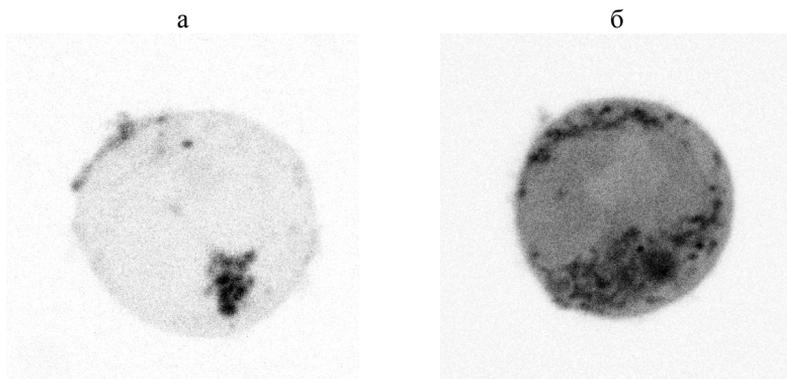


Рисунок 2 – Изображения клеток K562 в свете флуоресценции ПКм (а) и ПК (б)

Полученные данные показывают, что присутствие полиэтиленгликоля в молекулах полиметиновых красителей оказывает существенное влияние на процессы взаимодействия их с клетками: увеличивается скорость и уровень накопления ФС в клетках, значительно изменяется характер распределения пигмента между цитоплазматическими структурами клеток.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (Ф16МВ-006) и Министерства образования РБ.

#### **Литература**

1. Evaluation of Polymethine Dyes as Potential Probes for Near Infrared Fluorescence Imaging of Tumors: Part 1 / N.S. James [et al.] // *Theranostics*. – 2013. – Vol. 3, № 9. – P. 692-702.
2. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics / A.A. Lugovski [et al.] // *J. Photochem. and Photobiol. A: Chem.* – 2016. – Vol. 316, № 1. – P. 31-36.

## **АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ**

- Abashkin V. 223  
Apartsin E. 204, 207  
Bolotina L.N. 41, 229  
Bryzewska M. 37, 210, 217, 220, 223  
Buyanova M. 204, 207  
de Carranza J.S. 215  
Contel M. 213  
Davidovskii A.I. 31, 34  
Daxi X. 342  
Dubovskaya L.V. 226  
Dudko A.V. 31, 34  
Dzmitruk V. 210  
Elie B.T. 213  
Gabryelak T. 220  
Gapińska M. 217, 220  
Gómez R. 204, 207, 2223  
Gomez-Ramirez R. 210, 217, 220  
Gutiérrez C. 204, 207  
Gymez R. 213  
Gymez-Sal P. 213  
Ihnatsyeu-Kachan A. 37  
Ionov M. 37, 210, 217, 220, 223  
Harmaza Y.M. 226  
Jing G. 342  
Loznikova S. 223  
Majoral J.-P. 33, 126  
Maly M. 215  
Maroto-Díaz M. 213, 217, 220  
de la Mata F.J. 204, 207, 210, 213, 215, 217, 220, 223  
Michlewska S. 217, 220  
Milowska K. 126  
Paniagua E.F. 215  
Patiño J.L.P. 215  
Pedziwiatr-Werbicka E. 217, 223  
Peña-González C.E. 223  
Pérez-Serrano J. 213  
Sánchez-Milla M. 215  
Sánchez-Nieves J. 215, 223  
Shcharbin D. 217, 220  
Slobozhanina E.I. 226  
Stasiak K. 223  
Szwed A. 217, 220  
Tamashevski A.V. 226  
Tihonov K.D. 41  
Venyaminova A. 204  
Veresov V.G. 31, 34, 38  
Viter R. 226  
Volotovskii I.D. 226  
Ubelis A. 226  
Xiaodong W. 342  
Yakavets I.V. 41, 229  
Yankovsky I.V. 41, 229  
Zorin V.P. 41, 229  
Абашкин В.М. 44  
Абрамов А.А. 323, 379  
Ажгирей М.Д. 235  
Азарко И.И. 314  
Анашкина А.А. 146  
Андрианов А.М. 101, 104, 154  
Андрианов В.М. 46  
Анищенко И.В. 46  
Антонян А.П. 52  
Арабей С.М. 49  
Артюхов В.Г. 144, 247  
Артюхов В.Я. 188  
Асимов М.М. 232  
Асимов Р.М. 232  
Бабкин А.Ю. 397  
Бабодей В.Н. 138  
Багманян И.А. 314  
Базык-Новикова О.М. 235  
Базыль О.К. 188  
Бакакина Ю.С. 238  
Бакунович А.В. 311  
Балабушевич Н.Г. 391  
Балахар Гош 273

Банний В.А. 241  
Бараев В.А. 172  
Багай Л.Е. 244  
Батьян А.Н. 232  
Батюк Л.В. 296  
Башарина О.В. 247  
Белевич Е.И. 250  
Белевцев М.В. 273, 276  
Бельков М.В. 188  
Белясова Н.А. 141  
Беридзе Р.М. 76  
Бирюкова М.И. 58  
Бислюк Н.С. 157  
Бичан О.Д. 311  
Болодон В.Н. 281  
Борисовец Д.С. 336  
Бородин Т.А. 357  
Борхунова Е.Н. 382  
Борцисковски К. 24  
Босякова Е.В. 287  
Брышев М. 376  
Бугрова А.Е. 58  
Буланова К.Я. 311  
Бушмакина И.М. 336, 400  
Бушук Б.А. 117  
Бушук С.Б. 117  
Бычкова А.В. 58, 67  
Ваваева А.В. 323  
Ванин А.Ф. 16, 379, 403  
Вардеванян П.О. 52, 55  
Васильев В.Б. 309, 363, 365, 368  
Васильева А.Д. 58  
Венская Е.И. 253  
Вересов В.Г. 20  
Власенко А.Ю. 363  
Власова И.И. 61  
Войченко Н.В. 256  
Волотовская А.В. 256  
Волотовский И.Д. 238  
Воробей А.В. 73, 117  
Воропай Е.С. 114, 351, 406  
Вчерашня А.В. 259, 333  
Галюк Е.Н. 64  
Гармаза Ю.М. 281  
Гилевич С.Н. 120  
Голенова И.А. 284  
Головач Т.Н. 263  
Гольцев М.В. 235  
Горобец М.Г. 67  
Горудко И.В. 365  
Горюнов А.С. 70, 160  
Гречникова М.А. 403  
Григорьева Д.В. 365  
Гуринович В.А. 357  
Гуринович В.В. 73  
Данилова Т.А. 58  
Демидчик Т.А. 172  
Джагаров Б.М. 79, 120, 123  
Дорошкевич А.С. 76  
Дубовская Л.В. 238  
Дударков А.Н. 330, 333  
Дудылина А.Л. 266, 403  
Егоренков Н.И. 370  
Едимечева И.П. 169, 182  
Жарникова Е.С. 79, 123  
Жердева В.В. 351  
Жулябина О.А. 83  
Завадская О.А. 191, 194  
Завадская Т.С. 293  
Заикин А.В. 86  
Залеская Г.А. 269  
Захаркина О.Л. 388  
Захарова Е.Т. 309, 368  
Збирухович А.О. 354  
Звягинцева М.А. 323  
Зеленецкая М.Г. 247  
Зенков Н.К. 330  
Зенькевич Э.И. 24, 89, 92  
Зинченко А.А. 150  
Зинчук В.В. 300

Золотарь Н.Ф. 179  
Зорин В.П. 273, 406  
Зорина Т.Е. 273, 276  
Зубрицкая Г.П. 281, 360  
Ибрагимова Г.А. 391  
Иванов А.А. 306  
Иванова М.В. 266  
Иванова С.В. 284  
Ивашин Н.В. 163  
Игнатенко В.А. 76, 241  
Игнатьева Н.Ю. 388  
Инсарова Н.И. 306  
Казущик В.Л. 327  
Каленчик С.И. 287  
Кальвинковская Ю.А. 117  
Канунникова Н.П. 354  
Каплевский К.Н. 351, 373  
Капустин М.А. 95, 98, 290  
Карпович А.И. 336  
Качалова Е.А. 293  
Качалова Н.М. 293  
Кашин И.А. 101, 154  
Кивач Л.Н. 135  
Килин Д.С. 92  
Кисель М.А. 104  
Клыкковская Д.Г. 194  
Книгавко В.Г. 296  
Кнюкшто В.Н. 89  
Князева Е.В. 336  
Коваленко В.Н. 166  
Козлов М.В. 397  
Козлов С.О. 368  
Козловская Н.А. 400  
Козловский В.И. 300  
Кондратов Г.В. 382  
Кондрашова К.В. 346  
Кондыба Н.И. 357  
Кононихин А.С. 58  
Константинова Е.Э. 303, 370  
Константинова М.Л. 67  
Корноушенко Ю.В. 104  
Коробкина И.А. 247  
Королевич М.В. 46  
Королик Е.В. 306  
Космачевская О.В. 403  
Костанова Е.А. 58  
Костевич В.А. 309, 363, 365, 368  
Костин Г.М. 250  
Костин Д.Г. 250  
Кравцова О.И. 263  
Кравченко И.Е. 273, 276, 406  
Красненкова Т.П. 373  
Красочко П.А. 336  
Криволап А.А. 311  
Кубарко А.И. 327  
Кужель Н.С. 303, 370  
Кузнецов Б.К. 76  
Кузнецова И.М. 129  
Кузовков П.В. 175  
Куприенко О.С. 179  
Куриленко А.А. 169  
Курченко В.П. 263, 314  
Кутько А.Г. 281  
Лабор С.А. 107, 110  
Лавыш А.В. 114, 129, 135  
Лакомкин В.Л. 323, 379  
Лактионов П.П. 238  
Ландо Д.Ю. 64  
Ланкин В.З. 317  
Лапина В.А. 117  
Ларкина Е.А. 89  
Ласкина О.В. 269  
Леонова В.Б. 58, 67  
Лепешкевич С.В. 120  
Лепешкевич С.В. 123  
Леусенко И.А. 342  
Лещенко В.Г. 306, 327  
Лисовская А.Г. 157, 182  
Лишик О.И. 175  
Лобанок Л.М. 311

Лозникова С.Ж. 126  
Лойко В.О. 185  
Луговский А.А. 114, 129, 351, 406  
Луговский А.П. 129, 351, 373  
Лукиенко Е.П. 354  
Лукьяненко Л.М. 253, 360  
Луценко В.Е. 363  
Лысенкова А.В. 76  
Людчик Т.Б. 235  
Лялина Е.М. 320  
Ляшенко Л.С. 351  
Майер Г.В. 188  
Максименко А.В. 323  
Мальшко Е.В. 132  
Мансуров В.А. 327  
Мартинович Г.Г. 259, 330, 333  
Мартинович И.В. 259, 330, 333  
Мартынова М.А. 336, 400  
Маскевич А.А. 114, 129, 135  
Маскевич С.А. 135  
Матвейко Н.П. 141  
Мацкевич В.А. 61  
Меерович И.Г. 351  
Мельникова Г.Б. 141, 303  
Меньщикова Е.Б. 330  
Микаелян М.С. 55  
Микулич А.В. 342  
Миланович Н.Ф. 306  
Миронова Е.В. 303  
Михаловский И.С. 138, 141  
Михальчик Е.В. 61, 391  
Мойсеёнок А.Г. 357  
Молчан М.М. 400  
Молчанов М.Д. 388  
Морозова О.М. 306  
Мурина М.А. 339, 346  
Насек В.М. 351  
Небольсина А.А. 144  
Некрасов А.Н. 146, 150  
Николаев Г.И. 154  
Николаев Е.Н. 58  
Омельянчик С.Н. 357  
Осипов А.Н. 382  
Павич Т.А. 49, 117  
Панада Я.В. 191  
Панарин А.Ю. 163  
Панасенко О.М. 365  
Парсаданян М.А. 55  
Пархач Л.П. 287  
Пархоц М.В. 79, 120, 123  
Петренёв Д.Р. 370  
Петров П.Т. 351  
Пирогова В.В. 194  
Плавская Л.Г. 342  
Плавский В.Ю. 342  
Поддубный А.А. 76  
Пономаренко Н.С. 296  
Попцова М.С. 86  
Пронько П.С. 357  
Проценко К.О. 157  
Пугаченко И.С. 403  
Путинцева О.В. 144  
Пчельникова А.В. 138  
Рачкова Т.А. 250  
Ринейская О.Н. 64  
Рожков С.П. 70, 160  
Розенфельд М.А. 58, 67  
Рощупкин Д.И. 339, 346  
Рудая Е.В. 191, 194  
Рууге Э.К. 266, 349, 379, 403  
Саакян В.Г. 52  
Савицкий А.П. 351  
Сагун Е.И. 163  
Сакевич Л.А. 92  
Самович С.Н. 166, 169  
Самойлов М.В. 141  
Самцов М.П. 129, 351, 373, 394, 406  
Сатановская В.И. 357  
Свати Бисвоз 273

Свердлов Р.Л. 172, 175  
Свириденко Л.Ю. 293  
Свиридов О.В. 179  
Семенкова Г.Н. 182  
Семенов Д.И. 284  
Семенович Д.С. 354, 357  
Сергиенко В.И. 339, 346  
Серова Т.М. 339  
Серченя Т.С. 179  
Сидоренко В.Н. 311  
Скоробогатова А.С. 253, 360  
Скрёбкова А.С. 175  
Сладкова А.А. 182, 185  
Слобожанина Е.И. 250, 281, 360  
Смирнов А.А. 354  
Смирнов В.Ю. 107, 110  
Смолина Н.В. 61, 391  
Соколов А.В. 309, 363, 365, 368  
Солонец К.В. 354  
Сотникова В.В. 76  
Спахова Я.Г. 247  
Старикова Э.А. 363  
Стародубцев И.Е. 370  
Стародубцева М.Н. 370  
Старухин А.С. 24  
Степанов М.А. 92  
Степура В.И. 107, 110, 135  
Степура И.И. 107, 110  
Ступак А.П. 89  
Сульимова Н.Б. 67  
Суханова Г.А. 70  
Суходола А.А. 126  
Сушинская Н.В. 314  
Талабаев М.В. 287  
Тамкович С.Н. 238  
Тарасевич В.А. 141  
Тарасов Д.С. 373  
Тарасов С.Д. 351  
Тарун Е.И. 263  
Твердислов В.А. 28, 83, 132  
Терехова М. 376  
Тимошин А.А. 379  
Титов В.Ю. 382  
Титовец Э.П. 287, 385  
Тихазе А.К. 317  
Тихомиров С.А. 126  
Товстоган Ю.О. 157  
Толстая Т.Н. 303  
Толсторожев Г.Б. 188  
Топунов А.Ф. 403  
Третьякова А.И. 342  
Трифанов П.В. 388  
Трушко В.А. 185  
Тузиков А.В. 101, 104, 154  
Туроверов К.К. 129  
Тутанов О.С. 238  
Улащик В.С. 256  
Усс А.Л. 306  
Фалетров Я.В. 191, 194  
Федоркова М.В. 61, 391  
Фролова Н.С. 191, 194  
Хватов А.В. 397  
Хлопицкий С. 300  
Хлудеев И.И. 394  
Ходасевич И.А. 244  
Хорецкий М.С. 191, 194  
Цапаева Н.Л. 303  
Чанг Ч.-Л. 64  
Черенкевич С.Н. 259, 333, 365  
Чижик С.А. 303  
Чикунова А.П. 58  
Човпан А.А. 296  
Чубарова А.С. 95, 98, 290  
Чудновская Е.В. 314  
Шагинян М.А. 55  
Шадыро О.И. 157, 166, 169, 172,  
175, 182, 185, 188, 259  
Шаповал Е.В. 400  
Шендикова Е.Н. 197, 201  
Шиченко Н.А. 232

Шишкина Л.Н. 397  
Шкуматов В.М. 191, 194  
Шляхтун А.Г. 357  
Шман Т.В. 276  
Шотт А.В. 327  
Шуканова Н.А. 336, 400  
Шумаев К.Б. 266, 403  
Щеголихин А.Н. 58  
Юркова И.Л. 197, 201  
Якимович Е.А. 290  
Яковец И.В. 273, 276, 406  
Янковский И.В. 276  
Янцевич А.В. 110  
Ястремская Н.С. 354  
Яшкин М.Н. 388

Научное издание

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ, МЕМБРАННЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ  
ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОСИСТЕМ**

**Международная научная конференция**

**Двенадцатый съезд Белорусского общественного объединения  
фотобиологов и биофизиков**

**Минск, 28—30 июня 2016 г.**

**СБОРНИК СТАТЕЙ**

**В двух частях**

**Часть 1**

*На русском и английском языках*

Редакторы *П. М. Булай, О. Д. Бичан*

Дизайн обложки *П. М. Булая*

Техническое редактирование и компьютерная верстка

*Т. Н. Питлика, П. М. Булая, Д. В. Григорьевой*

Корректор *О. Д. Бичан*

Подписано в печать 13.06.2016. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.

Ризография. Усл. печ. л. 24,18. Уч.-изд. л. 19,60.

Тираж 230 экз. Заказ 301.

Республиканское унитарное предприятие

«Издательский центр Белорусского государственного университета».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/159 от 27.01.2014.

Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.

Отпечатано с оригинала-макета заказчика

в республиканском унитарном предприятии

«Издательский центр Белорусского государственного университета».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.

Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.

**Для заметок**

Для заметок

**Для заметок**

Для заметок