



**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси**

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ, МЕМБРАННЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОСИСТЕМ

**Тезисы докладов
международной научной конференции,
Четырнадцатого съезда Белорусского общественного
объединения фотобиологов и биофизиков**

Беларусь, Минск, 17–19 июня 2020 г.

Научное электронное издание

Минск, БГУ, 2020

ISBN 978-985-566-940-2

© БГУ, 2020

УДК 557.3(06)
ББК 28.071я431

Редакционная коллегия:

И. Д. Волотовский (отв. ред.), С. Н. Черенкевич,
Е. И. Слобожанина, Л. Ф. Кабашникова, Н. Г. Аверина,
В. Г. Вересов, Г. Г. Мартинович, Д. Г. Щербин, В. П. Зорин,
Т. Е. Зорина, А. И. Хмельницкий, Л. М. Лукьяненко, Н. В. Козел

Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем [Электронный ресурс] : тез. докл. междунар. науч. конф., Четырнадцатого съезда Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, Беларусь, Минск, 17–19 июня 2020 г. / Белорус. гос. ун-т ; редкол.: И. Д. Волотовский (отв. ред.) [и др.]. – Минск : БГУ, 2020. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – ISBN 978-985-566-940-2.

Представлены тезисы докладов международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» и Четырнадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. Издание приурочено к 100-летию Белорусского государственного университета.

Организаторами конференции и съезда выступили Белорусский государственный университет, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Белорусское общественное объединение фотобиологов и биофизиков.

Адресуется специалистам в области биофизики, фотобиологии, биоинженерии, биохимии, молекулярной и клеточной биологии, медицины.

Минимальные системные требования:

PC, Pentium 4 или выше; RAM 1 Гб; Windows XP/7/10;
Adobe Acrobat.

Оригинал-макет подготовлен в программе Microsoft Word.

На русском и английском языках

В авторской редакции

Ответственный за выпуск *О. Д. Бичан*

Подписано к использованию 16.06.2020. Объем 3,2 МБ.

Белорусский государственный университет.
Управление редакционно-издательской работы.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.
Телефон: (017) 259-70-70.
email: urir@bsu.by
<http://elib.bsu.by>

Содержание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА И БИОИНФОРМАТИКА

Faletrov Y.V., Dudko A.R., Horetski M.S., Frolova N.S., Shkumatov V.M. REACTIONS OF NBD-CHLORIDE WITH VARIOUS NUCLEOPHILES AND POTENTIAL BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THE PRODUCTS	21
Horetski M.S., Dudko A.R., Faletrov Y.V., Frolova N.S., Shkumatov V.M. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF FLUORESCENT MIKONAZOLE DERIVATIVES	22
Horetski M.S., Faletrov Y.V., Plocinska R., Brzostek A., Dziadek J., Shkumatov V.M. BODIPY-LABELED ISONIAZID DERIVATIVES AS TUBERCULOSIS PRODRUGS	23
Panada J.V., Klopava V.A., Kulahava T.A., Faletrov Y.V., Frolova N.S., Shkumatov V.M. STUDY OF INDOLE AND ALKYNE STEROIDS AS POTENTIAL CYP17A1 INHIBITORS AND GLIOMA GROWTH REGULATORS	24
Tarabara U.K., Kirilova E., Kirilov G., Vus K.O., Zhytniakivska O.A., Trusova V.M., Gorbenko G.P. AMYLOID FIBRILS AS A SCAFFOLD FOR CASCADE ENERGY TRANSFER	25
Urban V.A., Davidovskii A.I., Veresov V.G. <i>IN-SILICO</i> ANALYSIS OF PD-L1 DYNAMICS INDUCED BY SMALL-MOLECULAR INHIBITORS OF PD-1 –PD-L1 AXIS	26
Urban V.A., Davidovskii A.I., Veresov V.G. <i>IN-SILICO</i> ANALYSIS OF RESVERATROL-INDUCED PD-L1 DIMERIZATION	27
Арабей С.М., Павич Т.А., Станишевский И.В., Кожич Д.Т., Слонская С.В., Логвинович П.Н., Соловьев К.Н. ДЕЗАГРЕГАЦИЯ МОЛЕКУЛ Zn-ОКТАКАРБОКСИФТАЛОЦИАНИНА В НАНОПОРИСТОЙ СИЛИКАТНОЙ ГЕЛЬ-МАТРИЦЕ	28
Бич Н.Н. АВТОМАТИЧЕСКОЕ РАСПОЗНАВАНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО ФОНА ЧЕЛОВЕКА ПО ПАРАМЕТРАМ НЕСКОЛЬКИХ БИОМЕТРИЧЕСКИХ ИСТОЧНИКОВ	29
Бондаренко В.Ю., Шашко А.Ю., Тишель В.В., Светлаков В.И., Черныш М.А., Пржевальская Д.А., Лазерко Н.В., Шамшеня А.А., Барковский А.В., Демидчик В.В. АНАЛИЗ ПРОЦЕССОВ УКОРЕНЕНИЯ МИКРОКЛОНОВ <i>FORSYTHIA</i> × <i>INTERMEDIA IN VITRO</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЁРТОЧНЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ	30
Ветошкин А.А., Гриусевич П.В., Самохина В.В., Новосельский И.Ю., Смолич И.И., Соколик А.И., Демидчик В.В. ПЕРВИЧНЫЙ БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ИОННЫХ КАНАЛОВ СЕМЕЙСТВА CNGC У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ	31
Гапеева Т.А., Василевич И.Б., Костюк Н.И., Пинчук С.В., Стрельченя И.И., Барсукова М.В., Ломако Ю.В., Волотовский И.Д. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА	32

Гапеева Т.А., Мисюкевич А.Ю., Волотовский И.Д. АКТИВАЦИЯ ГЕНА ПЕРОКСИДАЗЫ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА	33
Говорова Ю.С. ПОНИЖЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ ОКСИЭТИЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО ГЛИЦЕРИНА СО СТЕПЕНЬЮ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ N=25 ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ ХРАНЕНИИ	34
Горохова Н.И., Полешко А.Г., Пинчук С.В., Волотовский И.Д. ОБ ИНДУЦИРОВАННОЙ ГЕПАТОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫС	35
Заводник И.Б., Лапшина Е.А., Заводник Л.Б., Ильич Т.В., Головач Н.Г., Дремза И.К., Климович И.И., Коваленя Т.А. РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ ИОНАМИ КАЛЬЦИЯ	36
Ермоленко Д.А., Мисюкевич А.Ю., Полешко А.Г., Волотовский И.Д. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАСЛЕДСТВЕННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ МУКОВИСЦИДОЗА. ПРИРОДА МУТАЦИИ	37
Золотарева Е.К. АТФсинтаза КАК МОЛЕКУЛЯРНАЯ МИШЕНЬ ПРИ РАЗРАБОТКЕ НОВОГО КЛАССА ЛЕКАРСТВ И ПЕСТИЦИДОВ	38
Коваленя Т.А., Ильич Т.В., Савко А.И., Храмова П.С. ЭФФЕКТ КВЕРЦЕТИНА И КОМПЛЕКСА КВЕРЦЕТИН-ГИДРОКСИПРОПИЛ-β-ЦИКЛОДЕКСТРИН ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МИТОХОНДРИЙ <i>IN VITRO</i>	39
Коробкина Ю.Д., Симоненко Е.Ю., Свешникова А.Н. МЕХАНИЗМЫ КАЛЬЦИЕВОЙ РЕГУЛЯЦИИ ОТВЕТА СПЕРМАТОЗОИДОВ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА НА ПРОГЕСТЕРОН	40
Лепешкевич С.В., Сазанович И.В., Пархоц М.В., Гилевич С.Н., Джагаров Б.М. КОНФОРМАЦИОННАЯ РЕЛАКСАЦИЯ И ПОВТОРНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА С α И β ЦЕПЯМИ ГЕМОГЛОБИНА ВО ВРЕМЕННОМ ДИАПАЗОНЕ ОТ ПИКОСЕКУНДЫ ДО МИЛЛИСЕКУНДЫ.....	41
Самохина В.В., Шашко А.Ю., Войтехович М.А., Мацкевич В.С., Бондаренко В.Ю., Смолич И.И., Демидчик В.В. ФЕНОТИПИРОВАНИЕ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДИКИ ЗАМЕНЫ СРЕДЫ	42
Скоростецкая Л.А., Герловский Д.О., Ремеева Е.А., Артемьева Ю.Н., Василевская Е.Д., Биричевская Л.Л., Винтер М.А., Зинченко А.И., Михайлопуло И.А., Литвинко Н.М. ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ УРИДИНА НА ПАНКРЕАТИЧЕСКУЮ ФЛА₂ МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ	43
Лобышев В.И. НЕОБЫЧНЫЕ СВОЙСТВА РАЗБАВЛЕННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ	44
Лобышев В.И. ФИЗИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОДЫ С УМЕНЬШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ	45

Маскевич А.А., Лычагина Ю.а., Луговский А.А., Лавыш А.В., Воропай Е.С., Глебович Т.С., Степура В.И. СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА TH-C11 - АНИОННОГО ПРОИЗВОДНОГО ТИОФЛАВИНА Т	46
Мелеховец Е.В., Фалетров Я.В., Фролова Н.С., Шкуматов В.М. NBD-ТРИМЕТАЗИДИН И NBD-ВАНИЛИН: ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ <i>IN SILICO</i>	47
Онойко О.Б., Хомочкин А.П., Михайленко Н.Ф., Золотарева Е.К. ВЛИЯНИЕ СУЛЬФАНИЛАМИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННОЙ CF₁-АТФАЗЫ ХЛОРОПЛАСТОВ ШПИНАТА	48
Панкова С.М., Нехаев И.С., Дьяченко П.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА СВОБОДНЫЕ И ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ	49
Пархоц М.В., Кнюкшто В.Н., Закоян А.А., Мкртчян Л.В., Гюльханданян А.Г., Симонян Г.М., Гюльханданян Г.В., Джагаров Б.М. КОМПЛЕКСЫ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА С ПОРФИРИНАМИ – МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В БИОСТРУКТУРАХ ПРИ ФДТ	50
Пашкевич Л.В. ТЕРМОИНДУЦИРОВАННЫЙ СИНТЕЗ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ИНФИЦИРОВАННЫХ ГРИБОМ <i>BIPOLARIS SOROKINIANA</i> РАСТЕНИЯХ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ	51
Пашенко И.А., Балабин Ф.А., Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. КАЛЬЦИЕВЫЕ ОСЦИЛЛЯЦИИ В ОДИНОЧНЫХ ТРОМБОЦИТАХ	52
Позняк Г.И., Фалетров Я.В., Шкуматов В.М. NBD-ДИПИКОЛИЛАМИН КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИНГИБИТОР ZN²⁺-СОДЕРЖАЩИХ ФЕРМЕНТОВ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ <i>IN SILICO</i>	53
Смирнов А.А., Кабачевская Е.М., Гапеева Т.А., Мисюкевич А.Ю., Суховеева С.В., Волотовский И.Д. ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ В КЛЕТКАХ ЛИСТЬЕВ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ДЕЙСТВИЮ ФИТОПАТОГЕНОВ	54
Станишевский И.В., Арабей С.М. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ СКОРОСТЕЙ ФОТОПРОЦЕССОВ В БИОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫХ МЕТАЛЛОПОРФИРИНАХ МЕТОДОМ РЕШЕНИЯ ОБРАТНОЙ ФОТОКИНЕТИЧЕСКОЙ ЗАДАЧИ	55
Старовойтова В.А., Фалетров Я.В., Шкуматов В.М. ПОИСК НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ИНДОЛАМИН 2,3-ДИОКСИГЕНАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА	56
Степура В.И., Гоголева С.Д., Лавыш А.В., Маскевич А.А., Луговский А.А., Тихомиров С.А., Буганов О.В., Baruah K., Sarma B.–K. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СЕНСОРЫ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ТИОФЛАВИНА Т	57

Степуро И.И., Агейко С.А., Степуро В.И., Травкина М., Янцевич А.В. ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ РИБОФЛАВИНОМ ОКИСЛЕНИЕ ТИАМИНА И ТИАМИНДИФОСФАТА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ УЛЬТРАФИОЛЕТА И ВИДИМОГО ИЗЛУЧЕНИЯ	58
Хрусталёв В.В., Бондаренко А.В., Хиневич Н.В., Хрусталёва Т.А. МЕТОД ОБРАБОТКИ КАРТ СПЕКТРОВ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ	59

МЕМБРАННАЯ И КЛЕТОЧНАЯ БИОФИЗИКА

Demidchik V., Smolich I., Yu Min, Huang Xin ROS-ACTIVATED FLUXES OF ELECTROLYTES ACROSS THE PLANT PLASMA MEMBRANE UNDER ABIOTIC STRESS CONDITIONS	61
Fediuk O.M., Bilyavska N.O. CHANGES IN ANATOMICAL VARIABLES DETERMINING MAXIMUM STOMATAL CONDUCTANCE IN LEAVES <i>VINCA MINOR</i> L. DURING EARLY SPRING	62
Kukhareenko L.V., Walheim S., Barczewski M., Gröger R., Schimmel Th., Shman T.V., Tarasova A.V. HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS STUDY WITH ATOMIC FORCE AND FLUORESCENCE MICROSCOPY	63
Batyuk L.V., Kizilova N.N. MODELING THE STRUCTURE OF HEMOGLOBIN APPLYING A DIELECTRIC METHOD FOR MONITORING THE STATE OF BIOLOGICAL OBJECTS	64
Бачище Т.С., Кондратьева В.В., Савченко Г.Е. ОЦЕНКА ПРАЙМИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ β-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКОГО И БИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА	65
Бачище Т.С., Мартысюк А.В., Макаров В.Н. ИНДУКЦИЯ НАКОПЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ ПОЛИФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ В КАЛЛУСАХ ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L.) В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ	66
Бесчасный С.П., Гасюк Е.Н. ДЕЙСТВИЕ ДОНОРА МОНООКСИДА УГЛЕРОДА (CORM-2) НА $K^+(Ca^{2+})$ КАНАЛЫ И АКВАПОРИНЫ ЭРИТРОЦИТОВ	67
Болдова А.Е., Тюрин-Кузьмин П.А., Свешникова А.Н. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК	68
Обернихин С.С., Яглова Н.В., Назимова С.В., Яглов В.В. ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЙОД-АККУМУЛИРУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ	69
Васильев Г.А., Гарсон Д.А.К., Филькова А.А., Свешникова А.Н. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ МОДЕЛИ ОБРАТИМОЙ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ	70
Вейко А.Г. ЭФФЕКТ ФЛАВОНОИДОВ НА СТРУКТУРУ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ МЕМБРАН	71

Войтехович М.А., Куликович А.В., Смолич И.И., Демидчик В.В. ВОЗДЕЙСТВИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С ПЕРЕХОДНЫМИ МЕТАЛЛАМИ НА СИСТЕМУ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ	72
Ганцева Е.Р., Ганцева А.Р., Коваленко Т.А., Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. МЕХАНИЗМЫ СБОРКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КОМПЛЕКСА ПРОТРОМБИНАЗЫ НА ПОВЕРХНОСТИ ФОСФОЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛ	73
Гармаза Ю.М. МЕТАБОЛИЗМ ЦИНКА В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ	74
Гарсон Д.А.К., Корнейчук А.Д., Филькова А.А., Свешникова А.Н. ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ	75
Горбунов Н.П., Костевич В.А., Соколов А.В. ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ С ГАЛОФОБНЫМИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ	76
Гриусевич П.В., Толкачева Ю.В., Новосельский И.Ю., Нитиевский В.А., Соколик А.И., Демидчик В.В. АНАЛИЗ ТОКОВ ОРГАНИЧЕСКИХ АНИОНОВ ЧЕРЕЗ ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ КЛЕТОК КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ	77
Денисов А.А., Булай П.М., Питлик Т.Н., Никифоров А.В., Токальчик Д.П., Пашкевич С.Г., Черенкевич С.Н. АППАРАТНО-ПРОГРАММНЫЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СИНАПТИЧЕСКИХ И НЕЙРОСЕТЕВЫХ ПРОЦЕССОВ В НЕРВНОЙ ТКАНИ	78
Денисов А.А., Досина М.О., Токальчик Ю.П., Пашкевич С.Г., Черенкевич С.Н. ФОРМИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПАТТЕРНОВ МЕТОДОМ БИОПЕЧАТИ	79
Звонарев С.Н., Касперович Е.С., Мацкевич В.С., Angelis K.J., Демидчик В.В. ИНДУКЦИЯ ОДНО- И ДВУЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В КЛЕТКАХ ПРОТОНЕМЫ МХА <i>PHYSCOMITRELLA PATENS</i> В ОТВЕТ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕСС ФАКТОРОВ	80
Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Дмитриев А.П. ВОВЛЕЧЕНИЕ БЕЛКОВ ЖАСМОНАТНОГО СИГНАЛИНГА В РЕАЛИЗАЦИЮ СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ СЕРОВОДОРОДА У <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	81
Мацкевич В.С., Шикер А.А., Лицкевич К.С., Рекиш А.Л., Смолич И.И., Демидчик В.В. СИГНАЛЬНЫЕ И АДАПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ, ИНДУЦИРУЕМЫЕ Ni^{2+} И КОМПЛЕКСАМИ Ni-ГИСТИДИН, В КЛЕТКАХ КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ..	82
Мокросноп В.М., Золотарева Е.К. ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЭТАНОЛА КАК СУБСТРАТА НА КУЛЬТУРУ КЛЕТОК МИКРОВОДОРОСЛИ <i>EUGLENA GRACILIS</i>	83
Никифоров А.В., Питлик Т.Н., Денисов А.А. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ И АНАЛИЗ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ СРЕЗА ГИППОКАМПА	84

Новосельский И.Ю., Гриусевич П.В., Демидчик В.В. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ АФК-ЗАВИСИМОГО СЕНСОРА В СТРУКТУРЕ КАЛИЕВОГО КАНАЛА GORK	85
Плавский В.Ю., Микулич А.В., Барулин Н.В., Ананич Т.С., Собчук А.Н., Третьякова А.И., Плавская Л.Г., Леусенко И.А. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ЗЕЛЕННОЙ И КРАСНОЙ ОБЛАСТЕЙ СПЕКТРА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ	86
Поведайло В.А., Тихомиров С.А., Широканов А.Д., Шманай В.В., Яковлев Д.Л. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА КАРБОКСИФЛУОРЕСЦЕИНОВЫХ БИФЛУОРОФОРОВ	87
Самохина В.В., Мацкевич В.С., Соколик А.И., Демидчик В.В. АНАЛИЗ СИСТЕМЫ ВЫХОДА K^+ ИЗ КЛЕТОК КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОФИЗИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ	88
Силинг Е.А., Глухова А.А., Мартьянов А.А., Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОЙ МЕТКИ К РРЗ	89
Смолич И.И., Лукашевич В.А., Демидчик В.В. МЕХАНИЗМЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ВЫСШИЕ РАСТЕНИЯ	90
Стародубцева М.Н., Челнокова И.А., Шклярова А.Н., Цуканова Е.В., Егоренков Н.И., Чешик И.А. ИНДУЦИРОВАННЫЕ НИЗКОЧАСТОТНЫМ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫМ ПОЛЕМ НАНОМАСШТАБНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ И МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТИ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ	91
Стрельцова Д.Е., Жабинский В.Н., Хрипач В.А., Демидчик В.В. ОСОБЕННОСТИ МОДИФИКАЦИИ РАБОТЫ ИОННЫХ КАНАЛОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ РАСТЕНИЙ НА СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ БРАССИНОСТЕРОИДЫ	92
Суховеева С.В., Кабачевская Е.М., Волотовский И.Д. ВЛИЯНИЕ ГРАВИСТИМУЛЯЦИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ КАЛЬЦИЙ-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ ВЕРХУШЕЧНЫХ ЛИСТЬЕВ ТОМАТА	93
Тамашевский А.В. РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСПОРТНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА	94
Уснич С.Л., Наекова С.К., Колбанов Д.В., Мацкевич В.С., Пржевальская Д.А., Черныш М.А., Лазерко Н.В., Демидчик В.В. ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕРАЦИИ АФК ПРИ ВЫВЕДЕНИИ МИКРОКЛОНОВ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯ <i>EX VITRO</i>	95
Харитонова В.Р., Сидоров А.В. ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕРВНЫХ КЛЕТОК <i>LUMNAEA STAGNALIS</i>	96
Ходжазода Т.А., Муллоев Н.У. МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ ТЕПЛОВЫХ НЕЙТРОНОВ НА СВОЙСТВА СЕМЯН ХЛОПЧАТНИКА ПО ДАННЫМ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ ..	97

Цуканова Е.В., Шклярова А.Н., Челнокова И.А., Горох Г.А., Стародубцева М.Н.	
СТРУКТУРНЫЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОВЕРХНОСТНОГО СЛОЯ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫСЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ ПРОМЫШЛЕННОЙ ЧАСТОТЫ	98
Шаповалов Ю.А.	
РАДИКАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В СТРУКТУРАХ КЛЕТОК	99
Шкляревский М.А., Карпец Ю.В., Швиденко Н.В., Колупаев Ю.Е.	
СЕРОВОДОРОД КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПОСРЕДНИК ИНДУЦИРОВАНИЯ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ЭКЗОГЕННОЙ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ	100

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

Shkliarava N.M., Chelnokova I.A., Karachrysafi S., Papamitsou Th., Sioga A., Komnenou A., Karampatakis V., Starodubtseva M.N.	
STRUCTURAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF THE SURFACE OF ERYTHROCYTES AFTER INTRAVITREAL ADMINISTRATION OF ANTIFUNGAL DRUGS TO RABBITS	102
Басырева Л.Ю., Федорова Е.А., Гусев С.А., Панасенко О.М.	
ГИПЕРГЛИКЕМИЯ ИНИЦИИРУЕТ НЕТОЗ В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА	103
Белевич Е.И., Климкович Н.Н., Козарезова Т.И., Слобожанина Е.И.	
АКТИВНОСТЬ КАСПАЗЫ-3 И ЭКСПОНИРОВАНИЕ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА В ЭРИТРОЦИТАХ ПОДРОСТКОВ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ	104
Белевич Е.И., Тамашевский А.В., Канаш Ю.С., Гармаза Ю.М., Слобожанина Е.И.	
ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА ЛИТИЯ НА ПРОТЕКАНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА <i>IN VITRO</i>	105
Белько Н.В., Самцов М.П., Тарасов Д.С., Петров П.Т.	
СТАБИЛЬНОСТЬ СУСТАНЦИИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ	106
Вахрушева Т.В., Гусев С.А., Басырева Л.Ю., Графская Е.Н., Лацис И.А., Панасенко О.М., Лазарев В.Н.	
ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НОВЫХ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ КАТИОННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ НА НЕЙТРОФИЛЫ ЧЕЛОВЕКА	107
Вахрушева Т.В., Панасенко О.М., Матюшкина Д.С., Графская Е.Н., Лацис И.А., Григорьева Д.В., Горудко И.В., Иванов В.А., Лазарев В.Н., Соколов А.В.	
ВОЗМОЖНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ КАТИОННЫМИ АНТИМИКРОБНЫМИ ПЕПТИДАМИ И НЕЙТРОФИЛЬНОЙ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗОЙ	108
Венская Е.И., Лукьяненко Л.М., Зубрицкая Г.П., Скоробогатова А.С.	
ЭФФЕКТЫ СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ СВИНЦА И АМИЛОИДОВ НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА <i>IN VITRO</i>	109
Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н.	
СТРУКТУРНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО И КИСЛОТНОГО СТРЕССА	110

Вчерашняя А.В., Мартинович И.В., Мартинович Г.Г., Шадыро О.И., Черенкевич С.Н. СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА – НОВЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ АПОПТОЗА КЛЕТОК	111
Галюк Е.Н., Ринейская О.Н., Ландо Д.Ю. ФИКСАЦИЯ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕСТАБИЛЬНЫХ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ДНК С СОЕДИНЕНИЯМИ ПЛАТИНЫ	112
Григорьева Д.В., Горбунов Н.П., Костевич В.А., Елизарова А.Ю., Горудко И.В., Соколов А.В. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ГАЛОГЕНИРОВАННОГО АЛЬБУМИНА В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ	113
Гусев С.А., Басырева Л.Ю., Максимов Д.И., Федорова Е.А., Яскевич А.В., Вахрушева Т.В., Островский Е.М., Панасенко О.М. ВИТАМИН D₃ БЛОКИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ	114
Никандров В.Н., Жук О.Н., Домашевич Е.В., Маслова Г.Т., Урецкий В.Б. РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КИСЛОРОДНО-ГЕЛИЕВЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ РАБОТОСПОСОБНОСТИ СПОРТСМЕНОВ	115
Зорина Т.Е., Кравченко И.Е., Хлудеев И.И., Коблов И.В., Ермилова Т.И., Шман Т.В., Березин Д.Б. НОВЫЕ АМИНОПРОИЗВОДНЫЕ ХЛОРИНА E₆: СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ	116
Зубрицкая Г.П., Климкович Н.Н., Венская Е.И., Кутько А.Г., Козарезова Т.И., Слобожанина Е.И. ИНТЕГРАЛЬНАЯ ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С ДЕФИЦИТОМ ЖЕЛЕЗА В ПРОЦЕССЕ ФЕРРОТЕРАПИИ	117
Касько Л.П., Лукьяненко Л.М., Слобожанина Е.И. ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И БИОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ БЕРЕМЕННОСТИ	118
Коктыш И.В., Башура А.М., Коктыш В.Т., Липницкий О.М., Скоробогатова А.С. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ОСТЕОАРТРИТЕ	119
Королик Е.В., Гольцева М.В., Жуковская В.А., Лубневская Г.Г., Иванов А.А. ОСОБЕННОСТИ ИК СПЕКТРОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ДИСЛИПИДЕМИЕЙ	120
Крученок Ю.В., Ананич Т.С., Плавский В.Ю. ВЛИЯНИЕ БИЛИРУБИНА НА ФОТОПОВРЕЖДЕНИЯ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН	121
Луговский А.А., Белько Н.В., Гусаков Г.А., Пархоменко В.А., Луговский А.П. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ КОМПЛЕКС НА ПЛАТФОРМЕ ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОГО НАНОАЛМАЗА	122
Кубарко А.И., Мансуров В.А. ПУЛЬСОВАЯ ВОЛНА В МАЛЫХ ИЗВИЛИСТЫХ СОСУДАХ	123

Мартинovich И.В., Побат В.С., Мартинovich Г.Г., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Черенкевич С.Н. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ МОНОФЕНОЛОВ ПРИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ	124
Мурина М.А., Сергиенко В.И., Рощупкин Д.И. СИНТЕЗ И РЕАКЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ХЛОРАМИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	125
Николаева-Киселевич А.И., Мирончик М.И., Гольцев М.В. БИОМЕХАНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И ОЦЕНКА ОТДАЛЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ КОНСЕРВАТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ ВЫСОКИХ ПЕРЕЛОМОВ МЫШЕЧНОГО ОТРОСТКА НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ	126
Оболенская О.Н., Городецкая Е.А., Каленикова Е.И., Медведев О.С. НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ УБИХИНОЛА ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ НА МОДЕЛИ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС	127
Побойнев В.В., Хрусталёв В.В., Стожаров А.Н., Хрусталёва Т.А. СПЕЦИФИЧНОСТЬ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ БИЛИРУБИНА В ПЕРВОМ ДОМЕНЕ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА	128
Реут В.Е., Горудко И.В., Григорьева Д.В., Соколов А.В., Панасенко О.М. ГАЛЛОЦИАНИН КАК ХЕМОСЕНСОР ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ЭФФЕКТА ГРАНУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ НЕЙТРОФИЛОВ НА РЕСПИРАТОРНЫЙ ВЗРЫВ	129
Рощупкин Д.И., Мурина М.А. КВАНТОМЕХАНИЧЕСКИЙ РАСЧЕТ ЗАРЯДА АКТИВНОГО ХЛОРА И АНАЛИЗ РЕАКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ХЛОРАМИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТОК АДЕНОЗИНА ...	130
Рууге Э.К., Медведева В.А., Иванова М.В., Дудылина А.Л., Шумаев К.Б. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА И ФЕРРИТИНА С МИТОХОНДРИЯМИ СЕРДЦА	131
Самцов М.П., Луговский А.А., Тарасов Д.С., Воропай Е.С., Петров П.Т., Губина Л.П., Залашко Л.М., Насек В.М., Савин А.О., Санько-Счисленок Е.В. АКТИВИРУЕМЫЙ ИЗЛУЧЕНИЕМ БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНА ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ	132
Тарасов Д.С., Самцов М.П., Петров П.Т., Насек В.М., Савин А.О., Санько-Счисленок Е.В. СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ ПРИ НАКОПЛЕНИИ В ТКАНЯХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ	133
Тимохина Е.П., Яглов В.В., Обернихин С.С., Яглова Н.В., Назимова С.В., Цомартова Д.А. РОЛЬ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АППАРАТА В ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ	134
Тимошин А.А., Шумаев К.Б., Лакомкин В.Л., Абрамов А.А., Рууге Э.К. МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА В РЕЗУЛЬТАТЕ ИХ ЧРЕЗКОЖНОГО ВВЕДЕНИЯ В ОРГАНИЗМ КРЫС	135

Титов В.Ю., Осипов А.Н., Олешкевич А.А. ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ДОНОРОВ NO И БЛОКАТОРОВ ЕГО СИНТЕЗА	136
Хлудеев И.И., Самцов М.П., Тарасов Д.С., Белько Н.В. МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ АДДУКТОВ ПОЛИМЕТИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С БЕЛКАМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ	137
Шамова Е.В., Кохан А.Ю., Григорьева Д.В., Балабин Ф.А., Соколов А.В., Свешникова А.Н., Горудко И.В. Ca^{2+}-ОТВЕТ И ПРОВОДИМОСТЬ ИОННЫХ КАНАЛОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ	138
Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Насыбулина Э.И., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Дудылина А.Л., Рууге Э.К. МЕТАБОЛИТЫ ОКСИДА АЗОТА КАК ТРИГГЕРЫ МОДИФИКАЦИИ БИОМОЛЕКУЛ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ И КАРБОНИЛЬНОМ СТРЕССЕ	139
Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В. УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ ПРОДУКЦИИ МИНЕРАЛО- И ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ ЭНДОКРИННЫМ ДИСРАПТОРОМ ДДТ	140

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА

Василевич И.Б., Пинчук С.В., Молчанова А.Ю., Волотовский И.Д. ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ У ЖИВОТНЫХ ТРАВМЫ АХИЛЛОВА СУХОЖИЛИЯ	142
Ерофеева А.-М.В., Жаворонок И.П., Антипова О.А., Рыжковская Е.Л., Кузнецова Т.Е., Василевич И.Б., Пинчук С.В., Волотовский И.Д., Молчанова А.Ю. ИЗУЧЕНИЕ АНТИНОЦИЦЕПТИВНОГО И РЕГЕНЕРАТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ТРАВМЫ АХИЛЛОВА СУХОЖИЛИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ	143
Марченко Л.Н., Чекина А.Ю., Федулов А.С., Джумова М.Ф., Квачева З.Б., Василевич И.Б., Волотовский И.Д. РЕГЕНЕРАЦИЯ РОГОВИЦЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ БИОМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК	144
Матиевский К.А., Станиславчик К.М., Пинчук С.В., Волотовский И.Д. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В БИОГЕЛЕ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА	145
Меджидова К.М., Дитченко Т.И. АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>ESCHINACEA</i>	146
Минич Я.С., Тимохина О.В., Антоневиц Н.Г., Филатова Е.А., Гончаров А.Е. КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК	147
Молчанова А.Ю., Счастливая Н.И., Ерофеева А.-М.В., Морозова И.Л., Кузнецова Т.Е., Рыжковская Е.Л., Василевич И.Б., Пинчук С.В., Волотовский И.Д.	

ВЛИЯНИЕ СИСТЕМНОГО ВВЕДЕНИЯ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА КРЫС ПРИ ЧРЕЗМЕРНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗКАХ148

Нижегородова Д.Б., Лобай М.В., Сыса А.Г., Ксендзова Г.А., Шадыро О.И., Зафранская М.М. ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 2-АМИНО-4,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛФЕНОЛА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА149

Пинчук С.В., Молчанова А.Ю., Нечипоренко А.Н., Нечипоренко Н.А., Василевич И.Б., Жаворонок И.П., Новаковская С.А., Волоотовский И.Д. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ЛЕЧЕНИИ НЕДЕРЖАНИЯ МОЧИ У ЖЕНЩИН150

Пинчук С.В., Молчанова А.Ю., Жаворонок И.П., Василевич И.Б., Новаковская С.А., Волоотовский И.Д. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ЛЕЧЕНИИ НЕДЕРЖАНИЯ МОЧИ У САМЦОВ КРЫС ПОСЛЕ ПРОСТАТЭКТОМИИ151

Полешко А.Г., Волоотовский И.Д. ЗНАЧЕНИЕ КИСЛОРОДА ДЛЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МСК В УСЛОВИЯХ КУЛЬТУРЫ152

Полешко А.Г., Волоотовский И.Д. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ И УНИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК К ЛЕНТИВИРУСНОЙ ТРАНСДУКЦИИ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ИПСК .153

Рында Е.Г., Антоневиц Н.Г., Гончаров А.Е. ОЦЕНКА ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ПУЛИРОВАННЫХ КУЛЬТУР МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ154

Тимохина О.В., Гончаров А.Е., Антоневиц Н.Г., Минич Я.С., Бушмакина И.М., Мартынова М.А. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ *IN VITRO* РАЗМЕРА И ЗАРЯДА ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ВЕЗИКУЛ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДОСТАВКИ «ПУСТЫХ» ЛИПОСОМ В АЛЛОГЕННЫЕ ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ155

Тишук О.И., Полешко А.Г., Волоотовский И.Д. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕНТИВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ С ЦЕЛЬЮ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК156

Юркевич М.Ю., Дубко А.Д., Лобай М.В., Гулюта И.А., Нижегородова Д.Б., Зафранская М.М. ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОГО ПЕЧЕНОЧНОГО СКАФФОЛДА В КУЛЬТУРАХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК157

ФОТОСИНТЕЗ И ФОТОБИОЛОГИЯ

Ajeeb Y.H., Petrova D.V., Klenitsky D.V., Vershilovskaya I.V., Semeikin A.S., Maes W., Gladkov L.L., Kruk M.M. INDIVIDUAL SPECTRAL-LUMINESCENT PROPERTIES OF NH-TAUTOMERS OF THE ALKYLATED DERIVATIVES OF THE FREE BASE CORROLES159

Абрамчик Л.М., Бачище Т.С., Макаров В.Н. ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ФОТОСИСТЕМЫ 2 В ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM*

<i>VULGARE</i> L.) ПРИ ЗАРАЖЕНИИ <i>BIPOLARIS SOROKINIANA</i> НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ БИОГЕНЕЗА ХЛОРОПЛАСТОВ	160
Аверина Н.Г., Дремук И.А., Усатов А.В. МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОЛЕУСТОЙЧИВОГО ПЛАСТОМНОГО МУТАНТА «SR-3» РАСТЕНИЙ ГОРЧИЦЫ И ЕГО РОДИТЕЛЬСКОЙ ФОРМЫ «ДОНСКАЯ-5»	161
Азизов И.В., Гасимова Ф.И., Ибрагимова У.Ф., Тагиева К.Р., Абдуллаева А.Б. ВЛИЯНИЕ КРАСНОГО СВЕТА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ И ТОМАТА	162
Боме Н.А., Королев К.П., Тетянников Н.В., Колоколова Н.Н. ДИАГНОСТИКА АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА РАСТЕНИЙ ПО СОДЕРЖАНИЮ ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЬЯХ	163
Будаговская О.Н., Будаговский А.В. ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ К ФОТОИНГИБИРОВАНИЮ	164
Будаговский А.В., Будаговская О.Н., Будаговский И.А., Маслова М.В., Грошева Е.В., Соловых Н.И., Янковская М.Б. ПРОБЛЕМА КОГЕРЕНТНОСТИ СВЕТА В МЕХАНИЗМЕ ФОТОРЕГУЛЯТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРО- И ЭУКОРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК	165
Вершиловская И.В., Люлькович Е.С., Пуховская С.Г., Иванова Ю.Б., Плотникова А.О., Крук Н.Н. СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА 21-ТИА- И 21,23-ДИТИА-5,10,15,20-ТЕТРАФЕНИЛПОРФИРИНА В РАСТВОРАХ	166
Викс Т.Н., Кабашникова Л.Ф. ОСОБЕННОСТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОРОСТКОВ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ (<i>HORDEUM VULGARE</i> L.) РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ГРИБОМ <i>BIPOLARIS SOROKINIANA</i> SACC. (SHOEM.)	167
Вязов Е.В., Гончарик Р.Г., Куликов Е.А., Алешин С.В., Селищева А.А. АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ АСТАКСАНТИНА ПРИ ФОТОИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛЕНИИ ХЛОРОФИЛЛА А В АЦЕТОНЕ	168
Габриелян Л.С. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ОТХОДОВ АЛКОГОЛЬНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В ФОТОВЫДЕЛЕНИИ ВОДОРОДА ПУРПУРНОЙ БАКТЕРИЕЙ <i>RHODOBACTER SPHAEROIDES</i>	169
ПРОДУКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В БИОМАССЕ <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> ПРИ ИНТЕНСИВНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ Горбачевская Е.В., Мананкина Е.Е., Самович Т.В.....	170
Доманская И.Н., Цеханович И.А. ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФОТОСИСТЕМ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРТЕРМИИ И ДЕЙСТВИЯ КРАСНОГО СВЕТА, АДРЕСОВАННОГО ФИТОХРОМУ, В ЗЕЛЕННЫХ ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ	171
Доманский В.П. ДИСТАНЦИОННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ПЕРЕМЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ РАСТЕНИЙ	172

Дудинова О.Н., Собчук А.Н., Плавский В.Ю. ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ПРОТОПОРФИРИНА С ТЕТРАМЕРНЫМ ФЕРМЕНТОМ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗОЙ	173
Емельянова А.В., Савина С.М., Аверина Н.Г. ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА НАКОПЛЕНИЕ АНТОЦИАНОВ В ПРОРОСТКАХ ОЗИМОГО РАПСА В ПРИСУТСТВИИ ГИСТИДИНА	174
Зубкова Т.В., Мотылёва С.Ю., Дубровина О.А. НАКОПЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЯХ РАПСА (<i>BRASSICA NAPUS</i>) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ АГРОЭКОЛОГИЧЕСКИХ ОПЫТОВ	175
Ивашин Н.В. КОНФОРМАЦИОННАЯ ДИНАМИКА В ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЯХ И ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕЗО-НИТРО-ПРОИЗВОДНЫХ ОКТАЭТИЛПОРФИРИНА И ИХ Zn-КОМПЛЕКСОВ	176
Ивашин Н.В., Терехов С.Н. МЕХАНИЗМЫ ДЕЗАКТИВАЦИИ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ Co(II)- И Cu-5,10,15,20-ТЕТРАКИС[4-(N-МЕТИЛПИРИДИЛ)]ПОРФИРИНА В РАСТВОРЕ И КОМПЛЕКСАХ С ДНК	177
Ильчук И.А., Никандров В.Н. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК <i>CHLORELLA VULGARIS</i> В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АЗОТНО-ФОСФАТНОГО РЕЖИМА	178
Кабашникова Л.Ф., Савченко Г.Е., Абрамчик Л.М., Доманская И.Н. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЛАСТИД И КОМПОНЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ (<i>HORDEUM VULGARE</i> L.) ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ГРИБОМ <i>BIPOLARIS SOROKINIANA</i> В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ЗЕЛЕНЕНИЯ	179
Каляга Т.Г., Козел Н.В. ВЛИЯНИЕ ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХИ НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ЯЧМЕНЯ СОРТА БРОВАР	180
Кленицкий Д.В., Маес В., Крук Н.Н. РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ МАКРОЦИКЛА В ФОРМИРОВАНИИ ОСНОВНОСТИ АЛКИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ СВОБОДНОГО ОСНОВАНИЯ КОРРОЛА	181
Мотылева С.М., Гинс М.С., Козак Н.В., Кабашникова Л.Ф. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ СОСТАВ МЕТАБОЛИТОВ C3 И C4 РАСТЕНИЙ (НА ПРИМЕРЕ <i>ASTINIDIA</i> И <i>AMARANTHUS</i>)	182
Неверов К.В., Прусов А.Н., Киреев И.И. ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ПЕРФТОРУГЛЕРОДОВ И ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА	183
Обухов Ю.Н., Малеева Ю.В., Неверов К.В., Крицкий М.С. ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ХЛОРОФИЛЛ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ WSCP КЛАССА II: АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО РОДСТВА	184
Пашкевич Л.В., Абрамчик Л.М., Кабашникова Л.Ф. АКТИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ГРИБОМ <i>BIPOLARIS SOROKINIANA</i> , В УСЛОВИЯХ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ГИПЕРТЕРМИИ	185

Пашкевич Л.В., Довбнюк Ю.Н., Мартысюк А.В., Шпилевский С.Н., Савченко Г.Е. ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ (<i>HORDEUM VULGARE</i> L.) ПРИ ЗАРАЖЕНИИ <i>BIPOLARIS SOROKINIANA</i> НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ БИОГЕНЕЗА ХЛОРОПЛАСТОВ	186
Печенкина Е.И., Самович Т.В., Козел Н.В. ВЛИЯНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО НА ПРОДУКТИВНОСТЬ И ПИГМЕНТНЫЙ СОСТАВ <i>HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS</i>	187
Пшибытко Н.Л. ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ОБРАБОТКИ НА ПОТОКИ ЭЛЕКТРОНОВ И ПЕРЕХОДНЫЕ СОСТОЯНИЯ В ХЛОРОПЛАСТАХ ЯЧМЕНЯ	188
Рассади́на В.В. НАДМОЛЕКУЛЯРНЫЙ КОМПЛЕКС ХЛОРОФИЛЛ-СИНТЕТАЗА : НАДФН-ПРОТОХЛОРОФИЛЛИД-ОКСИДОРЕДУКТАЗА В ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ И СЕМЯДОЛЯХ ПОДСОЛНЕЧНИКА	189
Самович Т.В., Гончарик Р.Г., Печенкина Е.И., Вязов Е.В., Мананкина Е.Е., Козел Н.В. НАКОПЛЕНИЕ АСТАКСАНТИНА В КЛЕТКАХ <i>HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS</i> , ИНДУЦИРОВАННОЕ ДЕФИЦИТОМ АЗОТА И СВЕТОМ ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ	190
Степанов С.С., Полищук А.В. АДАПТОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ РАЦЕТАМОВ НА РОСТ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ	191
Топчий Н.Н., Полищук А.В., Сытник С.К. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ СТРОМАЛЬНЫХ КАРБОАНГИДРАЗ ХЛОРОПЛАСТОВ ШПИНАТА	192
Топчий Н.Н., Шевченко Г.В. ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ЭКОТИПОВ <i>A. THALIANA</i> ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ КАДМИЯ	193
Тюлькова Е.Г. КОМПЛЕКСНОЕ ВЛИЯНИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ	194
Худякова А.Ю., Строкина В.В., Ширшикова Г.Н., Кособрюхов А.А., Креславский В.Д. ВЛИЯНИЕ СВЕТА ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ДИКОГО ТИПА, <i>RHYA</i> И <i>RHYB</i> МУТАНТОВ	195
Чайковский А.Ф., Лепешкевич С.В., Джагаров Б.М. ВОЗБУЖДЁННЫЕ ЭЛЕКТРОННЫЕ СОСТОЯНИЯ И РЕЛАКСАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ГЕМОГЛОБИНЕ ЧЕЛОВЕКА	196
Чепелева Е.В., Самович Т.В., Козел Н.В. ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФОТОСИСТЕМ КЛЕТОК <i>DUNALIELLA SALINA</i> ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ СРЕДАХ	197
Шамаль Н.В. ВЛИЯНИЕ ЗАСОЛЕНИЯ НА СИНТЕЗ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В ПРОРОСТКАХ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР, ВЫРОСШИХ ИЗ ГАММА-ОБЛУЧЕННЫХ СЕМЯН	198

Шпилевский С.Н., Доманская И.Н. ВЛИЯНИЕ β-1,3-ГЛЮКАНА НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ТОМАТА (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM L.</i>) ПРИ ФУЗАРИОЗНОМ УВЯДАНИИ	199
--	------------

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

Tamashevski A.V., Harmaza Y.M., Iatsunskyi I., Bechelany M. IMMUNOSENSING PLATFORM BASED ON ZnO-POLYACRYLONITRILE NANOFIBERS FOR CANCER BIOMARKER DETECTION	201
Yakavets I.V., Guerreschi C., Kravchenko I.E., Borisov K.N., Lassalle H.-P., Bolotine L.N. CYCLODEXTRIN POLYMERS AS A TEMOPORFIN NANOCARRIER	202
Абашкин В.М., Педзивиатр-Вербицка Э., де ла Мата Ф.Х., Гомез Р., Щербин Д.Г., Брышевская М. ВЛИЯНИЕ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА ФОРМЕННЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ КРОВИ	203
Абашкин В.М., Педзивиатр-Вербицка Э., Миловская К., де ла Мата Ф.Х., Гомез Р., Щербин Д.Г., Брышевская М. МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВЕКТОРЫ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	204
Белько Н.В., Самцов М.П., Гусаков Г.А., Тарасов Д.С., Луговский А.А. БИОЗОНДЫ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ С НАНОРАЗМЕРНЫМ АЛМАЗОМ	205
Габриелян Л.С., Трчунян А.А. АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И МЕМБРАНОТРОПНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИХ ДЕЙСТВИЯ	206
Герловский Д.О., Ремеева Е.А., Артемьева Ю.Н., Василевская Е.Д., Биричевская Л.Л., Винтер М.А., Зинченко А.И., Михайлопуло И.А., Литвинко Н.М. ГИДРОЛИЗ ФОСФАТИДИЛБРИВУДИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ФЛА₂	207
Зорин В.П., Зорина Т.Е., Кравченко И.Е., Коблов И.В., Кузив Ю., Куцевол Н. ПРИМЕНЕНИЕ СТИМУЛЗАВИСИМЫХ СОПОЛИМЕРОВ ДЕКСТРАН-ПНИПАМ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ ФОТОСЕНТИБИЛИЗАТОРОВ	208
Коваленко Е.И., Свечко А.Д., Соболевская Е.М., Кулагова Т.А. ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК, ПОКРЫТЫХ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ, НА КЛЕТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO	209
Мельникова Я.И., Коктыш И.В., Кулакович О.С., Романенко А.А., Маскевич С.А. ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ НА УВЕЛИЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА НА ОСНОВЕ ПЛАЗМОННЫХ СЕРЕБРЯННЫХ НАНОЧАСТИЦ	210
Пржевальская Д.А., Черныш М.А., Костень А.А., Колбанов Д.В., Демидчик В.В. ВЛИЯНИЕ МЕТАЛЛ-СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ «ЗЕЛЕННОГО» НАНОСИНТЕЗА, НА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ МИКРОКЛОНОВ <i>BETULA PENDULA L.</i> В КУЛЬТУРЕ IN VITRO	211

Терехова М.М., Магиера Я., Ионов М., Цю Дж., Мажораль Ж.-П., Брышевская М., Щербин Д.Г. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АМФИФИЛЬНЫХ ДЕНДРОНОВ В ТЕРАПИИ ЛЕЙКОЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	212
Терехова М.М., Брышевская М., Цю Дж., Мажораль Ж.-П., де ла Мата Ф.Х., Гомез Р., Щербин Д.Г. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ВТОРИЧНУЮ И ТРЕТИЧНУЮ СТРУКТУРУ ФОСФОЛИПАЗЫ А2	213
Челнокова И.А., Ронищенко Б.В., Стародубцева М.Н. ИЗУЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ БИОЛОГИЧЕСКОГО И НЕОРГАНИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	214
Черныш М.А., Лазерко Н.В., Пржевальская Д.А., Жабинский В.Н., Хрипач В.А., Демидчик В.В. ВОЗДЕЙСТВИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ПРОТОКОРМОВ <i>RHALAENOPSIS</i> × <i>HYBRIDUM BLUME</i>, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ <i>IN VITRO</i>	215

ОБРАЗОВАНИЕ В ОБЛАСТИ БИОФИЗИКИ

Белая О.Н., Гузелевич И.А. МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ БИОФИЗИЧЕСКИХ КОМПЕТЕНЦИЙ У СТУДЕНТОВ МЕДИЦИНСКИХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ	217
Герасимова Л.К., Бичан О.Д., Мартинович И.В., Черенкевич С.Н. ИННОВАЦИОННЫЕ ФОРМЫ ОБУЧЕНИЯ В КУРСЕ «БЕЗОПАСНОСТЬ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА»	218
Голёнова И.А. ОРГАНИЗАЦИЯ УПРАВЛЯЕМОЙ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ С ЭЛЕМЕНТАМИ ДИСТАНЦИОННОГО ОБУЧЕНИЯ НА КАФЕДРЕ МЕДИЦИНСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ	219
Голёнова И.А., Жукова С.Ю. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ЭУМК ПО ДИСЦИПЛИНЕ «БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИКА»	220
Гольцев М.В., Кухаренко Л.В., Гольцева М.В. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В УЧЕБНОМ ПРОЦЕССЕ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА ВЫСШЕГО МЕДИЦИНСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ	221
Гольцев М.В., Руденок В.В., Гольцева М.В., Кухаренко Л.В., Гузелевич И.А. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ БИОФИЗИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНСКИХ УНИВЕРСИТЕТАХ	222
Григорьева Д.В., Горудко И.В. ФОРМИРОВАНИЕ НАВЫКОВ РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ В ПРОЦЕССЕ ОБУЧЕНИЯ СТУДЕНТОВ-ФИЗИКОВ В БЕЛОРУССКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ	223
Жукова С.Ю., Голёнова И.А. 6 ПРОГРАММ И СЕРВИСОВ, КОТОРЫЕ МОЖНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ОНЛАЙН ЗАНЯТИЙ	224
Жукова С.Ю. ОРГАНИЗАЦИЯ ОНЛАЙН ЗАНЯТИЙ С ПОМОЩЬЮ СЕРВИСА ZOOM: ПЛЮСЫ И МИНУСЫ	225
Клинцевич С.И., Лукашик Е.Я., Пашко А.К. ПРИМЕНЕНИЕ MATHCAD-ТЕХНОЛОГИЙ В МЕДИЦИНСКОМ ВУЗЕ ДЛЯ ОБУЧЕНИЯ ОСНОВАМ	

МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПАНДЕМИИ КОРОНАВИРУСА	226
Клинцевич С.И., Пашко А.К. ФОРМИРОВАНИЕ ИНФОРМАЦИОННО- ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ КОМПЕТЕНТНОСТИ СТУДЕНТОВ-МЕДИКОВ НА КАФЕДРЕ МЕДИЦИНСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ	227
Копыцкий А.В., Хильманович В.Н. АСПЕКТЫ ОРГАНИЗАЦИИ УЧЕБНОГО ПРОЦЕССА ПО ДИСЦИПЛИНЕ «МЕДИЦИНСКАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИКА» ПРИ ДИСТАНЦИОННОМ ОБУЧЕНИИ СТУДЕНТОВ ФАКУЛЬТЕТА ИНОСТРАННЫХ УЧАЩИХСЯ ГрГМУ	228
Лещенко В.Г., Инсарова Н.И., Королик Е.В., Мансуров В.А. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПРЕПОДАВАНИЯ МЕДИЦИНСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ В БГМУ	229
Лукашик Е.Я., Хильманович В.Н. ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРОВ ОПТИЧЕСКОГО ДИАПАЗОНА В КУРСЕ МЕДИЦИНСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ	230
Стародубцева М.Н., Надыров Э.А., Челнокова И.А., Шклярова А.Н., Кравцова И.Л., Егоренков Н.И. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ УЧЕБНОГО ЭЛЕКТРОННОГО АТЛАСА КЛЕТОК КРОВИ НА ОСНОВЕ ИЗОБРАЖЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	231
К 90-ЛЕТИЮ МАРИИ ТИХОНОВНЫ ЧАЙКА – ИЗВЕСТНОГО УЧЕНОГО В ОБЛАСТИ ФИЗИОЛОГИИ ФОТОСИНТЕЗА.....	232

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА И БИОИНФОРМАТИКА

REACTIONS OF NBD-CHLORIDE WITH VARIOUS NUCLEOPHILES AND POTENTIAL BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THE PRODUCTS

Faletrov Y.V.^{1,2}, Dudko A.R.², Horetski M.S.^{1,2}, Frolova N.S.¹, Shkumatov V.M.^{1,2}

¹ *The Research Institute for Physical-Chemical Problems, Minsk, Belarus*

² *Faculty of Chemistry, Belarusian State University, Minsk, Belarus*

NBD-Cl (7-nitrobenzofurazan-4-yl-chloride) has been widely used as a reagent for synthesis of fluorescent amine derivatives, but it is also known for its reactivity towards other nitrogen-based (azide, imidazole), oxygen-based (phenols and alcohols) and sulfur-based nucleophiles *via* aromatic substitution reactions. A lot of the derivatives have found applications in biochemical analysis due to their light absorption and/or fluorescent properties. Here we report about base-catalyzed reaction of NBD-Cl with C-nucleophiles, namely, nitromethane and cyanide (as acetone cyanohydrine, ACH), giving pink and blue colored solids lacking observable fluorescence at 365 nm UV-lamp excitation. To the best of our knowledge, there are few reports about NBD-chloride reaction with C-nucleophiles, e.g. about nitroalkane addition to C2 atom with possible subsequent HNO₂ elimination [1] and isonitrileacetate esters NO₂-substitution and subsequent cyclization to isoindole [2]. Electrospray mass-spectra of NBD-Cl + CH₃NO₂ product demonstrated anions with m/z 256.95 & 372.95; we guess that m/z 256.95 is [M-H]⁻ ion of 2-nitromethyl-NBD-Cl or its isomeric nitromethylene nitron (C₇H₂ClN₄O₅⁻, calculated 256.97). Electrospray mass-spectra of NBD-Cl + ACH product demonstrated anions with m/z 224.95 and higher; we guess this is [M-H]⁻ ion of 2-cyano-nitron derivative of NBD-Cl. In general, the data reflect the complex chemistry of NBD-Cl reaction with the C-based nucleophiles and necessity of further research to reveal the exact structures of the products. Also NBD-Cl reaction with piperidine and luminol were conducted giving products of N-substitution (fluorescent NBD-Pdn and non-fluorescent NBD-Lmn), which was confirmed by their electrospray mass-spectra (NBD-Pdn, brutto C₁₁H₁₂N₄O₃, M=248.09 Da, [M+H]⁺ with m/z 249.10, [M]⁻ with m/z 248.9; NBD-Lmn, brutto C₁₄H₈N₆O₅, M=340.06, [M-H]⁻ with m/z 339.00). A possible biological application of NBD-Pdn could be related with the ability of NBD-Pdn to be cleaved selectively by H₂S, a new gaseous transmitter [3], whereas the both compounds could be ligands for some enzymes, e.g. monooxygenases of cytochrome P450 class. To enforce the assumption, docking computations using Autodock Vina (4 nm³ space, exhaustiveness 12) and about 150 known structures of human P450s from PDB source were done. It was found that calculated energy of binding (E_{bind}) was from -12.8 to -5 kcal/mol for NBD-Lmn and from -10.0 to -5 kcal/mol for NBD-Pdn; many conformations was proximal to heme, for NBD-Lmn, e.g., CYP11A1 (pdb 3n9y, 3na0, E_{bind}= -11.5 - -10.4 kcal/mol), CYP17 (pdb 3swz, 5irq, ~-10.5 kcal/mol), CYP2D6, CYP3A4 and for NBD-Pdn, e.g., CYP11A1 (pdb 3n9y, 3na0, E_{bind} ~-9.5 kcal/mol), CYP19A1 (pdb 3eqm, 3s79, 5jl7, 4gl5, ~-9.8 kcal/mol). Quantum chemistry calculations were also applied at PBE0 and CAM-B3LYP levels of density functional theory to estimate properties of the compounds.

This work was supported by the Governmental program of Scientific Research «Chemical technology and materials, subprogram «Biologically-active compounds» (tasks № 20190221 and 20161380).

References

1. Asghar B.H.M., Crampton M.R. Carbanion reactivity, kinetic and equilibrium studies of σ -adduct formation // *Org. Biomol. Chem.* 2007. Vol. 5. P. 1646-1654.
2. Nikonov G., Bobrov S. 5.05 - 1,2,5-Oxadiazoles // *Comp. Het. Chem.* III. 2008. Vol. 5. P. 315-395.
3. Ismail I., Chen Z., Ji X. et al. A Fast-Response Red Shifted Fluorescent Probe for Detection of H₂S in Living Cells // *Molecules.* 2020. Vol. 25. P. 437.

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF FLUORESCENT MIKONAZOLE DERIVATIVES

Horetski M.S.¹, Dudko A.R.², Faletrov Y.V.¹, Frolova N.S.¹, Shkumatov V.M.¹

¹*The Research Institute for Physical-Chemical Problems, Minsk, Belarus*

²*The Belarusian State University, Minsk, Belarus*

Among different microbial infections fungal infestations form a separate group of disorders that stands out for its specific treatment methodologies due to the distinctive nature of a pathogen. Such diseases are called mycoses and have either respiratory or systemic manifestations [1]. Mycoses are usually observed among immunocompromised patients outcome and due to the recent rise of HIV infection, they emerge as a growing problem [2, 3]. Thus, an increasing number of confirmed fungal infestations induces the development of new antifungal drugs and tools for mycoses diagnostics. The most popular antifungal drugs are based on different azoles and are aided to inhibit specific fungal cytochromes P450 [4]. The majority of such azoles have a conservative scaffold which origins from 1-(2-(2,4-dichlorophenyl)-2-on)ethylimidazole substituent. On the other hand fluorescent analogs of bioactive compounds are widely used in biochemical researches for analyzing binding sites, cellular transport aspects and fluorescence polarization assays [5, 6]. Among fluorescent compounds boron-containing dyes are popular because of their good optical properties and small molecular volume [7]. Herein we perform a molecular docking (AutodockVina) study on (S)-mikonazole-based structures where the 2,4-diphenyl- substituent in the conservative fragment is replaced with various boron-containing fluorophores (BODIPY, BDAA, BOPHY, boranil and acetylnaphtholate complexes) to value their propensity in resembling (S)-mikonazole behavior on the example of 14 alpha-demethylase (4lxj) from *S. cerevisiae* yeasts. After preparation, the protein structure was relaxed using GROMOS96 43B1 force field. Ligand geometries were optimized using UFF method. Computed free binding energy (E_{bind}) for mikonazole is -9.9 kcal/mol and it is further used as a reference value. Simulations show that proposed fluorescent mikonazole derivatives do not significantly loose affinity towards the tested enzyme. The calculated E_{bind} for BDAA and BODIPY derivatives are from -8.7 kcal/mol to -10.5 kcal/mol with proper orientation in the enzyme active site. BOPHY and other tested boron moieties either have high affinity (highest E_{bind} -10.6 kcal/mol) but they appeared too large and their localization is distorted up to the impossibility of interaction with the enzyme heme. The most effective binding is observed for (2-BODIPY)mikonazole with the average distance between azole moiety and enzyme heme iron atom equal to 3.6 Å. It makes tested fluorescent mikonazole derivatives a perspective starting point for the development of new fluorescent tools for microbial application and fungi studying. In our further works, more comprehensive design, synthesis and *in vitro* testing of mentioned above derivatives are planned.

References

1. Randhawa H.S. Respiratory and systemic mycoses // Indian. J. Chest. Dis. Allied. Sci. 2000. Vol. 42. P. 207-2019.
2. Singh V. Unravelling the Disease Spectrum // J. Maxillofac. Oral. Surg. 2019. Vol. 18. P. 164-179.
3. Chakrabarti A., Chatterjee S.S., Shivaprakash M.R. Overview of opportunistic fungal infections in India // Nihon. Ishinkin. Gakkai Zasshi. 2008. Vol. 49. P. 165-172.
4. Fromtling R.A. Overview of medically important antifungal azole derivatives // Clin. Microbiol. Rev. 1988. Vol. 1. P. 187-217.
5. Yim G., Thaker M.N., Koteva K.P. et al. Glycopeptide Antibiotic Biosynthesis // J. Antibiot. 2014. Vol. 67. P. 31-41.
6. Faletrov Y.V., Brzostek A., Plocinska R. et al. Uptake and Metabolism of Fluorescent Steroids by Mycobacterial Cells // Steroids. 2017. Vol. 117. P. 29-37.
7. Loudet A., Burgess K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties // Chem. Rev. 2007. Vol. 107. P. 4891-4932.

BODIPY-LABELED ISONIAZID DERIVATIVES AS TUBERCULOSIS PRODRUGS

Horetski M.S.¹, Faletrov Y.V.¹, Plocinska R.², Brzostek A.², Dziadek J.²,
Shkumatov V.M.¹

¹ *The Research Institute for Physical-Chemical Problems, Minsk, Belarus,*

² *The Institute of Medical Biology, Polish Academy of Sciences, Lodz, Poland.*

Today tuberculosis (TB) continues to be one of the major reasons for morbidity and mortality causing an estimated 10 million new cases and 1.5 million deaths per year. The emergence of multi-drug resistant and extensive-drug resistant strains is a growing problem fueling the TB epidemics [1]. Among anti-TB drugs isoniazid (INH) is found to be one of the most effective. It is a prodrug forming reactive species after interaction with KatG (RCSB 1sj2) enzyme. INH is rather hydrophilic (MarvinSketch LogP -0,69) and traps into the cell by passive diffusion [2]. Thus, the stage of permeating a hydrophobic cell membrane slows down the total rate of its intracellular accumulation. In recent works, pronounced anti-TB activity was shown for some N2-acylated INHs (NAINH) [3]. The presence of aliphatic moiety is supposed to promote cell membrane permeation by increasing total molecular hydrophobicity. For such derivatives, the mechanism of action is thought to be the same with INH but there is still no published evidence. Therefore, to clarify NAINH's ability to bind in the KatG active site we made molecular docking studies (AutodockVina) on a set of homologous NAINHs containing linear aliphatic substituents up to n-undecyl- [4]. Also we propose new fluorescent boron-dipyrromethene (BODIPY) based NAINHs as potential anti-TB agents. After preparation, the protein structure was allowed to relax using AMBER force field. Ligand geometries were optimized in ORCA program (PBE, def2-SVP, CPCM(Water)) [5]. Simulations show that all of NAINH with linear aliphatic chains able to take proper orientation in the KatG active site with free binding energies (E_{bind}) from -5.9 kcal/mol to -6.6 kcal/mol. The proximity of E_{bind} values for NAINH and INH (-6.1 kcal/mol) implicitly indicates that high NAINH anti-TB effect is likely for specifications in cellular trafficking influenced by physical properties changes (e.g. for undecylated NAINH LogP 3.27) rather than for more effective binding with KatG. The E_{bind} for considered BODIPY-NAINH ranges from -9.0 kcal/mol to -9.7 kcal/mol due to the formation of additional binding sites between protein and BODIPY moiety. Thus for N2-(3-(8-BODIPY)-propionyl)NAINH (E_{bind} -9.6 kcal/mol) hydrogen bonding with Arg104 and halogen bonding (F-O) with Ser315 additionally contributes to the final ligand-protein complex energy. It makes BODIPY-NAINH perspective derivatives for development. In our further works, we plan to consider the mechanism of NAINH action. Design, synthesis and microbiological evaluation of mentioned above, as well as a new BODIPY-NAINH, also will be accomplished.

This work was supported by local GPSR "Chemical technology and materials" (task № 2.39) and BRFFI grant B18IC-026.

References

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. World Health Organization, 2019. P. 297.
2. Bardou F., Raynaud C., Ramos C. et al. Mechanism of Isoniazid Uptake in Mycobacterium Tuberculosis // Microbiol. 1998. Vol. 144. P. 2539-2544.
3. Vila-Viçosa D., Victor B.L., Ramos J. et al. Insights on the Mechanism of Action of INH-C₁₀ as an Antitubercular Prodrug // Mol. Pharm. 2017. Vol. 14. P. 4597-4605.
4. Trott O., Plson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading // J. Comput. Chem. 2010. Vol. 31. P. 455-461.
5. F. Neese Software update: the ORCA program system, version 4.0 // Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. 2017. Vol. 8. P. e1327.

STUDY OF INDOLE AND ALKYNE STEROIDS AS POTENTIAL CYP17A1 INHIBITORS AND GLIOMA GROWTH REGULATORS

Panada J.V.¹, Klopava V.A.², Kulahava T.A.^{2,3}, Faletrov Y.V.¹, Frolova N.S.¹, Shkumatov V.M.¹

¹Research Institute for Physical Chemical Problems of Belarusian State University, Minsk, Belarus; ²Department of Biophysics, Physics faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus; ³Research Institute for Nuclear Problems of Belarusian State University, Minsk, Belarus

Two series of alkyne- and indole-derived steroids were synthesized and screened for their ability to influence glioma proliferation and metabolic pathways involved in cancer development and survival. The substances were obtained by reductive amination of 20-keto- (pregnenolone) or 17-ketosteroids (dehydroepiandrosterone, estrone) with prop-2-yn-1-amine, but-3-yn-1-amine or tryptamine in the presence of sodium triacetoxyborohydride or sodium cyanoborohydride. The structures were confirmed by ESI mass spectrometry, IR spectroscopy and ¹H NMR spectroscopy. The substances were tested for their ability to inhibit CYP17A1-mediated progesterone 17-hydroxylation by engineered *Y. lipolytica* yeast strains. As a rate-limiting step in androgen biosynthesis, CYP17A1 presents a major target in treatment of androgen-dependent prostate cancer and is one of the recognized molecular targets of abiraterone acetate, an approved drug used to treat metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC) [1]. In the alkyne series, each substance was found to decrease 50 μ M progesterone transformation by 70 \pm 9% when the test was run with a strain expressing only bovine adrenal CYP17A1 (*Y. lipolytica* 8-84.1.) However, when CYP11A1 was also present (strain 5.54-1), the inhibitory capacity decreased dramatically in most cases. Notably, the conjugate of pregnenolone and prop-2-yn-1-amine retained its relative inhibitory activity of 72 \pm 8% [2]. On the other hand, indole steroids produced only a minor reduction of 25 \pm 6% in 8-84.1 strain, suggesting CYP17A1 inhibition to be a minor contributor to potential antiproliferative action. The indole steroids were further tested for their ability to affect C6 glioma cell proliferation. After 24 hrs incubation, the dehydroepiandrosterone-derived IS-1 was found to reduce cell counts by 21 \pm 6% at 1 μ M and 52 \pm 13% at 10 μ M whereas estrone-based IS-2 and pregnenolone-based IS-3 produced a 18 \pm 7% reduction at 10 μ M. No evidence of necrosis could be detected by LDH assay or propidium iodide staining, confirming that IS series do not affect cell viability. Likewise, no ROS overproduction could be detected by dichlorofluorescein diacetate, or calcium ion efflux by Fura-2 AM staining. However, the antiproliferative effect of IS-1 could be prevented by adding 10 μ M DHEA, a known inducer of DNA repair proteins in neuron cells [3]. To summarize, two series of novel alkyne- and indole-containing steroids were synthesized and examined for their ability to inhibit cytochrome P450 17A1 which is involved in androgen and neurosteroid biosynthesis and cancer cell adaptation, and their capacity to reduce glioma proliferation. In alkyne series, the conjugate of pregnenolone and prop-2-yn-1-amine proved to be a moderately powerful competitive inhibitor of CYP17A1 in micromolar range, whereas in IS series, DHEA-based IS-1 reduced C6 glioma growth with an IC₅₀ of 10 μ M.

This work was funded by Government program of scientific research "Chemical technology and materials", subprogram "Biologically active compounds" (task № 20190221).

Библиографические ссылки

1. Chuang J.-Y., Lo W.-L., Ko C.-Y. et al. Upregulation of CYP17A1 by Sp1-mediated DNA // *Oncogenesis*. 2017. Vol. 6. e339.
2. Panada J. U., Faletrov Y. V., Frolova N. S. et al. Synthesis and Evaluation of N-Alkynylaminosteroids // *Biochemistry (Moscow)*. 2019. Vol. 13. P. 357–363.
3. Yang W.-B., Chuang J.-Y., Ko C.-Y. et al. Dehydroepiandrosterone Induces Temozolomide Resistance // *Mol. Neurobiol.* 2019. Vol. 56. P. 2301–2313.

AMYLOID FIBRILS AS A SCAFFOLD FOR CASCADE ENERGY TRANSFER

**Tarabara U.K.¹, Kirilova E.², Kirilov G.², Vus K.O.¹, Zhytniakivska O.A.¹,
Trusova V.M.¹, Gorbenko G.P.¹**

¹*V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine*

²*Daugavpils University, Daugavpils, Latvia*

Amyloid fibrils, a specific type of protein aggregates, involved in the development of a number of human disorders, currently attract a growing interest in biomedical and nanotechnological aspects. Recently we have demonstrated that amyloid assemblies can serve as a molecular framework for the multistep Förster resonance energy transfer (msFRET) in the system containing a classical amyloid marker Thioflavin T (ThT) as a primary donor, a phosphonium mediator dye TDV and squaraine dye SQ1 as a terminal acceptor. In the present study we extended our efforts towards evaluating the possibility of using the novel benzanthrone dyes as mediators of msFRET in insulin amyloid fibrils. The four-chromophore systems ThT→3-substituted benzanthrone derivative (BA)→squaraine dye SQ4→SQ1 have been designed to find the most efficient mediators among a series of benzanthrone derivatives including a well-known dye 3-methoxybenzanthrone (MBA) and its amino- (ABM, A6, A8, AZR, AZM, AZPP, AZP4, AZP5) and amidino- (AM1, AM2) derivatives. The FRET efficiencies (*E*) have been determined from the decrease of donor fluorescence in the presence of acceptor after deconvolution of the total fluorescence spectra into the donor and acceptor peaks using the log-normal asymmetric function. In the insulin fibrils the efficiency of energy transfer between ThT and BA was found to follow the order ABM (85%) > A6 (83%) > AM1 (73%) > MBA (60%) > A8 (59%) > AZPP (45%) > AM2 (43%) > AZP5 (29%) > AZP4 (21%) > AZR (17%) > AZM (6%). The differences between BA were observed also in the amplification of the terminal acceptor fluorescence upon sequential addition of donors. In the system BA→SQ4→SQ1, the addition of benzanthrone dye produced the following enhancement of SQ1 signal at 680 nm in fibrillar insulin: ABM (15 times) > A6 (8) > A8 (6) > MBA (5) > AM1, AZP5 (4) > AZR (4) > AZP4 (3) > AZM (2) > AZPP (2). Since the ThT quantum yield increases by more than two orders of magnitude in amyloid-bound state, the most pronounced amplification of SQ1 fluorescence was observed in the system ThT→BA→SQ4→SQ1: A6 (79 times) > ABM (69) > AM2 (55) > A8 (50) > MBA (43) > AM1 (26) > AZM (23) > AZP5 (22) > AZP4 (21) > AZR (20) > AZPP (18).

Remarkably, the FRET efficiencies and the enhancement of SQ1 fluorescence have been found to be much higher in insulin fibrils compared to its control non-fibrillized counterpart. The proposed three-step FRET protocol has the advantages relative to the conventional one-step FRET, among which is the presence of a large, about 240 nm, Stokes shift. Being a principal energy donor, ThT in combination with BA and SQ4 act as efficient amplifiers of the SQ1 fluorescence, producing, in such a way, a 200 nm shift of the spectral response to longer wavelengths (from 480 to 680 nm), thereby enabling a higher amyloid detection sensitivity. The obtained results show that: i) the system ThT→BA→SQ4→SQ1 can be employed for the identification and characterization of amyloid fibrils; ii) the benzanthrone dyes with piperidine and morpholine rings seem to be the most efficient mediator dyes among the examined benzanthrone derivatives in the FRET cascade.

Overall, our findings not only offer new possibilities for refining the amyloid detection assays but also provide a background for application of amyloid assemblies as a molecular scaffold for controlled positioning of multiple chromophores communicating via the multi-step FRET in photonic nanodevices.

IN-SILICO ANALYSIS OF PD-L1 DYNAMICS INDUCED BY SMALL-MOLECULAR INHIBITORS OF PD-1 –PD-L1 AXIS

Urban V.A., Davidovskii A.I., Veresov V.G.

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

The programmed cell death protein 1 (PD-1) and its ligand, PD-L1, constitute an important co-inhibitory immune checkpoint leading to downregulation of immune system. Tumor cells developed a strategy to trigger PD-1/PD-L1 pathway reducing the T cell anticancer activity. A number of antibodies targeting the PD-1/PD-L1 immune checkpoint pathway have been approved after successful clinical trials. Anti-PD-L1 small drugs, generally with improved pharmacokinetic and technological profiles than monoclonal antibodies, became an attractive research topic. At present, more than twenty small-molecular inhibitors (SMIs) of the PD-1/PD-L1 interactions whose scaffold is based on substituted biphenyl group connected to a further aromatic ring through a benzyl ether bond have been identified which act by inducing dimerization of PD-L1. However, physical mechanisms of such dimerization remain unclear. Here, computational structural biology tools combining protein-protein and protein-ligand docking with molecular dynamics simulations were used to gain structural insights into the dynamics of PD-L1 induced by BMS-1165 recently shown to be one of the most potent small-molecular inhibitor of the PD-1/PD-L1 axis. The modeling of PD-L1-PD-L1 interaction was performed in a stepwise fashion using a four - staged computational molecular docking protocol (PIPER+GRAMM-X+HDOCK) – ROSETTADOCK – GalaxyRefineComplex – ROSETTADOCK (abbreviated by (P+G+H)RG_{RCR}). The PD-L1-BMS-1165 interaction was analysed using protein-ligand docking by the Glide protein-ligand software followed by molecular dynamics simulations. Molecular dynamics simulations were performed using the GROMACS software with the CHARMM36 all-atom force field. The modeling has shown that PD-L1 in the membrane environment exists as a dimer jointed by the PD-L1 N-terminal parts. The binding of the ligand to one of the monomers results first in the binding of another PD-L1 dimer to the ligand bound to the first dimer, followed by the dissociation of two monomers from both dimers and the formation of a trimeric complex including two PD-L1 monomers and the ligand between them

References

1. Guzik K., Tomala M., Muszak D., et al. Development of the Inhibitors that Target the PD-1/PD-L1 Interaction-A Brief Look at Progress on Small Molecules, Peptides and Macrocycles // *Molecules*. 2019. Vol. 24. P. 2071.

IN-SILICO ANALYSIS OF RESVERATROL-INDUCED PD-L1 DIMERIZATION

Urban V.A., Davidovskii A.I., Veresov V.G.

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

T-cell activation through the blockade of PD-1/PD-L1 interactions is recognized at present as one of the most promising strategies in the cancer treatment and a number of antibodies targeting the PD-1/PD-L1 immune checkpoint pathway have been approved after successful clinical trials. However, the use of antibodies suffers from a number of shortcomings including poor tissue and tumor penetration, long half-life time, poor oral bioavailability, and expensive production costs. Small-molecule-based therapeutic approaches offer the potential to address the shortcomings of the antibody-based checkpoint inhibitors. At present, more than twenty small-molecular inhibitors (SMIs) of the PD-1/PD-L1 interactions whose scaffold is based on substituted biphenyl group connected to a further aromatic ring through a benzyl ether bond have been identified which act by inducing dimerization of PD-L1. Very recently, the dietary polyphenol resveratrol (RSV) has been reported to inhibit the PD-1/PD-L1 interactions through the induction of the PD-L1 dimerization but the mechanisms remain unclear. Here, computational structural biology tools combining protein-protein and protein-ligand docking with molecular dynamics simulations were used to gain structural insights into the mechanisms of the RSV-induced dimerization of PD-L1. The modeling of PD-L1-PD-L1 interaction was performed in a stepwise fashion using a four - staged computational molecular docking protocol (PIPER+GRAMM-X+HDOCK) – ROSETTADOCK – GalaxyRefineComplex – ROSETTADOCK (abbreviated by (P+G+H)RG_{RCR}). Protein-ligand interactions were analysed using protein-ligand docking with Glide followed by molecular dynamics simulations. Molecular dynamics simulations were performed using the GROMACS software with the CHARMM36 all-atom force field. The modeling has shown a rather high intermolecular shape and polar complementarity in the PD-L1-PD-L1- RSV complex thus explaining the induction of PD-L1 dimerization and inhibition of PD-1-PD-L1 interaction.

References

1. Verdura S., Cuyàs E., Cortada E., et al. Resveratrol targets PD-L1 glycosylation and dimerization to enhance antitumor T-cell immunity // Aging (Albany NY). 2020. Vol.12, №1. P. 8–34.

ДЕЗАГРЕГАЦИЯ МОЛЕКУЛ Zn-ОКТАКАРБОКСИФТАЛОЦИАНИНА В НАНОПОРИСТОЙ СИЛИКАТНОЙ ГЕЛЬ-МАТРИЦЕ

Арабей С.М.¹, Павич Т.А.², Станишевский И.В.¹, Кожич Д.Т.¹, Слонская С.В.¹,
Логвинович П.Н.¹, Соловьев К.Н.²

¹Белорусский государственный аграрный технический университет, Минск, Беларусь,

²Институт физики им. Б.И.Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Присоединение восьми карбоксильных COOH-групп в *орто*-положения бензольных колец фталоцианина (образование свободного основания 2,3,9,10,16,17,23,24-октакарбоксифталоцианина ($H_2(COOH)_8Фц$) или цинкового комплекса ($Zn(COOH)_8Фц$)) увеличивает их растворимость в воде и органических растворителях [1]. Исследования октакарбоксифталоцианинов как потенциальных фотосенсибилизаторов для ФДТ [2] или агентов, обладающих высокой каталитической и фотокаталитической активностью [1,3], были стимулированы их интенсивным поглощением в фототерапевтическом окне (600–800 нм), а также способностью образовывать наиболее близкие к физиологическим водные растворы. Вместе с тем, в растворах имеет место нежелательное для подобных применений явление – образование агрегатов за счет нековалентных сил притяжения двух или более молекул мономера [4]. В работе приводятся результаты исследования спектрально-люминесцентных свойств и структурных изменений молекул $Zn(COOH)_8Фц$, внедренных в объемную твердотельную нанопористую силикатную гель-матрицу. Установлено, что на начальной стадии формирования силикатного каркаса имеет место Н-агрегация исследуемого фталоцианина, о чем свидетельствует гипсохромное смещение длинноволновых полос поглощения и отсутствие флуоресценции агрегатов. Можно полагать, что при внедрении фталоцианина в ограниченный объем наноразмерных пор силикатной гель-матрицы индуцируется реакция образования водородной связи между атомом карбонильного кислорода карбоксильной группы и поверхностными силанольными группами нанопор ($C=O...HO-Si\equiv$) и/или между гидроксилом карбоксильной группы и поверхностными центрами отрицательного заряда ($C-OH...O-Si\equiv$), что способствует адсорбции флуорофоров на силикатной поверхности, стабилизации и сохранению агрегированного состояния. Обнаружено, что в процессе длительной сушки (сутки) нанопористого материала при комнатной температуре происходят обратимые превращения Н-агрегатов $Zn(COOH)_8Фц$ в мономерную форму. Сделан вывод, что причинами разрушения изначально образованных агрегатов является эффект удаления аксиальных лигандов (молекулы диметилформамида) в процессе сушки гель-матрицы и, как следствие, образование мономеров фиксированных на поверхности нанопор на удаленном расстоянии друг от друга. Агрегированная Н-форма безлигандных молекул $H_2(COOH)_8Фц$ в процессе сушки сохраняется, что объясняется более сильным π - π -взаимодействием близко расположенных смежных плоских макроциклов. Прозрачные и однородные силикатные гель-матрицы с примесью $Zn(COOH)_8Фц$ могут быть использованы в качестве люминесцирующих материалов для оптических устройств, работающих в диапазоне длин волн, примыкающем к ближней ИК области.

Библиографические ссылки

1. Шапошников Г.П., Майзлиш В.Е., Кулинич В.П. Карбоновые кислоты металлофталоцианинов // Журн. общей химии. 2005. Т. 75. С. 1553–1562.
2. Malinga N., Dolotova O., Bulgakov R. et al. Synthesis and physicochemical behaviour of aluminium triakis and tetrakis octacarboxyphthalocynine // Dyes Pigments. 2012. Vol. 95. P. 572–579.
3. Kaliya O.L., Lukyanets E.A., Vorozhtsov G.N. Catalysis and Photocatalysis by Phthalocyanines for Technology, Ecology and Medicine // J. Porphyrins Phthalocyanines. 1999. Vol. 3. P. 592–610.
4. Suchan A., Nackiewicz J., Hnatejko Z. et al. Spectral studies of zinc octacarboxyphthalocyanine aggregation // Dyes Pigments. 2009. Vol. 80. P. 239–244.

АВТОМАТИЧЕСКОЕ РАСПОЗНАВАНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО ФОНА ЧЕЛОВЕКА ПО ПАРАМЕТРАМ НЕСКОЛЬКИХ БИОМЕТРИЧЕСКИХ ИСТОЧНИКОВ

Бич Н.Н.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Возможности невербального общения между людьми широки и поэтому интересны для научного исследования, с точки зрения передачи эмоциональных сигналов, свидетельствующих о том или ином состоянии человека посредством голоса, мимики, пульса. Результаты таких исследований непосредственно связаны с разработкой информационных систем автоматического анализа эмоционально-импульсивных характеристик человеческого организма. Подобные системы, основанные на принципах работы искусственного интеллекта, можно назвать интеллектуальными помощниками в процессах взаимодействия людей. Области применения приложений автоматического распознавания эмоционального состояния человека различны, в частности в медико-психологической практике. В психологических экспериментах для диагностики душевного состояния личности [1], имеющей психологические проблемы, вызванные определенными внутренними травмами, переживаниями, бессознательными страхами применяются новые подходы, связанные с применением информационных технологий.

В данной работе рассматривается модель приложения для распознавания эмоций, основанная на предварительной обработке сигнала, определении эмоциональных характеристик, приблизительной диагностике заболевания и принятии решения (выборе возможной методики лечения). Под сигналом понимаются следующие данные: информационный видеопоток, передающий мимические изменения лица, ауди-поток, соответствующий акустическому сигналу голоса, и данные пульса, то есть изменения сосудистой системы. Рассматриваемая логическая модель приложения включает несколько следующих друг за другом объектов [2]: модуль для считывания данных видеопотока; модуль для считывания данных аудио-потока; модуль для считывания данных пульса; модуль определения эмоциональных характеристик (гнев, радость, печаль, страх) на основе полученных данных; модуль, принимающий эталонное решение относительно душевного состояния пациента; модуль «подсказка», предлагающий ориентировочные методы и способы лечения эмоционального расстройства пациента, если таково обнаружено.

Физическая модель данной информационной системы предполагает наличие базы данных для хранения информации о данных пациентов, лечащих их врачей, исходные и обработанные данные биометрических сигналов, эталоны с всевозможными заболеваниями и их решениями. Для разработки приложения использовалась среда программирования Visual Studio, библиотека OpenCV, язык программирования C++, система управления базами данных MySQL, и как вспомогательный инструмент среда MatLab.

Предлагаемое приложение – это один из возможных способов, пользуясь которым, врач медико-психолог сможет получить сведения о неявных характеристиках внутреннего душевного состояния.

Библиографические ссылки

1. Дробышева Е.С., Лучшева Л.М. Роль голоса в процессе идентификации черт личности подростками // Вестник ТГПУ. 2012. № 6. С. 168–172.
2. Гай В. Е., Утробин В. А., Родионов П. А. и др. Оценка эмоционального состояния человека по голосу с позиций теории активного восприятия // Системы управления и информационные технологии. 2015. Т. 59, № 1-1. С. 118–122.

АНАЛИЗ ПРОЦЕССОВ УКОРЕНЕНИЯ МИКРОКЛОНОВ *FORSYTHIA* × *INTERMEDIA IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЁРТОЧНЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

**Бондаренко В.Ю.¹, Шашко А.Ю.¹, Тишель В.В.¹, Светлаков В.И.¹, Черныш М.А.¹,
Пржевальская Д.А.¹, Лазерко Н.В.¹, Шамшеня А.А.³, Барковский А.В.²,
Демидчик В.В.¹**

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,

²Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники Минск,
Беларусь

³EPAM Systems Минск, Беларусь

Техника микроклонального размножения в условиях *in vitro* позволяет получать высококачественный посадочный материал за счёт размножения высокопродуктивных плюсовых растений с генетической и фенотипической однородностью. Преимуществами микроклональных подходов также является высокий коэффициент размножения и возможность устранения внутренних инфекций. Одним из важнейших этапов микроклонального размножения является укоренение микроклона, которое должно быть достаточным для успешного выведения его в условия *ex vitro*, что позволяет впоследствии получать взрослое растение для коммерческих целей. К тому же более ранний этап пропагации *in vitro*, связанный с микрочеренкованием в стерильных условиях, также требует укоренённости микроклонов. Таким образом, весьма важной задачей в этой области является оценка укоренения микроклонов в условиях *in vitro*, которая является сложной задачей в связи с тем, что культивационные состоят либо из толстого стекла или полупрозрачного пластика, а сами корни часто образуют густые пучки и сплетения. В настоящей работе была поставлена задача разработать программно-аппаратный комплекс для анализа процессов укоренения микроклонов важного декоративного кустарника *Forsythia* × *intermedia* в культуре *in vitro* с использованием систем биоимиджинга и свёрточных нейронных сетей. Для экспериментов использовалась стерильная культура растений *Forsythia* × *intermedia*, выращенная на 100% питательной среде WPM (Woody Plant Medium). На 5, 20 и 40 сутки культивирования эксплантов регистрировалась степень укоренения культуры с помощью цифрового HSV-имиджинга с целью формирования базы данных аннотированных изображений. База формировалась с аннотацией «без укоренения» (5 сут), «начальная степень укоренения» (20 сут) и «высокая степень укоренения» (40 сут). Аннотирование производилось опытным селекционером-биотехнологом. Всего было получено, обработано и проаннотировано более четырёх тысяч изображений. Для цифрового фенотипирования использовалась модель нейронной сети Inceptionv3, так как данная модель находит широкое применение в анализе изображений растений и имеет низкое ресурсопотребление вычислительной техники. Библиотеки Tensorflow и Keras были использованы для реализации модели. Валидационная выборка составляла 10% от обучающей выборки. Модель обучалась на вышеупомянутой базе данных в течении 100 эпох с размером батча 64. Точность работы нейронной сети определялась с помощью коэффициента детерминации (R^2). Разработанная нейронная сеть продемонстрировала высокое качество распознавания степени укоренения эксплантов *Forsythia* × *intermedia in vitro* – 96% на валидационной выборке. Данная модель позволяет высокоточно анализировать и автоматически принимать решения по дальнейшему использованию микроклонов, позволяет своевременно выводить растения *ex vitro* и производить размножение на наиболее подходящей стадии развития корневой системы.

ПЕРВИЧНЫЙ БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ИОННЫХ КАНАЛОВ СЕМЕЙСТВА CNGC У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

**Ветошкин А.А., Гриусевич П.В., Самохина В.В., Новосельский И.Ю., Смолич И.И.,
Соколик А.И., Демидчик В.В.**

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Семейство генов/белков CNGCs (Cyclic Nucleotide Gated Channels: CNGC; каналы, активирующиеся циклическими нуклеотидами), являются одним из крупнейших семейств ионных каналов высших растений. Это лиганд-зависимые катион-неселективные ионные каналы, которые локализованы в плазматической мембране, и предположительно активируются прямым связыванием циклических нуклеотидов. Также их активность модулируется связыванием кальмодулина (CaM) с CaM-связывающим (CaMB) доменом. При низком уровне свободного кальция в цитоплазме, данный катион стимулирует открытие канала CNGC, а при высоком приводит к его закрыванию. CNGC растений и животных состоят из шести трансмембранных доменов (S1-S6) и области поры (P) между пятым и шестым доменами, С-концевым CaMB-доменом и консервативным доменом, связывающим циклические нуклеотиды (CNBD).

У высших растений имеется различное количество генов семейства CNGC: 20 у *Arabidopsis thaliana*, 18 у *Solanum lycopersicum*, 21 у *Pyrus spp.*, 8 у *Hordeum vulgare* и т.д. CNGC играют важную роль в гиперчувствительности, патогенезе и устойчивости растений к абиотическим стрессам. У *Arabidopsis thaliana* AtCNGC структурно формируют 5 групп, которые содержат различное количество членов (группы I, II, III, IV-A и IV-B). Первая группа (I) представляет собой большую кладу, которая состоит из 6 AtCNGC (AtCNGC1, 3, 10, 11, 12 и 13). Группа IV-B состоит из AtCNGC2 и AtCNGC4. Группа II насчитывает 5 генов CNGC: AtCNGC5, AtCNGC6, AtCNGC7, AtCNGC8, AtCNGC9. Группы III и IV-A состоят из 5 генов: AtCNGC14, AtCNGC15, AtCNGC16, AtCNGC17, AtCNGC18. Группа IV-A насчитывает 2 субъединицы CNGC: AtCNGC19, AtCNGC20. В целом, количество экзонов, определенных для CNGCs арабидопсиса, варьирует от 5 до 11. Количество экзонов AtCNGCs из группы I в одной и той же группе варьируется от 7 до 9. Количество экзонов AtCNGC группы II между 5 и 7, CNGCs из группы III имеют 6 - 7 экзонов, а CNGCs группы IV-A состоит 10 - 11 экзонов. В группе IV-B ген AtCNGC имеет девять экзонов. Поскольку CNGCs в группе IV-A имеют наибольшее количество экзонов, они с большей вероятностью подвергаются альтернативному расщеплению, генерируют новые гены и увеличивают функциональное разнообразие семейства генов CNGC. Анализ хромосомной локализации генов показал, что AtCNGCs расположены на девяти хромосомах (A01 – A07, A09 и A10). Гены AtCNGC распределены неравномерно: хромосома A01 несет шесть генов CNGC, хромосомы A02 и A04 несут три гена CNGC; хромосомы A03, A05 и A10 несут три гена CNGC, в то время как хромосомы A06, A07 и A09 несут два гена. В хромосоме A08 ген CNGC не обнаружен. Биоинформационный и сравнительный анализ предоставляют ценную информацию при изучении функций каналов, активируемых циклическими нуклеотидами, для улучшения стрессоустойчивости и продуктивности высших растений. С использованием в том числе и проведенного биоинформационного анализа, нами запланировано детальное молекулярное и биофизическое исследование CNGC растений в гетерологичной системе клеток животных (HEK293). Такое исследование поможет выяснить функции CNGC в регуляции путей передачи сигналов стресса и развития у высших растений.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

**Гапеева Т.А.¹, Василевич И.Б.¹, Костюк Н.И.², Пинчук С.В.¹, Стрельченя И.И.²,
Барсукова М.В.², Ломако Ю.В.², Волотовский И.Д.¹**

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,
Минск, Беларусь*

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого», Минск,
Беларусь*

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) найдены практически во всех тканях, где они самообновляются и дифференцируются во множество клеточных типов. Имеющиеся к настоящему времени многочисленные данные указывают на то, что МСК секретируют “паракринные факторы”. Показано, что продукция МСК трофических и иммуномодуляторных факторов может обеспечивать противовоспалительный, ангиогенный, анти-апоптический, митотический, антифиброзный, противоопухолевый эффекты. “Паракринный” механизм действия определяет возможность аллогенной трансплантации МСК для достижения терапевтического эффекта. Целью данной работы было получение препаратов МСК для последующей терапии болезней, прежде всего дистальной части конечностей крупного рогатого скота (КРС). В развитии данных болезней особую роль играет хроническая венозная недостаточность, развивающаяся в условиях ограниченного движения животных при содержании на крупных животноводческих комплексах. В этой связи способность МСК стимулировать процессы васкуляризации и восстановления иннервации в поврежденных тканях определяет возможный высокий терапевтический потенциал данных клеток при лечении болезней конечностей КРС.

В процессе работы особое внимание было уделено обеспечению стерильности биоптатов жировой ткани (ЖТ) КРС. В отличие от эксплантации тканей человека, а также мелких лабораторных животных, когда отбор материала можно произвести в стерильных операционных, эксплантацию ЖТ КРС осуществляли в убойном цехе мясокомбината, то есть в условиях повышенного риска загрязнения биоптатов микроорганизмами. В этой связи были разработаны специальные меры, позволившие получить исходный материал, удовлетворяющий требованиям стерильности при выделении МСК. Установлено, в частности, что обеззараживание биоптатов в 70% этаноле (20-30 сек) значительно снижает риск контаминации без существенного изменения качества материала. В качестве источников ЖТ использовали подкожную жировую клетчатку в области основания хвоста и почечную жировую капсулу. Определены оптимальные условия обработки жировой ткани КРС в растворе коллагеназы, обеспечивающие получение стромально-васкулярной фракции, содержащей более 90% жизнеспособных клеток. Было также выявлено, что использование ЖТ из области хвоста более предпочтительно по критерию выхода клеток стромально-васкулярной фракции. Изучение морфологии культивированных клеток из ЖТ КРС показало, что в сроки культивирования до 10 суток адгезировавшие к культуральному пластику клетки имели как веретеновидную, так и округлую или неправильную форму, а на сроках более 15 суток в культуре преобладали клетки веретеновидной формы. Анализ иммунофенотипа культур клеток 2-го пассажа показал высокое содержание клеток, экспрессирующих такие белки, как CD44 и CD90 (90-95%), и низкий процент клеток, экспрессирующих CD45 (0,8-1,2%), что соответствует критериям подлинности для МСК. В целом, полученные культуры МСК из ЖТ КРС характеризуются стабильным иммунофенотипом, высокими пролиферативной активностью и жизнеспособностью. Таким образом, ЖТ КРС является хорошим источником биомассы МСК.

АКТИВАЦИЯ ГЕНА ПЕРОКСИДАЗЫ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА

Гапеева Т.А., Мисюкевич А.Ю., Волотовский И.Д.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Эндогенные антимикробные пептиды (АМП) являются частью врожденной защитной системы живых организмов. Катионные АМП взаимодействуют с отрицательно заряженными мембранами фитопатогена с помощью электростатических сил, их гидрофобные участки встраиваются в мембраны, создавая дефекты, вызывающие утечку ионов и метаболитов. Это либо приводит к гибели клетки инфекционного агента из-за деполяризации и разрушения мембран, либо создаёт условия для проникновения пептида внутрь клетки патогена. Действие АМП на внутриклеточные мишени реализуется через такие механизмы, как прямое повреждение нуклеиновых кислот и мембран внутри клетки, генерация активных форм кислорода, нарушение синтеза нуклеиновых кислот и белков, ингибирование активности ферментов и др. [1]. Однако универсального механизма защитного действия АМП не предложено, при этом один и тот же пептид способен различно действовать в зависимости от мишени [2], сохраняя специфичность по отношению к определённому кругу патогенов, определяемых организмом-хозяином.

Для изучения механизма действия АМП внутри клетки могут быть использованы методы генно-инженерной модификации генома. Ранее на основе растений белорусских сортов нами была создана трансгенная форма картофеля с экспрессируемым геном антимикробного пептида цекропин-мелиттинового типа MsrAI. Данный пептид особенно эффективен по отношению к грибным патогенам [3]. Кроме того, показано, что в клетках растений риса, синтезирующих гетерологичный пептид цекропин А, в отсутствие фитопатогенной инфекции увеличивается экспрессия ряда генов системы защиты от окислительного стресса, при этом наиболее активируемыми являются гены пероксидаз [4]. Целью данной работы было изучение базального уровня экспрессии генов пероксидаз в клетках трансгенных растений картофеля белорусского сорта Одиссей, экспрессирующих рекомбинантный ген пептида MsrAI [5]. С использованием методов кДНК-ПЦР и ДНК-секвенирования показано, что в клетках данных растений в отсутствие фитопатогенной инфекции наблюдается активация экспрессии гена пероксидазы класса POX. Увеличение экспрессии гена данного фермента косвенно свидетельствует о повышенном образовании активных форм кислорода, что может определять особую устойчивость растения к грибным патогенам. Таким образом, способы антибиотического действия гетерологичных антимикробных пептидов в клетках растений могут включать не только прямое воздействие на клетки фитопатогенов, но и активацию защитных механизмов растения-хозяина.

Библиографические ссылки

1. Rajeshwari S., Shukla P. Antimicrobial Peptides: Recent Insights on Biotechnological Interventions and Future Perspectives // Protein & Peptide Letters. 2019. Vol. 26. P. 79-87.
2. Zasloff M. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms // Advances in Experimental Medicine and Biology. 2019. Vol.1117. P. 3-6.
3. Cavallarin L., Andreu D., San Segundo B. Cecropin A - Derived Peptides Are Potent Inhibitors // Molecular Plant-Microbe Interactions. 1998. Vol. 11. P. 218–227.
4. Campo, S., Silvia M., Jose G.-M, Garcia-Martinez J., Blanca, San S. Production of cecropin A in transgenic rice plants // Plant Biotechnology Journal. 2008. Vol. 6. P. 585–608.
5. Вутто Н.Л. и др. Трансгенные растения картофеля белорусских сортов, экспрессирующие гены антимикробных пептидов // Генетика. 2010. Т.46. С.1–9.

ПОНИЖЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ ОКСИЭТИЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО ГЛИЦЕРИНА СО СТЕПЕНЬЮ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ $N=25$ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ ХРАНЕНИИ

Говорова Ю.С.

*Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины,
Харьков, Украина*

Исследование влияния низких температур и криопротекторов на белки является перспективным направлением в современной криобиологии. Оксиэтильное производное глицерина со степенью полимеризации $n=25$ ($OЭГ_{n=25}$) является олигомером оксиэтилированного глицерина, показавшим хорошие результаты в качестве криопротектора при криоконсервировании эритроцитов человека [1]. Исследование термостабильности белков является дополнительным методом оценки их структурного состояния после хранения при низких температурах. В связи с чем, целью данной работы было исследование влияния $OЭГ_{n=25}$ в концентрации до 50% на термостабильность молекул гемоглобина человека в течении 3 мес при температуре -196°C методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Данный метод широко используется для анализа теплового анфолдинга белков [2].

Термодинамические и кинетические параметры денатурации гемоглобина рассчитывались с помощью соответствующих термограмм, зарегистрированных со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ при избыточном давлении 2,5 атм. Область сканирования температуры – от 20°C до 100°C . Раствор гемоглобина человека (в изотоническом натрий-фосфатном буферном растворе ($\text{pH } 7,4$)) инкубировался с $OЭГ_{n=25}$ соответствующей концентрации в течении 1 часа при 4°C , затем замораживался путем погружения в жидкий азот (средняя скорость охлаждения при этом составляла $200^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). Полученный образец делился на две группы: первая использовалась в качестве контроля при однократном замораживании, а вторая хранилась в течении 3 месяцев.

На основании полученных термограмм были определены температуры денатурации, рассчитаны калориметрические энтальпии и значения энергии активации денатурации гемоглобина с исследованными концентрациями $OЭГ_{n=25}$, а также построены зависимости данных параметров от концентрации криопротектора. Эндотермический пик на термограммах соответствует процессу необратимой денатурации молекул гемоглобина. Температура денатурации гемоглобина в исходном буферном растворе (без замораживания) составляет $(71 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$. С ростом концентрации криопротектора температура денатурации монотонно убывает. Значения калориметрической энтальпии и энергии активации также понижаются при увеличении концентрации $OЭГ_{n=25}$. Однократное замораживание гемоглобина с $OЭГ_{n=25}$ показало, что зависимость температуры денатурации белка от концентрации криопротектора можно разделить на 2 области: область сохранения термической стабильности близкой к значениям денатурации белка без замораживания ($0-30\% OЭГ_{n=25}$) и область снижения термической стабильности ($30-50\% OЭГ_{n=25}$) гемоглобина. При хранении гемоглобина с $OЭГ_{n=25}$ при температуре -196°C (3 мес) подобная тенденция сохраняется, однако дополнительно регистрируется экзотермический пик, который соответствует, предположительно, агрегации молекул белка.

Библиографические ссылки

1. Pakhomova Y.S., Kompaniets A.M., Kuleshova L.G. Transformation of Erythrocytes During Cryopreservation // Probl. Cryobiol. Cryomed. 2016. Vol. 26. P. 349–360.
2. Mazurenko S. et al. Exploration of Protein Unfolding // Sci Rep. 2017. Vol.7. P. 17-23.

ОБ ИНДУЦИРОВАННОЙ ГЕПАТОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫС

Горохова Н.И., Полешко А.Г., Пинчук С.В., Волотовский И.Д.

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,
Минск, Беларусь*

На данный момент заболевания печени различной этиологии широко распространены и являются одной из главных причин смертности населения. Существующие методы их лечения не всегда эффективны. В связи с этим, особый интерес представляет изучение возможности восстановления функции печени с помощью клеточной терапии, основанной на использовании мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Учитывая, что МСК поддаются индуцированной дифференцировке *in vitro*, в том числе в гепатоцитарном направлении, представляется актуальным изучение процесса их направленной дифференцировки в культуре для получения предшественников гепатоцитов.

Целью данной работы стала адаптация протокола направленной дифференцировки клеток в гепатоцитарном направлении для получения предшественников гепатоцитов из МСК костного мозга (КМ) крыс *in vitro*.

МСК выделяли из КМ большеберцовой или бедренной костей белых беспородных крыс 3-х месячного возраста, культивировали в стандартных условиях (5 % CO₂, 95% атмосферного воздуха) до 2 пассажа в среде α MEM с 10 % фетальной бычьей сывороткой. Природу полученной культуры клеток оценивали по их иммунофенотипу. Для направленной гепатогенной дифференцировки МСК использовали клетки 3-го пассажа с фенотипом CD29⁺/CD44⁺/CD90⁺/CD34⁻/CD45⁻, при достижении ими конфлюентности монослоя в 80%. В культуру клеток вносили следующие индукторы дифференцировки: FGF4 (10 нг/мл), HGF (20 нг/мл), онкостатин М (10 нг/мл) и дексаметазон (1 мкМ). Эффективность проведенной *in vitro* дифференцировки, оценивали по экспрессии полученными клетками основных маркеров предшественников гепатоцитов цитokerатина 18 (ЦК-18) [1] и белка плазмы α -фетопротеина (ФПр) [2] методом проточной цитофлуориметрии.

В результате было выявлено, что клетки, которые культивировали с добавлением в среду роста индукторов дифференцировки в указанном выше составе и концентрациях, экспрессировали ФПр и ЦК-18 в 1,3 и 13 раз выше, соответственно, по сравнению с контрольными МСК, выращенными без добавления компонентов индукционной среды. Полученные данные свидетельствуют, что подобранные условия направленной дифференцировки *in vitro* являются оптимальными для индукции процесса дифференцировки в гепатогенном направлении в МСК КМ крыс. Данная методика будет использоваться для изучения механизмов эпигенетического контроля МСК, индуцированных к дифференцировке в гепатогенном направлении.

Библиографические ссылки

1. Chougule P., Sumitran-Holgersso. S. Cytokeratins of the Liver and Intestine Epithelial Cells During Development and Disease // Cytokeratins: Tools in Oncology. 2012. Vol. 1. P. 15–32.
2. Kuijk E. W., Rasmussen S. et al. Generation and characterization of rat liver stem cell lines and their engraftment in a rat model of liver failure // J. Scientific Reports. 2016. Vol. 6. P.1–11.

РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ ИОНАМИ КАЛЬЦИЯ

Заводник И.Б., Лапшина Е.А., Заводник Л.Б., Ильич Т.В., Головач Н.Г., Дремза И.К.,
Климович И.И., Коваленя Т.А.

*Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
Гродненский Государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь*

Митохондрии являются основным сенсором, регулятором и депо накопления ионов кальция в клетке. Для тонкой регуляции кальциевого сигнала в клетке существует широкий спектр молекул-мишеней, индуцирующих и декодирующих изменения концентрации Ca^{2+} в клетке (помпы, каналы, Ca^{2+} -связывающие белки, Ca^{2+} -зависимые ферменты, локализованные как в цитоплазме, так и в органеллах). Митохондрии, динамичные и пластичные органеллы, биохимически обеспечивающие энергосистему клетки, вовлечены во множество метаболических и регуляторных процессов: окислительное фосфорилирование, клеточную сигнализацию, кальциевый гомеостаз. Определяющую роль играют ионы Ca^{2+} в развитии апоптоза, инициируя формирование пор высокой проницаемости (mitochondrial permeability transition pore, МРТР) в митохондриальной мембране и истечение апоптотических факторов. В цитоплазме клетки концентрация ионов Ca^{2+} очень низка и составляет величину порядка 50-100 нМ (продолжительное, в течение десятков минут, повышение содержания ионов Ca^{2+} в цитоплазме клетки (до 10^{-5} М) приводит к гибели клетки). Цитотоксичность, обусловленная такими патологиями, как ишемия-реперфузия, эксайтотоксичность, как известно, включает в себя патофизиологическое возрастание внутриклеточной концентрации кальция и другие митохондριο-опосредованные процессы. Посредством кальциевого унипортера происходит аккумулялирование в митохондриях избыточного цитозольного кальция, высвобождение кальция происходит посредством натрий/кальциевого и кальций/протонного антипортеров. Регулируя кальциевый гомеостаз в клетке, митохондрии контролируют важнейшие клеточные функции.

Идентификация клеточных и митохондриальных Ca^{2+} транспортеров, выяснение механизмов формирования МРТР открывает новые перспективы использования митохондриальных компонентов кальциевой сигнализации в качестве мишеней терапевтического воздействия.

Используя график Лайнуивера-Бэрка зависимости скорости МРТ от концентрации Ca^{2+} , мы оценили кажущуюся константу Михаэлиса-Ментен, процесса образования пор, $K_m=75\pm 20$ мкМ (при 20°C) для митохондрий печени крыс. Порядок взаимодействия ионов Ca^{2+} с митохондриальными центрами $n=3$ и кажущуюся $K_d=60\pm 12$ мкМ, что соответствует микромолярным значениям константы диссоциации Ca^{2+} и соответствующих митохондриальных транспортеров. Из температурной зависимости скорости набухания митохондрий, представленной в виде графика Аррениуса, мы вычислили энергию активации процесса МРТ, которая была равна 127 ± 19 кДж/моль при температурах ниже точки излома графика Аррениуса (30–34°C) и 56 ± 9 кДж/моль при более высоких температурах. Быстрое Ca^{2+} -индуцируемое истощение митохондриального НАДН и деполяризация мембран предшествовали формированию МРТР, ионы Mg^{2+} ингибировали диссипацию митохондриального потенциала. Ингибитор кальциевого унипортера, Рутений красный, препятствовал процессу МРТ и деполяризации митохондриальной мембраны. Токсическое поражение печени крыс повышало чувствительность митохондрий к Ca^{2+} -индуцируемому МРТ. Таким образом, ионы Ca^{2+} регулируют важнейшие митохондриальные и клеточные процессы.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАСЛЕДСТВЕННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ МУКОВИСЦИДОЗА. ПРИРОДА МУТАЦИИ

Ермоленко Д.А., Мисюкевич А.Ю., Полешко А.Г., Волотовский И.Д.

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,
Минск, Беларусь*

Муковисцидоз — тяжелое моногенное аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутацией гена CFTR (трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза). Продуктом данного гена является трансмембранный белок большинства эпителиальных клеток, функционирующий как цАМФ-зависимый хлорный канал в клетках легких и ЖКТ [1,2], дефект которого приводит к патологическому функционированию легких, поджелудочной железы, ЖКТ, репродуктивной системы и печени [3]. Известно, что наиболее часто встречающаяся мутация, участвующая в формировании патологического фенотипа по данному заболеванию (70% случаев) является мутация F508del (делеция фенилаланина в 508 положении) в 10 экзоне гена [4].

Целью работы явилось определение природы мутации в гене CFTR у больного П. 20-ти лет, приводящей к нарушению нормального функционирования транспортного белка CFTR, ответственного за развитие тяжелого наследственного заболевания — муковисцидоза, с целью последующего проведения CRISPR/Cas9 редактирования мутированного гена.

В качестве объекта исследования использовались фибробласты кожи, полученные от больного муковисцидозом. Клетки выделяли методом экспланта и культивировали при 37 °C, 5% CO₂ в среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 100 ед./мл. стрептомицина/пенициллина, соответственно. В дальнейшем из клеток выделяли ДНК и проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием пары праймеров (F: ACTGGAGCCTTCAGAGGGTAA, R: TGGCATGCTTTGATGACGCT), фланкирующих целевой участок гена CFTR в области 10 экзона, предположительно несущий мутацию F508del. Анализ полученных последовательностей ПЦР-продуктов проводили методом секвенирования по Сэнгеру с использованием генетического анализатора ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, США), при котором флуоресцентно-меченные фрагменты ДНК разделяли методом капиллярного гель-электрофореза, с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, согласно рекомендациям производителя.

В результате проведения прямого секвенирования и биоинформатического анализа данных, у пациента П. обнаружена мутация в гене CFTR в компаудном состоянии, с известной мутацией del508F, приводящая к выпадению аминокислоты фенилаланина в 508 положении транспортного белка, локализованную в 10 экзоне гена и неизвестной мутацией, расположение которой остается неизвестной, т.к. она может находиться в пределах всего гена CFTR и которая совместно с F508del приводит к фенотипу организма и появлению симптомов заболевания: нарушению созревания белка CFTR и его полному отсутствию на поверхности клеток. Полученные данные будут использоваться в дальнейшем для коррекции мутации с использованием системы редактирования CRISPR/Cas9.

Библиографические ссылки

1. Riordan J., Rommens, J., Kerem, B., Alon, N. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA // Science. 1989. Vol. 245. P. 1066–1073.
2. Linsdell, P. Functional architecture of CFTR // Molecular Membrane Biology. 2013. Vol. 31. P. 1–16.
3. Nichols D., Chmiel J. Inflammation and its genesis // Pediatric Pulmonology. 2015. Vol. 50. P. 39–56.
4. Bombieri C., Seia M. Genotypes and Phenotypes in Cystic Fibrosis and Cystic Fibrosis // Semin Respir Crit Care Med. 2015. Vol. 36. P. 180–193.

АТФсинтаза КАК МОЛЕКУЛЯРНАЯ МИШЕНЬ ПРИ РАЗРАБОТКЕ НОВОГО КЛАССА ЛЕКАРСТВ И ПЕСТИЦИДОВ

Золотарева Е.К.

Институт ботаники им. М. Холодного НАН Украины, Киев, Украина

АТФ-синтаза (ЕС 3.6.3.14) - мембранный энзиматический комплекс, осуществляющий синтез/гидролиз АТФ, сопряженный с трансмембранным переносом протонов в хлоропластах, митохондриях и бактериях. Он состоит из встроенной в мембрану гидрофобной части F_0 , обеспечивающей трансмембранный перенос протонов, и гидрофильной каталитической части - фактора сопряжения F_1 . F_1F_0 -АТФ-синтаза функционирует как наномашина - наноразмерный электродвигатель, статор которого погружен в мембранную часть комплекса, а каталитические субъединицы F_1 подобно ротору вращаются в процессе синтеза и гидролиза АТФ.

Структуры протонных АТФ-синтаз из разных организмов очень похожи, однако митохондриальная F_1F_0 -АТФ-синтаза отличается от фермента прокариотов наличием дополнительных субъединиц в подкомплексе статора, соединенных с внешними α -спиралями каталитических субъединиц. Эти тонкие структурные различия между одним и тем же энзиматическим комплексом бактерий и митохондрий могут быть использованы (и уже используются) для разработки нового класса лекарств и пестицидов [1] и имеют решающее значение с точки зрения использования АТФ-синтазы в качестве мишени для лекарственных средств в селективной борьбе с патогенами без влияния на организм хозяина. Из-за того, что внутриклеточный пул АТФ пополняется главным образом за счет F_1F_0 -АТФ-синтаз, подавление их активности несовместимо с жизнью в аэробных условиях. С другой стороны, недавно показана ключевая роль F_1F_0 -АТФ-синтаз в индукции апоптоза - клеточной смерти. Таким образом, центральная роль этого ферментного комплекса в энергетическом обеспечении жизнедеятельности расширяет потенциальную возможность использования фермента в качестве мишени для уничтожения нежелательных клеток или, при предотвращении апоптоза, для предотвращения гибели клеток, вызванной некоторыми патологиями, которые еще плохо поддаются лечению. Любое натуральное или синтетическое соединение, которое нацелено на комплекс F_1F_0 -АТФ-синтазы и модулирует его каталитическую активность, потенциально может быть использовано в терапии для противодействия развитию патогенных микроорганизмов, при условии, что оно способно различать эукариотическую и прокариотическую F_1F_0 -АТФ-синтазы. Несмотря на то, что известно, что более 300 природных и синтетических молекул, связывающихся с F_1F_0 или ингибирующих этот комплекс [2], сравнительное изучение их участия в регуляции энергетического обмена в организмах различного происхождения началось лишь недавно [1].

Поскольку АТФ-синтаза является обратимой АТФазой, и направленная стимуляция её гидролитической активности может быть одним из подходов к изменению энергетического баланса клетки. В предварительных исследованиях мы показали, что в зависимости от концентрации некоторых сульфаниламидных соединений, активность F_1 -АТФазы может как стимулироваться, так и подавляться. Рассматриваются пути активации гидролитической активности F_1F_0 как одного из подходов к созданию нового класса лекарственных препаратов и пестицидов.

Библиографические ссылки

1. Ahmad Z., Hassan S.S., Azim S.A Therapeutic Connection between Dietary Phytochemicals and ATP Synthase // Current medicinal chemistry. 2017. Vol. 24, №35. P. 3894–3906.
2. Hong, S.; Pedersen, P. L. ATP Synthase and the Actions // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2008. Vol.72. P. 590–641.

ЭФФЕКТ КВЕРЦЕТИНА И КОМПЛЕКСА КВЕРЦЕТИН-ГИДРОКСИПРОПИЛ- β -ЦИКЛОДЕКСТРИН ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МИТОХОНДРИЙ *IN VITRO*

Коваленя Т.А., Ильич Т.В., Савко А.И., Храмова П.С.

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

Кверцетин – хорошо изученный флавоноид, широко распространен в растительном мире. Существенный интерес представляет способность полифенолов, в том числе кверцетина, модулировать митохондриальный биогенез, регулировать формирование пор высокой проницаемости, мембранный потенциал, респираторную активность митохондрий [1]. В данной работе мы оценили эффекты флавоноида кверцетина и его наноструктурированного комплекса с гидроксипропил- β -циклодекстрином (HP- β -CD) на респираторную активность митохондрий печени крыс при окислительном стрессе, индуцируемом терт-бутилгидропероксидом (tBHP), водорастворимым аналогом гидроперекисей липидов (700 мкМ).

Комплекс кверцетин-HP- β -CD получали методом, описанным И. М. Савиком и соавт. [2]. Митохондрии печени крыс выделяли методом дифференциального центрифугирования [3]. Респираторную активность митохондрий печени крыс регистрировали полярографически, используя электрод Кларка, встроенный в герметическую термостатируемую ячейку [4].

При внесении в суспензию митохондрий tBHP (700 мкМ), наблюдаем значительное нарушение респираторной и синтетической активности митохондрий: увеличивается скорость субстрат-стимулируемого дыхания V_2 и снижается скорость АДФ-стимулируемого дыхания V_3 (в качестве субстрата использовали сукцинат). Коэффициент АК вследствие полного разобщения процессов окисления и фосфорилирования достигал 1, а коэффициент фосфорилирования АДФ/О уменьшался на 40 %. Предварительное внесение в суспензию митохондрий флавоноида кверцетина и комплекса кверцетин-HP- β -CD (50 мкМ) несколько снижало скорость субстрат-стимулируемого дыхания V_2 в присутствии сукцината (на 25 %). Кверцетин и комплекс включения не оказали влияния на скорость АДФ-стимулируемого дыхания на достоверном уровне. Как кверцетин (10–50 мкМ), так и комплекс кверцетин-HP- β -CD (10–50 мкМ) не влияют на значение коэффициента фосфорилирования на фоне tBHP (700 мкМ). В то же время коэффициент АК в присутствии кверцетина и комплекса кверцетин-HP- β -CD увеличивается на 25 %. При моделировании окислительного стресса tBHP (700 мкМ) различий в эффектах кверцетина и комплекса не обнаружено. Таким образом, обнаружен аддитивный эффект кверцетина и его комплекса и окислителя tBHP. Ранее подобный эффект ЭГКГ был показан Mezera и соавторами [5]. В то же время частичное восстановление коэффициента АК при окислительном воздействии свидетельствует об определенном протекторном эффекте кверцетина/комплекса кверцетин-HP- β -CD.

Библиографические ссылки

1. Ortega R., Garci N. The flavonoid quercetin induces changes in mitochondrial permeability by inhibiting adenine nucleotide translocase // J. Bioenerg. Biomembr. 2009. Vol. 41, № 1. P. 41–47.
2. Savic I.M., Savic Gajic I.M., Mladenovic J. et al. Investigation of properties and structural characterization of the quercetin // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 2015. Vol. 82. P. 383–394.
3. Johnson D., Lardy H.A. Isolation of liver or kidney mitochondria // J. Methods Enzymol. 1967. Vol. 10. P. 94–101.
4. Dremza I.K., Lapshina E.A., Kujawa J. et al. Oxygen-related processes in red blood cells exposed to tert-butyl hydroperoxide // Redox Rep. 2006. Vol. 11. № 4. P. 185–192.
5. Mezera V., Endlicher R., Kucera O. Effects of Epigallocatechin Gallate on TBHydroperoxide-Induced Mitochondrial Dysfunction // Oxid. Med. Cell. Longev. 2016. Vol. 2016. P. 1–8.

МЕХАНИЗМЫ КАЛЬЦИЕВОЙ РЕГУЛЯЦИИ ОТВЕТА СПЕРМАТОЗОИДОВ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА НА ПРОГЕСТЕРОН

Коробкина Ю.Д.^{1,2}, Симоненко Е.Ю.¹, Свешникова А.Н.^{1,2}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 2

²Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 109029, Москва, ул. Средняя Калитниковская, 30

Кальциевая сигнализация – один из ключевых способов передачи сигнала в сперматозоидах, регулируя в них акросомную реакцию, капацитацию и гиперактивацию. В сперматозоидах мыши и человека кальциевый ответ может быть индуцирован стероидным гормоном прогестероном. Прогестерон может вызвать несколько типов кальциевого ответа в сперматозоидах человека и мыши, в частности, низкочастотные кальциевые осцилляции [1]. При этом прогестерон способен активировать кальциевый канал CatSper в сперматозоидах человека, но не грызунов. Однако, при концентрациях ~ 50 μM прогестерон способен вызвать кальциевый ответ в мышинных сперматозоидах [1]. Механизмы активации сперматозоидов человека и мыши не ясны до конца. Целью данной работы является уточнение механизмов кальциевой сигнализации при физиологической активации в сперматозоидах человека и мыши. Наблюдение активации сперматозоидов, окрашенных Fura Red или Fluo 5N производилось в режиме эпифлуоресценции на микроскопе Nikon TI Eclipse или на спектрофлуориметре. Компьютерные модели представляют собой систему дифференциальных уравнений (точечная модель – система ОДУ, интегрируемая в COPASI методом LSODA; распределенная модель – система ДУЧП, интегрируемая в VCell (user: Juliajessica model: CalciumSperm) методом конечных объемов). Экспериментально показано, что мышинные сперматозоиды активируются прогестероном в концентрации 50 μM с характерным временем активации и ответа 100 секунд и высотой кальциевого пика ~ 0.7 μM , а сперматозоиды человека – в концентрации 5 μM с характерным временем активации и ответа 90 секунд и высотой кальциевого пика ~ 1.5 μM . 25% сперматозоидов человека отвечает на прогестероновую активацию кальциевыми осцилляциями с периодом ~ 100 с. Для определения механизмов развития кальциевого ответа были построены компьютерные модели внутриклеточной сигнализации. В случае сперматозоидов человека, максимальная ширина пика, описываемая точечной моделью, составляет 40 с, максимальный период осцилляций – 50 с. В случае сперматозоидов мыши, максимальная ширина пика, описываемая точечной моделью, составляет 50 с, максимальный период осцилляций – 50 с. Распределенная модель в обоих случаях способна описать наблюдаемую в эксперименте ширину пика концентрации кальция при коэффициенте диффузии свободного иона кальция, меньшем 100 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Ширина пика в распределенной модели зависит от активности кальциевой АТФазы плазматической мембраны (PMCA). Также кальциевые осцилляции в сперматозоидах человека и мыши могут быть описаны только при учете активности фермента фосфолипаза $\text{C } \delta$ (PLC δ). При коэффициенте диффузии для инозитолтрифосфата большем, чем 20 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, тип ответа меняется с одиночного кальциевого пика на осцилляторный. Это указывает на то, что важную роль в генерации кальциевого ответа в сперматозоидах человека и мыши играет пространственная удаленность кальциевого депо, места локализации PLC и PMCA. Работа поддержана грантами РФФИ 17-00-00138 и 18-34-20026.

Библиографические ссылки

1. Lishko, P.V., Botchkina, I.L., Kirichok, Y. Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm // Nature. 2011. Vol. 471. P. 387–391.

КОНФОРМАЦИОННАЯ РЕЛАКСАЦИЯ И ПОВТОРНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА С α И β ЦЕПЯМИ ГЕМОГЛОБИНА ВО ВРЕМЕННОМ ДИАПАЗОНЕ ОТ ПИКОСЕКУНДЫ ДО МИЛЛИСЕКУНДЫ

Лепешкевич С.В.,¹ Сазанович И.В.,² Пархоц М.В.,¹ Гилевич С.Н.,³ Джагаров Б.М.¹

¹Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь

²Лаборатория Резерфорда–Эплтона, Дидкот, Великобритания

³Институт биоорганической химии, Минск, Беларусь

В данной работе проведен анализ кинетики фотоиндуцированного повторного связывания молекулярного кислорода (O_2) и сопутствующих конформационных изменений в изолированных α и β цепях гемоглобина человека. Кинетики процессов исследовались на основании измеренных время-разрешенных спектров наведенного поглощения в области полосы Соре во временном диапазоне от 1 пикосекунды до 800 микросекунд после лазерного фотовозбуждения. Спектры наведенного поглощения измерены на установке УЛЬТРА, созданной в Центральной лазерной лаборатории, Лаборатория Резерфорда–Эплтона, Дидкот, Великобритания [1,2]. В качестве источника оптического возбуждения использовались импульсы длительностью 100 фс на длине волны 543 нм с энергией 1 мкДж. Изолированные цепи гемоглобина получены по методике, описанной в работе [3]. Измеренные спектры наведенного поглощения, в первую очередь, были количественно проанализированы с использованием сингулярного разложения. Показано, что после фотоиндуцированной диссоциации молекулы O_2 и последующего остывания гема, во временном диапазоне от 40 пс до 800 микросекунд, включительно, спектры наведенного поглощения для каждой изолированной цепи гемоглобина можно представить в виде двух ортонормированных базисных спектров с зависящими от времени амплитудами. Временная зависимость амплитуды базисного спектра соответствующего наибольшему сингулярному значению (первый базисный спектр) является хорошим приближением кинетики повторного связывания лиганда с ионом железа гема. В динамику изменения амплитуды второго базисного спектра вносят вклад три процесса. Первый представляет собой спектральные изменения дезоксигема, вызванные конформационной релаксацией белка. Второй заключается в общем падении амплитуды из-за уменьшения концентрации дезоксигема за счет повторного связывания лиганда. Третий представляет собой спектральные изменения, обусловленные «выжиганием» спектральных провалов. С применением метода максимальной энтропии показано, что временные зависимости амплитуд двух базисных спектров могут быть аппроксимированы распределениями времен. На основании полученных распределений обнаружены принципиальные отличия для изолированных α и β цепей гемоглобина человека как в кинетиках повторного связывания молекулы O_2 , так и в кинетиках конформационной релаксации белка. Авторы благодарят Совет по Науке и Технологиям Великобритании за предоставленную возможность проведения экспериментов (заявка №16130005). Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований Республики Беларусь "Фотоника, опто- и микроэлектроника 1.4.01" (2016–2020).

Библиографические ссылки

1. Greetham G.M., Burgos P., Cao Q. et al. ULTRA: A Unique Instrument for Time-Resolved Spectroscopy // Appl. Spectrosc. 2010. Vol. 64. P. 1311–1319.
2. Greetham G.M., Sole D., Clark I.P. et al. Time-resolved multiple probe spectroscopy // Rev. Sci. Instrum. 2012. Vol. 83. P. 103107-1–5.
3. Lepeshkevich S.V., Gilevich S.N., Parkhats M.V. et al. Molecular oxygen migration through the xenon docking sites of human hemoglobin // Biochim. Biophys. Acta. 2016. Vol. 1864. P. 1110–1121.

ФЕНОТИПИРОВАНИЕ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДИКИ ЗАМЕНЫ СРЕДЫ

Самохина В.В., Шашко А.Ю., Войтехович М.А., Мацкевич В.С., Бондаренко В.Ю., Смолич И.И., Демидчик В.В.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Корневая система растений остается наименее изученным объектом в плане ее фенотипа, а также особенностей регуляции роста и развития. В этой связи высоко актуальной является разработка соответствующих методик оценки фенотипа и измерения ростовых параметров корневой системы с использованием современных подходов цифрового фенотипирования и стандартизированных ростовых тестов, в особенности, на базе синхронных лабораторных культур. Целью настоящей работы было разработать методики неинвазивного тестирования модификаций роста и развития корневой системы модельных растений на базе техники замены среды и цифрового анализа изображений. В качестве объектов исследования служили растения *Arabidopsis thaliana* и *Triticum aestivum*. Дополнительно одна из систем тестирования была апробирована на *Hordeum vulgare*, *Pisum sativum* и *Helianthus annuus*. Для *Arabidopsis thaliana* был разработан тест в стерильных условиях для вертикальной корневой культуры, выращиваемой в чашках Петри на поверхности стерильной гелевой среды (PhytigelTM), содержащей 100% микро- и макросолей по прописи Мурашиге и Скуга (МС; Duchefa), 1% сахарозы. Культура *Arabidopsis thaliana* (дикие экотипы, трансгенные растения и мутантные линии) подращивалась в течение 4-5 суток, затем гелевая среда ниже уровня кончиков корней удалялась без повреждения корней, и освободившееся пространство заполнялось средой, содержащей тестируемые рост-модифицирующие агенты. В дальнейшем регистрировался рост и развитие растений на протяжении 5-7 суток. Локализация кончика корня помечалась маркером на дне чашки Петри, производилась фотосъемка в режиме HSV, размеры корня измерялись автоматически при помощи программы ImageJ и собственной оригинальной программы анализа изображений, разработанной с использованием алгоритмов компьютерного зрения. Верификация данных производилась вручную. В качестве рост-модифицирующих обработок были испытаны различные уровни NaCl, Ni²⁺, Al³⁺ (при pH 4,5), L-аскорбата, H₂O₂, брассиностероидов, ауксинов и др. Для сравнения были проведены тесты по анализу воздействия данных агентов с момента прорастания («прорастание + рост»; агент добавлялся в среду культивирования до высадки семян). Было установлено, что разработанные тесты по замене среды обладают высокой степенью гомогенности данных, а полученные при помощи них результаты отличаются от тестов на «прорастание + рост», т.е. в них более адекватно производится оценка ростовых показателей. В случае *Triticum aestivum* и других растений с крупной корневой системой были разработаны и использованы крупные плоские стеклянные сосуды с системой продольных ячеек, в которые помещались корни молодых проростков. После высадки корней сосуды заполнялись контрольным низкосолевым питательным раствором, который в дальнейшем заменялся на тестовый раствор, содержащий рост-модифицирующие агенты. Камера и растворы были открытого типа (нестерильные условия), для устранения инфицирования использовалась барботажная система, прокачивающая воздух через весь объем экспериментальной камеры. Регистрация изображений и маркировка локализации кончика корня производилась таким же образом, как и для пластиковых чашек. Данный тест показал высокую эффективность для исследования воздействия ряда рост-модифицирующих агентов на корневую систему растений пшеницы. Кроме того, благодаря прозрачным стенкам сосудов, удалось получить и проанализировать внешний вид корневой системы *Triticum aestivum* и изучить модификацию ее архитектуры в ответ на ключевые стрессоры и важнейшие фитогормоны.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ УРИДИНА НА ПАНКРЕАТИЧЕСКУЮ ФЛА₂ МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Скоростецкая Л.А.¹, Герловский Д.О.¹, Ремеева Е.А.¹, Артемьева Ю.Н.¹,
Василевская Е.Д.², Биричевская Л.Л.³, Винтер М.А.³, Зинченко А.И.³,
Михайлопуло И.А.¹, Литвинко Н.М.¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, ²Белорусский государственный университет, Беларусь, ³Институт микробиологии НАН Беларуси, Беларусь

Фосфолипаза А₂ (КФ 3.1.1.4, ФЛА₂) – фермент, осуществляющий межфазный катализ. Поверхность раздела «липид—вода» играет существенную роль при выполнении фосфолипазами своей каталитической функции, как и другими липазами в отличие от большинства ферментов, осуществляющих катализ в свободном объеме [1]. Для прикрепления к межфазной поверхности фермент имеет специальный участок, топографически отличающийся от каталитического центра. В связи с этим ингибирование фермента различными агентами может осуществляться за счет взаимодействия с обоими центрами. Нами ранее обнаружено ингибирование в разной степени активности панкреатической ФЛА₂ конъюгатами фосфатидилэтаноламина с замещением аминного фрагмента на 2',3'-дидезоксицитидил и 9-[(2-гидроксиэтокси)метил]-гуанозил [2], а также установлено снижение активности ФЛА₂ под действием уридинсодержащего липонуклеотида. Цель работы – изучение действия уридина на активность ФЛА₂ для выяснения зависимости ингибиторных свойств уридинсодержащего липонуклеотида от нуклеозидной компоненты. Поверхность раздела «липид—вода» формировали в виде мицеллярной фазы фосфатидилхолина с дезоксихолатом натрия, поскольку в таком случае образуются смешанные мицеллы, в которых все молекулы субстрата максимально доступны ферменту. Для определения активности ФЛА₂ использовали дифференциальную спектроскопию. В качестве индикатора отщепления жирной кислоты, как продукта реакции, служили спектральные характеристики гемоглобина при его переходе в гемихром. Дифференциальные спектры регистрировали на спектрофотометре «Specord UV VIS», Германия, в режиме пропускания (Т, 75-125%) в диапазоне длин волн 360-450 нм в соответствии с оптимизированной методикой. Активность фермента выражали как ΔD₄₀₅₋₄₂₃, поскольку количество отщепленной жирной кислоты при фосфолиполизе пропорционально амплитуде дифференциального спектра. Показано, что активность панкреатической ФЛА₂ в присутствии уридина (0,27ОЕ) в 1,5 ниже, чем в его отсутствие (0,41ОЕ). Полученные результаты обсуждаются в свете возможного взаимодействия нуклеозидной компоненты липонуклеотидов с центром распознавания поверхности ФЛА₂ и требуют дальнейшего изучения действия этого эффектора на кинетическом уровне с использованием других надмолекулярных форм субстрата, например, липосом, как традиционной модели биологической мембраны. Работа выполнена при финансовой поддержке Национальной Академии Наук Беларуси (проект #116-12-03-2019).

Библиографические ссылки

1. Murakami, M. Novel functions of phospholipase A₂s: Overview/ M.Murakami // BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.02.005>.
2. Литвинко Н.М. и др. Патент ВУ №11905 Конъюгат фосфолипида с модифицированным нуклеозидом, фармацевтическая композиция и средство, повышающее устойчивость к действию панкреатической фосфолипазы. Дата опубликования 30.06.2009.

НЕОБЫЧНЫЕ СВОЙСТВА РАЗБАВЛЕННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

Лобышев В.И.

Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Показано, что растворы дипептидов при малых концентрациях (менее 10^{-6} М) склонны к самоорганизации с образованием мезочастиц размером порядка 100 нм [1]. Эти частицы ведут себя подобно кристаллофосфорам и характеризуются резким увеличением интенсивности флюоресценции. Аналогичное проявление люминесцентных характеристик было обнаружено в растворах хлористого натрия при последовательных разбавлениях, сопровождавшихся интенсивным встряхиванием [2, 3]. При концентрации соли в области 10^{-12} – 10^{-13} М наблюдается максимум интенсивности флюоресценции. Параллельно была исследована спонтанная двигательная активность пресноводных одноклеточных организмов *Spirostoma ambiguum* где была впервые показана высоко значимая корреляция ($|r|=0,93$) между результатами реакции живых организмов и оптическими характеристиками соответствующих растворов [3].

Показано также, что люминесцентные характеристики разбавленных водных растворов испытывают спонтанные долговременные переходные процессы, причем в начальном, далеком от равновесия состоянии, водный раствор оказывается весьма чувствительным к слабым воздействиям электромагнитной природы [4, 5].

Исследованы комплексные электрические характеристики сильно разбавленных растворов диклофенака в диапазоне частот 20 Гц – 10 МГц [6]. Широкий диапазон частот позволил отделить объемные свойства раствора от поляризационных явлений, связанных с особенностями диффузии ионов в двойном электрическом слое вблизи металлических электродов. Зарегистрирована немонотонная зависимость электропроводности сильно разбавленных водных растворов диклофенака от концентрации при последовательных сотенных разбавлениях, сопровождающихся активным встряхиванием. Немонотонная зависимость наблюдается также при дальнейшем разбавлении растворов по этой технологии. Электропроводность образцов эволюционирует в течение длительного времени хранения образцов причем электропроводность увеличивается, а экстремумы становятся более контрастными. Диэлектрическая проницаемость при этом на частотах 100 кГц – 3 МГц остается постоянной с точностью 0.2%.

Библиографические ссылки

1. Лобышев В.И., Рыжиков Б.Д., Шихлинская Р.Э., Мазурова Т.Н. Self luminescence of water and highly diluted solutions of dipeptides // Биофизика. 1994. Т.39. С.565-570.
2. Lobyshev V.I., Tomkevich M.S. "Optical Diagnostics and Sensing of Biological Fluids and Glucose and Cholesterol Monitoring" // A.V. Priezzev, G.L. Cote, editors, Proc. of SPIE. 2001. Vol.4263. P. 59-64.
3. Лобышев В.И., Томкевич М.С., Петрушанко И.Ю. An experimental study of potentiated aqueous solutions// Биофизика. 2005. Т.50. С. 464-469.
4. Лобышев В.И., Рыжиков Б.Д., Шихлинская Р.Э. Spontaneous and external electromagnetic field-induced long-term transient processes in diluted aqueous tryptophan solutions and water // Биофизика. 1998. Т.43. С.710-716.
5. Lobyshev V.I. "Optical Diagnostics of Biological Fluids IV" // A.V.Priezzev, Toshimitsu Asakura, editors, Proc. of SPIE. 1999. Vol.3599. P. 52-57.
6. Lobyshev V.I. Dielectric Characteristics of Highly Diluted Aqueous Diclofenac Solutions in the Frequency Range of 20 Hz to 10 MHz // Physics of Wave Phenomena. 2019. Vol. 27. P. 119–127.

ФИЗИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОДЫ С УМЕНЬШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ

Лобышев В.И.

Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Биологические эффекты обедненной дейтерием воды (ОДВ) противоречивы, а молекулярные механизмы действия столь малых (природных) концентраций стабильных изотопов не ясны [1-3]. Поэтому важно знать объективные физические свойства ОДВ. Максимальное отличие, наблюдаемое в вязкости тяжелой воды от обычной составляет всего 20%, а содержание дейтерия в природной воде примерно равно 0,015%. Смеси обычной и тяжелой воды можно считать идеальными, а физические характеристики считать линейно зависящими от концентрации дейтерия. В этом случае ожидаемые вариации изотопных эффектов должны лежать в области 0,001%. Существует ряд публикаций о физических свойствах ОДВ сильно отличающихся от свойств обычной воды, однако, к сожалению, они содержат множество технических погрешностей [4, 5].

Гигантский кинетический изотопный эффект (КИЭ) был обнаружен при восстановлении бензохинона в присутствии Os-органических комплексов, содержащих фосфоро-водородные связи, в смеси ацетонитрил-вода (H_2O or D_2O) варьирует от 198 до 455 [6]. Однако, эти реакции очень специфичны и такие КИЭ никогда не регистрировали в биологических системах. В любом случае, кроме КИЭ, необходимо еще учитывать вероятность попадания дейтерия в активный центр ферментативной реакции.

Поскольку большую роль играют диффузионные процессы, нами исследовано набухание семян гороха и сфер из гидрогеля в ОДВ и обычной воде. Используемая ОДВ (ОАО «Алмаз») содержала $D=4\text{ppm}$, $^{18}O=849\text{ppm}$ and $^{17}O=170\text{ppm}$. Электропроводность ОДВ и дистиллированной воды составляла 3.61 and 2.39 $\mu\text{C}/\text{cm}$ при 24°C . Сухие сферы из гидрогеля диаметром около 1 мм помещали в чашки Петри и заливали водой. Через определенные интервалы времени образцы гидрогеля доставали из воды, осушали на фильтровальной бумаге и взвешивали. Затем образцы возвращали в чашки Петри с водой и повторяли эту процедуру через 10 минут. Аналогичная процедура была применена к сухим семенам гороха *Pisum sativum* L. *convar axiphium*. С точностью 1% кривые набухания семян и сфер гидрогеля не различались в ОДВ и обычной воде в течение 2 ч.

Время спин-спиновой релаксации протонов воды было измерено методом спин-эхо ЯМР. В диапазоне концентраций дейтерия 1.5% - 4ppm величина T_2 изменялась от 1888 до 1710 мс в отличие от изменений, опубликованных в [4]. Измерения скорости ультразвука с высокой точностью в диапазоне температур $10-30^\circ\text{C}$ и 4-145 ppm дейтерия подтвердили ожидаемую линейную зависимость без аномального поведения. Заметных изотопных эффектов в вязкости также не обнаружено.

Библиографические ссылки

1. Киркина А.А., Лобышев В.И., Лопина О.Д. др. Isotopic Effects of Low Concentration of Deuterium in Water on Biological Systems // Биофизика. 2014. Т. 59. С. 399-407.
2. Лобышева Н.В. и др. Функциональная активность митохондрий в водной среде с уменьшенным содержанием дейтерия // Биофизика. 2020. Т.65. С. 315-319.
3. Syroeshkin A.V., Antipova N.V., Zlatska A.V. et. al. The effect of the deuterium depleted water on the biological activity // J. of Trace Elements in Medicine. 2018. Vol.50. P. 629-633.
4. Goncharuk V.V. et. al. Physicochemical properties and biological activity of the water depleted of heavy isotopes // J.of Water Chem. Technol. 2011. Vol. 33. P. 8-13.
5. Goncharuk V.V., Kavitskaya A.F., Romanyukina I.Yu., Loboda O.A. Revealing water's secrets: deuterium depleted water // Chem. Central J. 2013. Vol. 7. P. 103-107.
6. Hang My, Huynh V., Meyer T.J. Colossal kinetic isotope effects in proton-coupled electron transfer // PNAS. 2004. Vol.101. P. 13138-13141.

СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ТН-С11 - АНИОННОГО ПРОИЗВОДНОГО ТИОФЛАВИНА Т

Маскевич А.А.¹, Лычагина Ю.А.¹, Луговский А.А.², Лавыш А.В.¹, Воропай Е.С.²,
Глебович Т.С.¹, Степура В.И.¹

¹Гродненский госуниверситет им. Я. Купалы, Гродно, Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

В работе представлены результаты исследований спектральных свойств нового анионного бензтиазолового красителя, производного тиюфлавина Т (ThT), 3-сульфопропил-5-метокси-2-[3-(3,5-диэтил-2-бензотиазолидене)-1-пропиенил]-бензотиазолия (Th-C11) при его различных концентрациях и в растворителях различной полярности и вязкости. Показано, что при концентрации более 10 мкмоль/л краситель существует в виде димеров и более сложных агрегатов. Присутствие в растворе катионного полиэлектролита полиаллиламина (ПАА) в микромолярной концентрации приводит к уменьшению агрегации Th-C11. При низкой концентрации полиэлектролита, когда на одну полярную группу полиэлектролита приходится несколько молекул красителя, имеет место усиление агрегации, причем комплексообразование с полимером снижает концентрацию несвязанного красителя и влияет на динамическое равновесие мономер-димер.

Увеличение полярности растворителя приводит к монотонному гипсохромному сдвигу длинноволновой полосы поглощения, который составляет ~22 нм при переходе от малополярного диоксана к полярному растворителю – воде. Коротковолновый сдвиг спектров поглощения в полярной среде является следствием межмолекулярных взаимодействий молекул хромофора с сольватной оболочкой, в результате которых происходит понижение (стабилизация) энергии основного и возбужденного состояний.

Внесение в водный раствор Th-C11 амилоидных фибрилл (АФ) приводит к значительному батохромному сдвигу спектра поглощения; максимум положения длинноволновой полосы в этом случае соответствует длине волны 589 нм, т.е. является наиболее длинноволновым. При использовании более концентрированного раствора красителя ($1,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л), когда половина его молекул находится в агрегированном состоянии в виде димеров, добавление амилоидных фибрилл приводит к уменьшению оптической плотности полосы, как мономеров, так и димеров. При этом полоса, соответствующая встроенному красителю, имеет то же положение, как и в случае красителя при невысокой концентрации. Это означает, что при встраивании в АФ димеры разрушаются, как и в случае микромолярной концентрации ПАА. Краситель встраивается в АФ в мономерной форме.

В отличие от молекул ThT, являющегося катионом [1], молекулы Th-C11 содержат отрицательно заряженную сульфогруппу. Тем не менее, судя по изменению спектра поглощения и увеличению (~ в 25 раз) квантового выхода флуоресценции, мы наблюдаем эффективное встраивание красителя в структуру фибрилл, т.е. кулоновские взаимодействия не являются основным фактором, влияющим на встраивание.

Полученные результаты показывают возможность использования нового красителя как эффективного флуоресцентного маркера, чувствительного к полярности и вязкости микроокружения и обладающего длинноволновой полосой поглощения и флуоресценции в красной области спектра.

Библиографические ссылки

1. Stsiapura V.I., Maskevich A.A., Kuzmitsky V.A., Uversky V. N., Kuznetsova I. M., Turoverov K.K. Thioflavin T as a Molecular Rotor: Fluorescent Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Viscosity // J. Phys. Chem. B. 2008. Vol. 112. P. 15893-15902.

NBD-ТРИМЕТАЗИДИН И NBD-ВАНИЛИН: ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *IN SILICO*

Мелеховец Е.В.², Фалетров Я.В.^{1,2}, Фролова Н.С.¹, Шкуматов В.М.^{1,2}

¹НИИ Физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь;

²Химический факультет, БГУ, Минск, Беларусь

Триметазидин (1-(2,3,4-триметоксибензил)-пиперазин) является действующим веществом лекарства для лечения стенокардии, а также применим для экспериментального моделирования паркинсонизма [1]. По своей структуре и свойствам (замещенный пиперазин, липофильный амин) он напоминает вещества с лизосомотропными свойствами, например флуоресцентное соединение NBD-пиперазин (7-нитробензофуразан-4-ил-пиперазин) [2] и его производные, используемые как маркеры лизосом или сайтов генерации H₂S [3]. Следовательно, было решено получить NBD-триметазидин через взаимодействие NBD-хлорида и триметазида. Полученное соединение, флуоресцирующее при облучении ультрафиолетовым светом 365±50 нм, охарактеризовано при помощи ТСХ (R_f=0,12, силикагель, элюент бензол : этилацетат (4:1 v:v)), масс-спектрометрии ([M+H]⁺ с m/z=430,20), спектрофотометрии (максимумы поглощения при 270, 344 и 484 нм) и флуориметрии (максимум эмиссии при 548 нм в метаноле). Экспериментально показано тушение флуоресценции этого соединения при взаимодействии с HOCl. Анализ литературы и расчеты *in silico* выявили возможные белки-мишени NBD-триметазида и триметазида, среди которых дофаминовые рецепторы и белки лизосом.

Также было получено другое соединение – NBD-гидразин-ванилин (2-метокси-4-((2-(7-нитробензо[с][1,2,5]оксадиазол-4-ил)гидразино) метил)фенол) путем взаимодействия NBD-гидразина и ванилина, которое содержит фрагмент C₆H₅OCH₃. Полученное соединение малинового цвета было охарактеризовано при помощи ТСХ (R_f=0,9, силикагель, элюент толуол : этанол (4:1 v:v)), масс-спектрометрии ([M-H]⁻ с m/z=427,95), спектрофотометрии (максимумы поглощения при 335 и 510 нм). Взаимодействие с HOCl приводит к уменьшению поглощения на длине волны 510 нм.

Таким образом, получены два новых NBD-производных, обладающих физико-химическими свойствами, указывающими на пути их возможного использования для биологических и биохимических исследований.

Работа выполнена в рамках выполнения заданий ГПНИ «Химические технологии и материалы, подпрограмма «Биологически активные вещества» (№№ г.р. 20190221 и 20161380).

Библиографические ссылки

1. Dym A.M.B., Limjoco L.L.G., Jamora R.D.G. Trimetazidine-Induced Parkinsonism: A Systematic Review // Front Neurol. 2020. Vol. 11. P. 44.
2. Ishiguro K. et al. Novel application of 4-nitro-7-(1-piperazinyl)-2,1,3-benzoxadiazole to visualize lysosomes in live cells // BioTechniques. 2008. Vol. 45. P. 465-468.
3. Ismail I., Chen Z., Ji X. A Fast-Response Red Shifted Fluorescent Probe for Detection of H₂S in Living Cells // Molecules. 2020. Vol. 25. P. 437.

ВЛИЯНИЕ СУЛЬФАНИЛАМИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННОЙ CF_1 -АТФАЗЫ ХЛОРОПЛАСТОВ ШПИНАТА

Онойко О.Б., Хомочкин А.П., Михайленко Н.Ф., Золотарева Е.К.

Институт ботаники им. М. Холодного НАН Украины, Киев, Украина

Сульфаниламидные препараты являются важным классом соединений, которые стали первыми антибактериальными средствами системного использования, ставшего началом революции антибиотиков в медицине. Из-за их низкой стоимости, низкой токсичности и высокой активности против бактериальных заболеваний они до сих пор широко используются в качестве противомикробных средств. Механизм бактерицидного действия сульфаниламидов основан на структурном сходстве с п-аминобензойной кислотой, конкурируя с которой они препятствуют синтезу пиримидиновых оснований, необходимых для синтеза ДНК и РНК. Среди 15000 производных сульфаниловой кислоты, синтезированных на сегодня, обнаружены соединения с противораковым, противомалярийным, противовирусным, противосудорожным действием, химиотерапевтический эффект которых связывают с их способностью ингибировать множественные формы карбоангидраз (КА), присутствующих в различных тканях и органах животных и человека [1]. Так, ингибиторами карбоангидразы являются популярные сульфаниламидные диуретики (диакарб, фуросемид, индапамид), офтальмологические препараты (бринзоламид, дорзоламид), некоторые противораковые средства. Ранее мы нашли, что сульфаниламидные ингибиторы карбоангидразы - ацетозоламид и этоксизоламид практически полностью подавляют АТФазную активность каталитической части АТФсинтазы хлоропластов – фактора CF_1 [2]. Учитывая высокую степень структурного сходства хлоропластных, бактериальных и животных митохондриальных АТФаз, более глубокое изучение этого эффекта может иметь значение при установлении механизмов действия сульфаниламидных препаратов на живой организм. В данной работе изучалось влияние 4-аминобензолсульфаниламида (СА, стрептоцида), трифторметансульфаниламида (ТФМСА), индапамида и фуросемида на латентную и стимулированную АТФазную активность CF_1 -АТФазы, изолированной из хлоропластов шпината. Хлоропластная CF_1 -АТФаза является латентным ферментом, для проявления активности которого нужны специальные обработки. В работе стимуляция АТФазной активности достигалась путем 1) непродолжительного прогрева фермента при 62°C; или 2) инкубацией с 20% метанолом; или 3) добавлением к реакционной среде сульфита натрия до концентрации 25 мМ. ТФМСА эффективно подавлял АТФазную активность энзима при всех типах активации. В случае тепловой обработки I_{50} (ТФМСА) составляла около 5 мкМ, а при активации сульфитом или метанолом - около 1 мкМ. СА и фуросемид совсем не влияли на АТФазную активность при наличии в среде сульфита, а в случае активации фермента нагреванием или метанолом ингибировал ее значительно слабее, чем ТФМСА: величина I_{50} (СА) в этом случае составляла около 50 мкМ. Добавление исследуемых ингибиторов в реакционную среду с латентным (неактивированным) ферментом не вызывало никакого эффекта при СА и приводило к активации АТФазной реакции примерно в 6 раз при добавлении 50-300 мкМ ТФМСА. Поскольку все изученные сульфаниламиды известны как ингибиторы КА, их влияние на АТФазу хлоропластов может быть связано с ее КА активностью, о вероятном участии которой в функционировании АТФазы сообщалось ранее [2].

Библиографические ссылки

1. Supuran C. T. Carbonic Anhydrases // Nature rev. Drug discov. 2008. Vol. 7, №2. P.168.
2. Khomochkin A.P. et al. Reversible pH-dependent activation/inactivation of CF_1 -ATPase // Ukr. Biochem. J. 2017. Vol. 89. P. 43-48.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА СВОБОДНЫЕ И ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

Панкова С.М., Нехаев И.С., Дьяченко П.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Защита от негативных эффектов ультрафиолетового излучения является значимой проблемой современной медицины. Накоплены сведения о влиянии УФ-лучей на различные структуры кожи, изучены механизмы развития дерматозов, чувствительных к ультрафиолетовому облучению. В связи с этим исследование веществ, обладающих фотопротекторными свойствами, весьма актуально. В качестве такого агента могут выступать хитозаны и их производные. Целью экспериментов было изучение влияния ультрафиолетового излучения на фотомодуляцию ферментативной активности протеаз, как свободных, так и иммобилизованных на матрице хитозана.

В качестве объектов исследования были выбраны трипсин быка фирмы “MP biomedical”, коллагеназа, фицин, папаин, бромелин фирмы «Sigma-Aldrich», субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Sigma-Aldrich», носителями для иммобилизации – два вида хитозана, синтезированных ЗАО «Биопрогресс»: пищевой хитозан и сукцинат хитозана. Иммобилизацию протеаз осуществляли адсорбционным методом [1]. Определение количества белка в препаратах и их активности проводили модифицированным методом Лоури [1]. УФ-облучение растворов свободных и иммобилизованных протеаз проводили с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240–390 нм. Дозы облучения составляли: 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м². Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением *t*-критерия Стьюдента при $p < 0.05$.

В результате проведенного исследования было выявлено, что каталитическая активность молекул свободных ферментов под воздействием УФ-света подвержена изменению в большей степени, чем в иммобилизованном состоянии. Инактивация свободных протеаз происходит при использовании доз 1510 и 3020 Дж/м², активность трипсина и папаина снижается на 30%, фицина – на 10%, наиболее устойчивыми к действию УФ-излучения оказались бромелин и коллагеназа их каталитическая способность снижается на 8 и 3% соответственно. Таким образом, по степени fotocувствительности протеазы можно расположить в следующий ряд: коллагеназа → бромелин → фицин → папаин → трипсин. При действии УФ-излучения на иммобилизованные препараты ферментов снижение активности зарегистрировано при использовании доз облучения 4530 и 6040 Дж/м². Следовательно, иммобилизация на матрице хитозана приводит к повышению стабильности гетерогенных биокатализаторов по отношению к действию УФ-света по сравнению со свободными энзимами. Наше исследование свидетельствует о фотопротекторном эффекте матрицы хитозана, который может быть обусловлен следующими причинами: молекулы ферментов при взаимодействии с матрицей хитозана образуют фоторезистентные комплексы; молекулы хитозана экранируют активные фотопродукты свободнорадикальной природы, предотвращая фотоокисление определенного числа аминокислот изученных ферментов при воздействии УФ-облучения.

Библиографические ссылки

1. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С. Разработка методики получения гетерогенного биокатализатора на основе трипсина // *Фундамент. исслед.* 2013. Т. 11 (часть 3). С. 484–487.

КОМПЛЕКСЫ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА С ПОРФИРИНАМИ – МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В БИОСТРУКТУРАХ ПРИ ФДТ

**Пархоц М.В.¹, Кнюкшто В.Н.¹, Закоян А.А.², Мкртчян Л.В.², Гюльханданян А.Г.²,
Симонян Г.М.², Гюльханданян Г.В.², Джагаров Б.М.¹**

¹*Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Институт биохимии НАН Армении, Ереван, Армения*

Метод фотодинамической терапии (ФДТ) уже давно вошел в клиническую практику как метод лечения онкологических и некоторых других заболеваний. Несмотря на это, многие фотофизические и фотохимические процессы, происходящие при проведении ФДТ, до сих пор остаются до конца неизученными. При фотовозбуждении фотосенсибилизатора (ФС) запускаются реакции, которые могут приводить к разрушению не только опухолевых клеток, но и других биоструктур, находящихся в непосредственной близости от ФС. Кроме того, при связывании ФС с биологическими объектами, фотофизические свойства ФС могут изменяться. В нашей работе в качестве модельной системы был выбран церулоплазмин – один из белков плазмы крови, который может выступать в качестве носителя ФС. Этот медьсодержащий белок играет существенную роль в метаболизме железа, обладает антиоксидантным действием и уже используется в клинических условиях для лечения некоторых, в том числе онкологических заболеваний.

Целью нашей работы было исследовать связывание фотосенсибилизаторов на основе порфиринов с церулоплазмином и изучить фотофизические процессы, происходящие при фотовозбуждении такой системы. Церулоплазмин был получен из плазмы донорской крови с использованием методов гель фильтрации и ионно-обменной хроматографии. В качестве ФС использовались цинковый катионный металлопорфирин *Zn-мезо-тетра-[N-оксиэтил-4-пиридил]порфирин* ($ZnTOEt4PyP$) и его безметалльный аналог $TOEt4PyP$. Все исследования проводились в 0.01 М Na-фосфатном буфере pH 7.2.

На основании полученных спектральных и кинетических характеристик исследуемых образцов установлено, что $ZnTOEt4PyP$ и его безметалльный аналог $TOEt4PyP$ образуют нековалентные комплексы с церулоплазмином. При образовании комплекса для металлопорфирина $ZnTOEt4PyP$ наблюдается смещение полос поглощения на ~4-6 нм в длинноволновую область, при этом спектр флуоресценции изменяется незначительно. Такие изменения характерны для порфиринов при их взаимодействии с белками и обусловлены изменением микроокружения порфирина при встраивании в белковую глобулу. При образовании комплекса $TOEt4PyP$ с церулоплазмином происходит более сильная трансформация спектров поглощения и флуоресценции, которая может быть связана как с встраиванием иона металла в порфириновый макроцикл, так и с образованием дикатиона порфирина. Проведенные исследования спектральных характеристик и сравнительный анализ данных для $CuTOEt4PyP$, $ZnTOEt4PyP$ и дикатиона $TOEt4PyP$ показали, что наиболее вероятным является встраивание иона Zn (который присутствует на поверхности церулоплазмина) в порфириновый макроцикл $TOEt4PyP$. Необходимо также отметить, что при взаимодействии с белком наблюдается сильное тушение флуоресценции порфиринов, которое, по-видимому, связано с переносом электрона с Zn-порфиринов на ионы Cu, переносчиком которых является церулоплазмин. Обнаружено также, что для комплексов порфиринов с церулоплазмином наблюдается падение квантового выхода образования синглетного кислорода и сокращение его времени жизни.

Таким образом, установлено, что процессы, происходящие при фотовозбуждении комплексов порфиринов с церулоплазмином, могут существенно изменить фотодинамическую активность исследуемых ФС.

ТЕРМОИНДУЦИРОВАННЫЙ СИНТЕЗ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ИНФИЦИРОВАННЫХ ГРИБОМ *BIPOLARIS SOROKINIANA* РАСТЕНИЯХ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ

Пашкевич Л.В.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Фенольные соединения являются одними из самых распространенных продуктов вторичного метаболизма у растений. Растения используют фенольные соединения для пигментации, роста, размножения, устойчивости к патогенам и многих других функций. На присутствие фенольных метаболитов в растениях большое влияние оказывают условия окружающей среды, а также генетический контроль [1].

Фенольные соединения замедляют рост патогенных грибов, реагируя с белками и вызывая потерю их ферментативной активности. Более того, они ограничивают жизнеспособность патогенов и могут откладываться внутри клеточной стенки в качестве первой линии защиты [2].

Тепловую обработку растений ячменя сорта Магутны проводили в 5-дневном возрасте в течение 3 ч при 40°C. 5-дневные зеленые проростки ячменя инокулировали спорами гриба *Bipolaris sorokiniana* путем опрыскивания споровой взвесью, содержащей 10^6 спор/мл. Содержание водорастворимых фенольных соединений определяли спектрофотометрически по Запрометову [3].

В наших экспериментах установлено, что грибное заражение вызывало увеличение содержания фенолов в растениях ячменя на 9-18 % в течение 1-3 суток с момента инокуляции спорами. Воздействие кратковременной гипертермии на 1-е сутки вызывало более сильный всплеск образования фенолов в растениях ячменя по сравнению с инфицированием (15% против 9%), при этом на 3 сутки после воздействия наблюдался спад в образовании фенольных соединений, связанный с прекращением действия данного фактора и нормализацией баланса вторичных метаболитов. При этом зараженные растения на фоне кратковременной гипертермии уже в течение первых 24 часов и в последующие двое суток после стрессовых воздействий показали более высокий уровень фенолов (на 15-24% выше контроля) по сравнению с аналогичным вариантом без гипертермии (9-18%).

Полученные результаты позволяют предположить, что посредством термоиндукции происходит усиление защитных механизмов в зараженных грибом *Bipolaris sorokiniana* растениях, что отражается в активации биосинтеза водорастворимых фенолов уже на первых стадиях инфицирования.

Библиографические ссылки

1. Russell WR, Labat A, Scobbie L, Duncan GJ, Duthie GG. Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland // Food Chemistry. 2009. Vol. 115. P. 100–104.
2. Mikulic-Petkovsek M., Schmitzer V., Stampar F., Veberic R., Koron D. Changes in phenolic content induced by infection with *Didymella applanata* and *Leptosphaeria coniothyrium*, the causal agents of raspberry spur and cane blight // Plant pathology. 2014. Vol. 63. P. 185-192.
3. Запрометов, М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. Москва : «Высшая школа», 1974. 214 с.

КАЛЬЦИЕВЫЕ ОСЦИЛЛЯЦИИ В ОДИНОЧНЫХ ТРОМБОЦИТАХ

Пашенко И.А.¹, Балабин Ф.А.², Пантелеев М.А.², Свешникова А.Н.¹

¹Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Физический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 2

²Центр Теоретических Проблем Физико-химической Фармакологии РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, д. 4

Кальциевая сигнализация представляет собой систему химических реакций клетки, передающую информацию о возбуждении (активации клетки) путем повышения концентрации свободных ионов кальция в цитозоле клетки, чаще всего носящей осцилляторный характер. Для безъядерных клеток крови тромбоцитов кальциевая сигнализация играет центральную роль в процессе активации, происходящем при контакте тромбоцита с поверхностью поврежденного сосуда и приводящей к образованию тромбоцитарного агрегата. При активации тромбоцита концентрация кальция в цитозоле изменяется осцилляторно, при этом есть предположение, что интенсивность осцилляций возрастает с увеличением концентрации активатора [1,2]. Целью настоящей работы было проведение анализа полученных в эксперименте кальциевых ответов одиночных тромбоцитов на несколько видов активации и количественная характеристика различий между ними. Получение экспериментальных данных проводилось по стандартной методике, описанной в работе [1]. Были получены зависимости концентрации кальция в цитозоле одиночных тромбоцитов от времени до и после активации коллагеном, тромбином или АДФ на нейтральной или активирующей подложке. Анализ проводился на Python 3. В результате работы показано, что частота и форма осцилляций концентрации кальция недостаточно регулярны для непосредственного применения спектрального анализа Фурье. Для анализа осцилляций была применена статистическая обработка сигнала, включающая применение пороговых значений кальция и анализа разброса расстояний между соседними пиками и амплитуд пиков кальция. В результате показано, что для базовой активации и активации коллагеном распределение расстояния между пиками следует распределению Пуассона. Работа поддержана грантами РФФИ 17-00-00138 и 18-34-20026.

Библиографические ссылки

1. Балабин Ф. А. и др.. Кластеризация рецепторов к инозитолтрифосфату определяет форму пика осцилляций кальция в цитозоле тромбоцита // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика, астрономия. 2018. Т. 2018, № 5. С. 63-70.
2. Шахиджанов С. С. и др.. Кальциевые осцилляции в тромбоцитах крови и их возможная роль в "интерпретации" клеткой информации из внешнего мира // Успехи физических наук. 2019. Т. 189, № 7. С. 703-719.

NBD-ДИПИКОЛИЛАМИН КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИНГИБИТОР Zn^{2+} -СОДЕРЖАЩИХ ФЕРМЕНТОВ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *IN SILICO*

Позняк Г.И.², Фалетров Я.В.^{1,2}, Шкуматов В.М.^{1,2}

¹НИИ Физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь;

²Химический факультет, БГУ, Минск, Беларусь

Дипикколиламин способен образовывать хелатные комплексы с ионами металлов, в частности, Zn^{2+} , вследствие чего он часто встречается в структурах хромогенных и флуорогенных молекулярных инструментов (проб, зондов) для их регистрации в биосистемах [1]. С другой стороны, Zn^{2+} -содержащие металл-содержащие бета-лактамазы являются ферментами бактерий, опосредующих их устойчивость к бета-лактамам антибиотикам (пенициллины и цефалоспорины). Таким образом, N-гетероциклические соединения, способные образовывать прочные координационные связи с Zn^{2+} могут быть интересны как потенциальные ингибиторы этих ферментов. 7-нитробензофуразан-4-ил-(NBD-) производное дипикколиламина (NBD-DPA) было получено в нашей лаборатории путем взаимодействия NBD-Cl и дипикколиламина. Полученное соединение флуоресцировало при облучении ультрафиолетовым светом 365 ± 50 нм и было охарактеризовано при помощи ТСХ ($R_f=0,2$, силикагель, элюэнт хлороформ) и масс-спектрометрии ($[M+H]^+$ с $m/z=363,10$ для $C_{18}H_{14}N_6O_3$). Для оценки возможности образования координационных связей с ионами цинка бета-лактамаз было проведено компьютерное моделирование связывания NBD-DPA с этими ферментами с использованием программы Autodock Vina [2]. Определено, что NBD-DPA может эффективно связываться вблизи цинк-содержащих центров ~200 бета-лактамаз бактерий. Рассчитанные энергии связывания (E_{bind}) составили диапазон от -10,7 до -6 ккал/моль. Эффективное связывание ($E_{bind} = -10,7 - -9$ ккал/моль) было показано для ряда белков, причем расстояние от атомов цинка до атомов азота пиридиновых или оксадиазольного цикла не более 0,4 нм было показано для 14 и 46 белков, соответственно. Среди таких белков, например, с кодами pdb 6q5a (CPSF3 из *Cryptosporidium hominis*), 5dpx (L1 из *Stenotrophomonas maltophilia*), 5A0T (*Streptomyces coelicolor*), 5ls3 (IMP1 из *Pseudomonas aeruginosa*), 1x8g (карбапенемаза CphA from *Aeromonas Hydrophyla*).

Так, расчетно-теоретическим способом показана перспектива использования дипикколиламиновых производных в качестве ингибиторов Zn^{2+} -содержащих бета-лактамаз, что является основанием для дальнейшей экспериментальной проверки NBD-DPA и схожих азол-содержащих направленно сконструированных соединений, используя опыт лаборатории биохимии лекарственных препаратов по получению NBD-производных и исследованию металлоферментов [3, 4].

Работа выполнена в рамках выполнения заданий ГПНИ «Химические технологии и материалы, подпрограмма «Биологически активные вещества» (№№ г.р. 20190221 и 20161380).

Библиографические ссылки

1. Jiang W. [et al.] An NBD fluorophore-based sensitive and selective fluorescent probe for zinc ion // Chem Commun (Camb). 2008. Vol. 2. P. 259-261.
2. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function // J Comput Chem. 2010. Vol. 31. P. 455-461.
3. Faletrov Y.V., Brzostek A., Plocinska R. et al. Uptake and Metabolism of Fluorescent Steroids by Mycobacterial Cells // Steroids. 2017. Vol. 117. P. 29-37.
4. Faletrov YV, Frolova NS, Hlushko HV et al. Evaluation of the Fluorescent Probes Nile Red and 25-NBD-cholesterol as Substrates for Steroid-Converting Oxidoreductases Using Pure Enzymes and Microorganisms // FEBS J. 2013. Vol. 280. P. 3109-3119.

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ В КЛЕТКАХ ЛИСТЬЕВ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ДЕЙСТВИЮ ФИТОПАТОГЕНОВ

**Смирнов А.А., Кабачевская Е.М., Гапеева Т.А., Мисюкевич А.Ю., Суховеева С.В.,
Вологовский И.Д.**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Картофель – одна из самых востребованных сельскохозяйственных культур в мире. В мировой экономике картофель занимает 4 место по объему производства, уступая только кукурузе, рису и пшенице [1]. На территории Республики Беларусь ежегодно производится порядка 6 млн. тонн картофеля, а в мировом рейтинге Беларусь занимает 11 место. Ежегодно инфекционные заболевания картофеля наносят ущерб его урожайности и, как следствие, национальной экономике. Несмотря на развитие профилактических и прямых мер борьбы с фитопатогенными организмами, такими, например, как фитофтороз, сильные вспышки болезни с потерями 30-50% урожая наблюдаются через каждые 2-3 года [2].

Как следствие, изучение механизмов формирования устойчивости растений картофеля к грибковым и бактериальным заболеваниям является актуальной научной задачей. Особый интерес представляет изучение экспрессии генов, кодирующих ферменты-участники метаболизма коричных кислот в условиях развития фитопатогенной инфекции. Коричная кислота (КК) и ее производные выполняют в растительном организме ряд важных функций, включая защитную, структурную, энергетическую. Важнейшими ферментами метаболизма данных соединений являются фенилаланин-аммиак-лиаза (PAL), тирамин-N-гидроксициннамойлтрансфераза (ТНТ) и циннамат-4-гидроксилаза (С4Н). PAL катализирует реакцию образования собственно КК - предшественника всех фенилпропаноидов; С4Н превращает КК в кумаровую кислоту; ТНТ кодирует образование амидов оксикоричных кислот.

Целью данного исследования являлась оценка базального уровня экспрессии *PAL*, *ТНТ*, *С4Н* в растениях картофеля сортов белорусской селекции («Одиссей», «Ветразь», «Карсан», «Скарб», «Гармония»), различающихся по устойчивости к различным фитопатогенам (ризоктониоз, черная ножка, парша, фитофтороз). В рамках исследования были осуществлена разработка и синтез ген-специфических праймеров для оценки экспрессии изучаемых генов, секвенирование ампликонов, полученных с использованием созданных праймеров, а также постановка ПЦР в реальном времени с образцами кДНК, синтезированными на основе общей РНК вышеперечисленных сортов картофеля, и праймерами, соответствующими исследуемым генам. В ходе проведенного исследования были определены базальные уровни относительной экспрессии генов *PAL*, *ТНТ*, *С4Н* в образцах картофеля исследованных сортов.

Обсуждается возможное участие исследуемых генов ферментов метаболизма КК в формировании устойчивости картофеля к фитопатогенным инфекциям.

Библиографические ссылки

1. FAOSTAT [Electronic resource] : Food and agriculture organization of the united nations statistics division. – Mode of access: [http:// faostat.fao.org/site/339/default.aspx](http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx). – Date of access: 10.04.2020.
2. Фитофтороз картофеля – Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://belbulba.by/fitoftoroz-kartofelya/> – Дата доступа: 10.04.2020.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ СКОРОСТЕЙ ФОТОПРОЦЕССОВ В БИОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫХ МЕТАЛЛОПОРФИРИНАХ МЕТОДОМ РЕШЕНИЯ ОБРАТНОЙ ФОТОКИНЕТИЧЕСКОЙ ЗАДАЧИ

Станишевский И.В., Арабей С.М.

Белорусский государственный аграрный технический университет, Минск, Беларусь

Изучение процессов динамики активации-деактивации синглетных и триплетных электронных уровней биологически важных молекул и путей релаксации энергии фотовозбуждения является основой получения новых фундаментальных знаний о фотофизических и фотохимических процессах в биосистемах и возможной утилитарности.

Кинетика флуоресценции ряда металлокомплексов тетрабензо- и октаэтилпорфиринов (Mg-ТБП, Zn-ТБП, Zn-(*tBu*)₄-ТБП, Zn-ОЭП), внедренных в полимерные пленки, изучалась при комнатной температуре с применением оригинальных экспериментальных методик и приемов компьютерного моделирования, описанных в [1,2]. Численное моделирование с минимальными упрощениями и допущениями проведено в соответствии с поэтапной методологией формально-кинетического подхода к решению обратной фотокинетической задачи (ОФКЗ) [3]. ОФКЗ сводилась к нахождению таких значений расчетных кинетических параметров, при которых достигалось наилучшее в статистическом смысле описание экспериментальных данных в рамках выбранной гипотетической модели фото процессов и соответствующей системы дифференциальных уравнений.

Флуоресценция образцов возбуждалась последовательностью периодических прямоугольных двухступенчатых импульсов, генерируемых лазерным диодом. На начальном этапе находились характеристические времена некоторых стадий кинетики флуоресценции порфиринов [4]. На этапе оценки параметров (оптимизации констант скоростей фото процессов) экспериментальные немонотонные кинетики целиком аппроксимировались модельными с помощью итерационных методов так, чтобы функции рассогласования между ними принимали минимально возможные значения. Минимизация проводилась методом безградиентной оптимизации Нелдера-Мида [5].

Расчеты позволили выбрать наиболее правдоподобную модель взаимной фототрансформации двух спектральных форм флуорофоров и доказательно интерпретировать экспериментально получаемые сложные кинетики флуоресценции. Обратимые фото превращения тетрапиррольных металлокомплексов происходят в нижних триплетных возбужденных электронных состояниях и обусловлены процессами присоединения-отрыва мобильных аксиальных экстралигандов (компоненты или примеси полимерной матрицы) центрального атома металла.

Методология выполненных исследований является в значительной степени пионерской, поскольку связана с применением оригинальных алгоритмов и программ, позволивших решить ОФКЗ с минимальными упрощениями модели.

Библиографические ссылки

1. Станишевский И.В., Павич Т.А., Арабей С.М. Исследование изменения лигандного состава хелата Eu^{3+} методами двухступенчатого лазерного возбуждения люминесценции и компьютерного моделирования кинетики // Опт. спектроск. 2019. Т. 126. С. 133–139.
2. Станишевский И.В., Арабей С.М. В сборнике: Материалы XII Международной научно-технической конференции «Квантовая электроника», Минск: «РИВШ». 2019. С.64–66.
3. Димитров В.И. Простая кинетика. Сибирское отд. Новосибирск: «Наука». 1982. С. 382.
4. Provencher S.W. A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations // Comp. Phys. Commun. 1982. Vol. 27. P. 213–227.
5. Nelder J.A., Mead R. A Simplex Method for Function Minimization // Computer Journal. 1965. Vol.7. P.308.

ПОИСК НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ИНДОЛАМИН 2,3-ДИОКСИГЕНАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА

Старовойтова В.А.², Фалетров Я.В.^{1,2}, Шкуматов В.М.^{1,2}

¹НИИ Физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь

²Химический факультет БГУ, Минск, Беларусь

Индоламин 2,3-диоксигеназа (ИДО) представляет собой гем-содержащий фермент, физиологически экспрессируемый в ряде тканей и клеток, таких как тонкая кишка, легкие, половые пути женщины или плацента. Катализирует O₂-зависимое окисление L-триптофана в N-формилкинуренин. Окисление триптофана по кинурениновому пути играет важную роль в регуляции иммунного ответа. Было показано, что при некоторых видах рака повышается экспрессия ИДО, что способствует развитию иммуносупрессивного окружения и тем самым препятствует противоопухолевому иммунному ответу. Поэтому ингибиторы ИДО перспективны для комбинации с другими средствами терапии раковых заболеваний [1]. Поиск новых потенциальных ингибиторов ИДО является важной задачей в связи с высокой смертностью от раковых заболеваний (более 2 000 000 смертей в год по всему миру). Исходя из этого, было решено провести виртуальный скрининг соединений на предмет взаимодействия с ИДО методом молекулярного докинга с использованием программ AutoDock Vina и PyRx [2]. Для расчетов выбрали структур ИДО с кодом PDB 2d0t (цепь A) и около 1000 лигандов различных белков из этой же базы данных, содержащих структурные фрагменты индола, аллиламина, пропаргиламина, имидазола, тетразола и триазола. Значения рассчитанных энергий связывания (E_{bind}) протестированных лигандов с ИДО находятся в пределах от -12 до 0 ккал/моль. Большая аффинность связывания вблизи гема показана, например, для триазол-хинолин-содержащего ингибиторов c-Met киназы (код белка_код лиганда, E_{bind} (ккал/моль) - 3ZBX_6XE, -11,6 и 5EOB_5QQ, -12), триазол-пиримидинового лиганда белка p38alpha (3KF7_L9G, -11,3), карбазольного ингибитора полимеризации тубулина (6H9B_FWH, -11.1). Среди акрил-содержащих соединений выявлены ингибитор киназ Jak3 (4QPS_37Q, -10) и PKA (6FRX_E3Z, -10). Так, проведенный виртуальный скрининг позволил выявить потенциал ряда соединений, в т.ч. противоопухолевых, как ингибиторов ИДО, что может быть полезно для интерпретации их биологических эффектов и разработки новых улучшенных противораковых лекарств.

Работа выполнена в рамках выполнения заданий ГПНИ «Химические технологии и материалы, подпрограмма «Биологически активные вещества» (№ г.р. 20190221).

Библиографические ссылки

1. Günther J., Däbritz J., Wirthgen E. Limitations and off-target effects of tryptophan-related IDO inhibitors in cancer treatment // Front Immunol. 2019. Vol. 10. P. 1-8.
2. Lee A., Saito E., Ekins S., McMurtray A. Extracellular binding of indinavir to matrix metalloproteinase-2 and the alpha-7-nicotinic acetylcholine receptor: implications for use in cancer treatment // Heliyon. 2019. Vol. 5. P. 1-4.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СЕНСОРЫ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ТИОФЛАВИНА Т

Степура В.И.¹, Гоголева С.Д.¹, Лавыш А.В.¹, Маскевич А.А.¹, Луговский А.А.²,
Тихомиров С.А.³, Буганов О.В.³, Baruah K.⁴, Sarma B.–K.⁴

¹Гродненский госуниверситет им. Я. Купалы, Гродно, Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

³Институт физики им. Б.И. Степанова, Минск, Беларусь

⁴Shiv Nadar University, Dadri, Uttar Pradesh, India

Широко известно, что образование нерастворимых фибриллообразных агрегатов белков, так называемых амилоидных фибрилл (АФ), связано с нарушениями в процессе фолдинга белковых макромолекул и сопутствует ряду нейродегенеративных заболеваний. Определение концентрации АФ *in vitro* часто производится флуоресцентным методом с использованием зонда тиюфлавина Т (ThT), проявляющего свойства флуоресцентного молекулярного ротора (ФМР) [1]. Под ФМР понимают молекулы, для которых характерна сильная зависимость квантового выхода флуоресценции от вязкости микроокружения вследствие протекания в возбужденном состоянии конформационных изменений, в частности взаимного поворота молекулярных фрагментов, сопровождаемого переносом заряда (ТИСТ-процесс).

Нами изучены флуоресцентные свойства ряда бензотиазол-анилиновых производных ThT, отличающихся наличием метильных и метоксильных заместителей при атомах азота аминогруппы и бензотиазольного цикла, а также в 6-ом положении бензотиазола. Обнаружено, что важным фактором, влияющим на величину усиления интенсивности флуоресценции при связывании с АФ является наличие метильной группы при атоме азота бензотиазола. Производные с N-метилированным бензотиазолом (ThT, KB-06, N-Me-BTA-2) находятся в катионной форме при нейтральных значениях pH и рост интенсивности при связывании с АФ составляет ~3 порядка. Производные с деметилированным атомом азота бензотиазола (BTA-0, BTA-1, BTA-2 и 6-Me-BTA-2) характеризуются более низким коэффициентом усиления интенсивности флуоресценции (~100 раз) при связывании с АФ и проявляют сенсорные свойства при низких pH [2]. Были оценены пределы обнаружения АФ из инсулина, которые оказались равными LOD(АФ)~ 0.05 нг/мкл при использовании ThT и KB-06 в качестве сенсоров. Сопоставление результатов измерений квантовых выходов и кинетики флуоресценции для производных ThT в одинаковых экспериментальных условиях позволяет выявить влияние молекулярной структуры и природы заместителей на величину константы скорости безызлучательного процесса дезактивации возбужденного состояния. По мере увеличения размера фрагментов (если введение заместителей не влияет существенно на π-электронную систему хромофора, а также на донорные и акцепторные свойства фрагментов, например для ряда N-Me-BTA-2, ThT, KB-06,) скорость ТИСТ- процесса замедляется. Данная информация важна для осуществления направленного синтеза флуоресцентных зондов на основе ФМР с заданными свойствами и позволяет подстраивать параметры чувствительности флуоресценции зондов для разных диапазонов микровязкостей. Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант Ф17ИНДГ-008) и программы Конвергенция (задание 3.04).

Библиографические ссылки

1. Stsiapura, V.I., et al., Thioflavin T as a Molecular Rotor: Fluorescent Properties of Thioflavin T in Solvents // J Phys Chem B. 2008. Vol. 112. P. 15893-15902.
2. Gogoleva, S.D., et al., Neutral derivatives of Thioflavin T do not exhibit viscosity-dependent fluorescence // J Photochem Photobiol A.: Chem. 2018. Vol. 358. P. 76-91.

ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ РИБОФЛАВИНОМ ОКИСЛЕНИЕ ТИАМИНА И тиаминдифосфата в ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ УЛЬТРАФИОЛЕТА И ВИДИМОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Степура И.И.¹, Агейко С.А.¹, Степура В.И.², Травкина М.³, Янцевич А.В.³

¹*Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Беларусь, scepura@gmail.com*

²*Гродненский государственный университет им Я. Купалы, Гродно, Беларусь*

³*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Известно, что в метаболизме роговицы и хрусталика глаза преобладает фосфоглюконатный окислительный путь, в котором ключевую роль играет тиаминзависимый фермент – транскетолаза. В связи с этим важное значение приобретает исследование механизмов обеспечения защиты тиамин-зависимых ферментов в системах глаза от повреждения в условиях интенсивного облучения ультрафиолетовым (UV) и видимым светом, способным генерировать активные формы кислорода и азота.

Спектрально-люминесцентными и хромато-масс-спектроскопическими методами исследовались продукты окислительных превращений тиамин-зависимых ферментов под действием UV и видимого света и влияние фотосенсибилизаторов на стабильность водных растворов тиамин-зависимых ферментов.

Мы показали, что под действием ультрафиолета UVA (область 315-400 нм) и видимого света ($\lambda > 400$ нм) на водные растворы тиамин-зависимых ферментов (m/z=265,1112) в смеси с рибофлавином происходит окисление тиамин-зависимых ферментов в тioxром (m/z=262,0882) и оксидигидротioxром (m/z=278,0837). Окисление тиамин-зависимых ферментов в тioxром в аэробных условиях происходит с участием кислорода, в основном под действием синглетного кислорода. В анаэробных условиях тиамин-зависимых ферментов в присутствии рибофлавина не окисляется при воздействии ультрафиолета и видимого излучения на его водные растворы. Тioxром в аэробных условиях окисляется с образованием оксидигидротioxрома, как под действием синглетного кислорода, так и фотосенсибилизатора – рибофлавина в триплетном состоянии. В анаэробных условиях окисление тioxрома с образованием оксидигидротioxрома происходит с участием фотосенсибилизатора рибофлавина в триплетном состоянии. Мы показали, что UVA ультрафиолет и интенсивный видимый свет в присутствии фотосенсибилизатора рибофлавина (витамин В₂) способны уменьшить содержание тиамин-зависимых ферментов и тиаминдифосфата в водных растворах, в крови, а также в клеточных структурах глаза.

Обсуждаются возможные механизмы повреждения клеточных структур глаза вследствие инактивации тиамин-зависимых ферментов под действием интенсивного видимого света в присутствии эндогенного фотосенсибилизатора – рибофлавина.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант M18-157) и программы «Химические технологии и материалы» (задание 5.28).

МЕТОД ОБРАБОТКИ КАРТ СПЕКТРОВ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Хрусталёв В.В.¹, Бондаренко А.В.², Хиневич Н.В.², Хрусталёва Т.А.³

¹*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

²*Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники, Минск, Беларусь*

³*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) – один из современных методов исследования структуры пептидов и белков [1]. К его достоинствам относят высокую чувствительность, к недостаткам – низкую воспроизводимость спектров биополимеров на наноструктурированных ГКР-активных подложках. В связи с этим необходим простой математический метод обработки большого массива спектральных данных (карт спектров), позволяющий собрать целостную картину из разнообразных фрагментов. В данной работе был применен метод, в котором на каждом сглаженном по пяти точкам спектре определяются пики (при условии возрастания сигнала по трем точкам и дальнейшего его падения по трем последующим точкам), а затем осуществляется оценка количества спектров с пиком, положение которого варьируется в пределах $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ относительно каждого значения сдвига по частоте. Надежность результатов анализа предложенным методом непосредственно связана с качеством исходных ГКР-спектров.

Для проверки метода были зарегистрированы ГКР-спектры насыщенного раствора пептида NQ21 в 0,01М фосфатном буфере с pH=7,4 [2], нанесенного на поверхность наноструктурированной пленки серебра на пористом кремнии. Подложка была просканирована в трех областях размером 15×15 точек при помощи конфокального микроскопа Confotec NR500, оснащенного лазером с длиной волны 633 нм и системой для детектирования комбинационно рассеянных фотонов. Конечным результатом обработки полученных карт является диаграмма, отражающая процент встречаемости пиков на ГКР-спектре. Анализируя такой «псевдоспектр», можно заметить, что наиболее часто встречающимися являются пики, характерные для остатков триптофана (1610 см^{-1} – на 73% спектров, 1346 см^{-1} – на 62% спектров) и метионина (859 см^{-1} – на 73% спектров) [1]. Многократно наблюдалась полоса с максимумом при 1130 см^{-1} (на 67% спектров), соответствующая вибрации связей углерода с азотом, а также пик при 1400 см^{-1} (на 60% спектров), характерный для вибрации групп $-\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_3$ [1]. Известно, что для альфа-спиральных белков пик амид I находится в диапазоне от 1640 до 1658 см^{-1} , для бета-структурных – от 1665 до 1680 см^{-1} [1]. Для пептида NQ21 положение пика амид I приходится на 1645 см^{-1} , что характерно для альфа-спирального состояния [2]. Обнаруживается этот пик в районе от 1643 до 1647 см^{-1} у 60% из 735 снятых спектров. Ранее было показано, что пик амид I регистрируется не всегда, а только при максимальном приближении пептидных связей к поверхности ГКР-активной подложки.

Разработанный метод позволяет проводить анализ карт ГКР-спектров, что важно, в том числе, для определения вторичной структуры пептидов, адсорбированных на гидрофильной поверхности.

Библиографические ссылки

1. Rygula A., Majzner K., Marzec K. M. et al. Raman spectroscopy of proteins: a review // J. Raman Spectrosc. 2013. Vol. 44. P. 1061–1076.
2. Khrustalev V.V., Khrustaleva T. A., Kahanouskaya E. Y. et al. The alpha helix 1 from the first conserved region of HIV1 gp120 is reconstructed in the short NQ21 peptide// Archives of Biochemistry and Biophysics. 2018. Vol. 638. P. 66–75.

МЕМБРАННАЯ И КЛЕТОЧНАЯ БИОФИЗИКА

ROS-ACTIVATED FLUXES OF ELECTROLYTES ACROSS THE PLANT PLASMA MEMBRANE UNDER ABIOTIC STRESS CONDITIONS

Demidchik V.^{1,2}, **Smolich I.**¹, **Yu Min**², **Huang Xin**²

¹*Belarusian State University, Minsk, Belarus, e-mail: dzemidchyk@bsu.by*

²*Foshan University, Department of Horticulture, Foshan, Guangdong, China*

Fluxes of electrolytes and release of ions from plant cells are induced by stresses, such as salinity, drought, heavy metals and others; however, the mechanism and role of this phenomenon have only recently been explored. Our data show that stress-induced electrolyte fluxes (also referred as ‘electrolyte leakage’) are mainly related to the efflux of K⁺ and organic anions and mediated by the plasma membrane ion conductances with different kinetics of activation and cation selectivity and involve several groups of ion channels, such as GORK, SKOR, annexins and ALMT. Stress-induced electrolyte fluxes are accompanied by enhanced generation of reactive oxygen species (ROS). ROS have been shown to activate GORK, SKOR, and annexins. The ROS-activated K⁺ efflux through GORK channels results in dramatic K⁺ loss from root cells that stimulates proteases and endonucleases, promoting PCD and autophagy. Nevertheless, in moderate stress conditions, K⁺ efflux could play an essential adaptive role as a ‘metabolic switch’, inhibiting anabolic reactions and stimulating catabolic processes; this saves energy for adaptation and repair needs. Under stress conditions, ROS can be generated by NADPH oxidases, which are directly activated by cytosolic Ca²⁺. This forms a mechanism enhancing electrolyte fluxes, via so-called ROS-Ca²⁺ hub, which amplifies initially weak stress via overproduction of ROS. Our unpublished data point to the molecular mechanism underlying K⁺ efflux from roots in response to NaCl and other stresses, which includes ROS interaction with specific Cys moieties in the ion channel GORK, leading to its activation and dramatic loss of K⁺. We also report that the leak of ascorbate via ALMT-like conductances catalyses hydroxyl radical generation and activation of ROS-dependent ion fluxes in root cells. Overall, we propose the comprehensive scheme of stress- and ROS-induced ion fluxes in root cell membranes under different conditions and physiological states.

CHANGES IN ANATOMICAL VARIABLES DETERMINING MAXIMUM STOMATAL CONDUCTANCE IN LEAVES *VINCA MINOR* L. DURING EARLY SPRING

Fediuk O.M., Bilyavska N.O.

M.G. Kholodny Institute of Botany, Kyiv, Ukraine

The natural conditions in most territorial of Ukraine in early spring characterized prevailing low temperatures of atmospheric air and the soil surface layer which are unfavourable for most angiosperms [1]. The reaction to the influence of low temperatures in leaves cold-resistant plants may be some activation adaptive molecular and physiological processes, which are accompanied by ultrastructural changes in chloroplasts and mitochondria. The peculiarities such changes in the *Galanthus nivalis* L. leaves were described in previously published works [2, 3]. An obtained results of ultrastructural changes gave rise to the assumption that low temperatures can also influence the stomata microstructure, which takes active participation in ensuring gas and water plant metabolism. Analysis of scientific publications [4, 5] devoted to studies of the microstructure *Vinca minor* L. leaves, showed that insufficient attention is given to anatomical indicators, by which changes in the physiological stomata processes can be detected.

Taking into consideration the above, in this communication, we have set ourselves the task to the identifying pattern of theoretical anatomic index change, which is reflected the maximum stomatal conductance (g_{\max}) [6], and showing the perspectives its use for analysing of the abilities stomata adapt to the influence of early spring temperatures. The experiment result, it was found that in early March at minus temperature $-2,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ by stomata located on the abaxial leaf side, the g_{\max} signification averaged $140,31 \pm 0,12\text{ mM}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($n=30$, $p<0,05$). The early April, with increased temperature to $+7,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, was revealed to increase g_{\max} by 31,1 %. A similar tendency of changes was also found at the stomata density index (SD), which in early April was 23,8 % higher, than in early March. In addition, the revealed direct correlation $r=0,64$ ($p<0,05$) between g_{\max} and vein density (D_v) can also indicate a possible mutual relationship of stomatal ontogenesis and vein densities, which can be considered as one the components from the total adaptation strategies of cold-resistant *V. minor* to influence of the early spring temperatures. Thus, in early spring, the g_{\max} level in young *V. minor* leaves was lower than in later development leaves. A possible decrease in this signification a later period development of leaves *V. minor* can obviously be used in further researches as negative impact intensity indicator of low ambient temperatures on stomata development.

References

1. Білявська Н.О., Федюк О.М. Мікроструктура поверхні листків *Galanthus nivalis* L. на ранньовесняних етапах розвитку // Вісн. Харківського нац. аграр. університету. Серія біологія. 2018. Т. 2, № 44. С. 51.
2. Bilyavska N.O., Fediuk O.M., Zolotareva E.K. Chloroplasts of cold-tolerant plants // Plant Science Today. 2019. Vol. 6, № 3. P. 407-411.
3. Fediuk O.M., Bilyavska N.O., Zolotareva E.K. Effects of soil early-spring temperature on the morphometric parameters of mitochondria in *Galanthus nivalis* L. leaves // Plant Science Today. 2018. Vol. 5, № 4. P. 149-154.
4. Dow G.J., Bergmann D.C., Berry J.A. An integrated model of stomatal development and leaf physiology // New Phytologist. 2014. Vol. 201. P. 1220.
5. Ochirova K.S., Ovanova E.A., Dordzhieva V.I. *Vinca minor* L. Leaf Anatomical Structure // J. Pharm. Sci. & Res. Vol. 10, № 10. 2018. P. 2528-2530.
6. Zhang F.P., Carins Murphy M.R., Cardoso A.A., Jordan G.J., Brodribb T.J. Similar geometric rules govern the distribution of veins and stomata in petals, sepals and leaves // New Phytologist. 2018. Vol. 219. P. 1224-1234.

HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS STUDY WITH ATOMIC FORCE AND FLUORESCENCE MICROSCOPY

Kukhareenko L.V.¹, Walheim S.², Barczewski M.², Gröger R.², Schimmel Th.², Shman T.V.³, Tarasova A.V.³

¹*Belarussian State Medical University, Minsk, Belarus*

²*Institute of Applied Physics and Center for Functional Nanostructures, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany*

³*Belarussian Center for Pediatric Oncology and Hematology, Pos.Lesnoe, Belarus*

Detailed characterization of human mesenchymal stem cells (hMSCs) mechanical properties (elasticity, adhesion and stiffness) and cytoskeleton organization is required to realize their promising potential for development of new therapies for regenerative medicine and stem-cell-based tissue engineering [1]. In the study the actin cytoskeleton and mechanical properties of hMSCs were studied with fluorescence microscopy and atomic force microscopy (AFM). The AFM capabilities can be extended by using the pulsed force mode, which enables to obtain information about relative difference in cell surface elasticity with nanometer-scale resolution. The pulsed force mode allows a quantitative mapping of hMSCs surface mechanical properties such as adhesion and stiffness, simultaneous with the imaging the cells surface topography in tapping mode.

All data were obtained on a Nanoscope (R) IIIa MultiMode atomic force microscope. The pulsed force mode is a non-resonant, intermediate contact mode of AFM. When working in pulsed force mode, an additional sinusoidal modulation to the cantilever with user-selectable frequency, which is far below the resonance frequency of the cantilever is applied while the tip scans the surface. The images were acquired by using silicon nitride cantilevers (NSC12/50) with a nominal force constant of 0.65 N/m (NT-MDT, Zelenograd, Russia). AFM images were processed with the Nanoscope software. The hMSCs fixed with 2% glutaraldehyde were studied in air at room temperature.

The AFM investigations of hMSCs exhibited a considerable range of morphologies as well as spreading and the lengthened shape of cells. The AFM studies revealed that lamellipodia contain orthogonally arranged actin networks at the hMSC peripheries. The area around nucleus looks like a smooth fiber mesh. Zooming in on the nucleus the granular structure of elongated bundles of actin filament with granule size of from 20 nm to 70 nm is visualized. AFM images demonstrate many parallel actin bundles extending throughout the nuclear region. The nuclei appear to be distinctly softer than the flat lamellipodia. The pulsed force mode revealed that nuclei are more adhesive and less rigid than the lamellipodial regions. It was determined that the stiffest part of the hMSC corresponds to lamellipodia. The hMSCs were stained with Alexa Fluor 633 phalloidin to identify F-actin and anti- α -tubulin Alexa Fluor 488-MAT to identify tubulin. According to the hMSC fluorescent images microfilaments are linear in form and mostly are localized over the nucleus. Microtubules more often appear curved in form and span large regions of hMSCs. Mechanical properties of hMSC most likely are regulated by the actin cytoskeleton, its structure and dynamics. In this paper we present the potential of the pulsed force mode for mapping the local mechanical properties (elasticity, adhesion and stiffness) to hMSCs surface topology. In conclusion, the pulsed force mode of the atomic force microscopy combined with fluorescence microscopy opens up new possibilities for investigation of the hMSCs mechanical properties in relation with the cytoskeleton organization.

References

1. Han I., Kwon B., Park H., Kim K. Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells Is Related to Their Intrinsic Mechanical Properties // J. Int. Neurology 2017. Vol. 21. S. 24-31.

MODELING THE STRUCTURE OF HEMOGLOBIN APPLYING A DIELECTRIC METHOD FOR MONITORING THE STATE OF BIOLOGICAL OBJECTS

Batyuk L.V., Kizilova N.N.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

*PoreLab, Department of Chemistry, Norwegian University of Science and Technology, 7491
Trondheim, Norway*

The region of dielectric relaxation of water molecules in blood cells or human tissues at a frequency between 1 Hz and 50 GHz is most interesting for obtaining unique information on the fundamental properties of liquids, on the molecular structure of proteins, on the dynamics of changes and orientations of liquid molecules with temperature and composition variations [1-2]. Using the values of the complex permittivity measured in this region, we can calculate the static and optical permittivity and relaxation times, which are related to the order parameters: the average correlation factor between the molecules and the change in activation entropy [3]. At the same time, the reliability of the conclusions about the supramolecular structure of a protein or changes in its structure depends to a large extent on the choice of the density of frequency points and the accuracy of measurements, the choice of an adequate model of dielectric relaxation measurement and the possibility of conducting temperature and concentration studies that reflect the formation of a supramolecular structure. As an object and model of the study, we have selected hemoglobin of erythrocytes. This choice is due to the possibility of using the object as a sensor that responds to changes in the state of the body, as well as for testing the created measuring tools, since the electrophysical characteristics of hemoglobin are presented in many literature references [4-5]. Protein models are characterized by a loose packing of atoms. This may affect the calculation of depolarization coefficients. An algorithm was developed for filling the hollow parts of model objects for a more accurate calculation of the depolarization coefficients with liquid. The algorithm is based on the fact that only the internal cavities of objects are filled without increasing its geometric dimensions. To consider have took an ellipse. In solving this problem, resonant methods for measuring the permittivity spectra were used. When processing the results, the basic principles of mathematical statistics, numerical methods of approximation, optimization of functions and solving systems of linear algebraic equations were used. The structure of the proposed model allows for its parametric identification with almost accurate reproduction of the dynamics of the distribution of dielectric relaxation in the concentration-temperature space, which indicates the restructuring of the liquid structure in these temperature ranges. The presence of the dual effect of water on the structure of hemoglobin leads to the fact that the change in free energy during protein denaturation is 15-17 kcal/mol with a total energy of hydration on the protein macromolecule of the order of 102 kcal/mol. It turned out the adequacy of this model is maintained even if it is simplified by increasing the degree of aggregation of red blood cells. This process indicates a restructuring of the water structure surrounding the hemoglobin molecule and is explained by the formation of cluster-type water regions.

Reference

1. Chelidze T. Dielectric spectroscopy of blood // J. of NonCryst. Solids. 2002. Vol. 305. P. 285–294.
2. Batyuk L.V., Kizilova N.N. Novel monitoring system for quantitative estimation of efficient medical treatment of diseases // Bull of V. Karazin Kharkiv National University. 2019. Vol. 43. P. 4–10.
3. Batyuk L.V. Influence of cancer disease on dielectric characteristics of structural-functional state of erythrocyte membranes // Medical Science Journal. 2015. Vol. 74. P. 11–17.
4. Батюк Л.В., Берест В.П. Evaluation of relaxation frequency of hemoglobin // Медична та клінічна хімія. 2019. Т. 21, № 3. С. 17–18.
5. Salamon Z., Macleod H.A., Tollin G. Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating // Biochim et biophys acta. 1997. Vol. 1331. P. 131–152.

ОЦЕНКА ПРАЙМИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ β -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКОГО И БИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

Бачище Т.С., Кондратьева В.В., Савченко Г.Е.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,
Минск, Беларусь

Известно, что направленность действия на растение потенциального иммуномодулятора β -аминомасляной кислоты (β -АМК) зависит от концентрации последней, что делает актуальной разработку тест-системы и выбор информативных параметров для подбора оптимальных концентраций защитных веществ на ранних стадиях развития растений.

В настоящей работе с этой целью исследовали влияние β -АМК на ряд стрессочувствительных показателей на фоне гипертермии (40-42°C, ТШ) и патогенеза (*Bipolaris Sorokiniana*): содержание фотосинтетических пигментов, функциональную активность фотосистемы 2 (РАМ-флуориметрия), уровень активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и редокс-состояние антиоксиданта аскорбата (отношение содержания его восстановленной и окисленной форм). В качестве тест-системы использовали интактные проростки ярового ячменя, выращенные на водопроводной воде при освещенности полихроматичным белым светом (120 мкмоль квантов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$) и 22°C, содержащие сформированный активный фотосинтетический аппарат.

Сравнительные исследования показали наибольшую информативность редокс-состояния аскорбата по сравнению с другими параметрами при оценке активности β -АМК как вещества, обладающего иммуномодулирующими свойствами, в условиях раздельного и сочетанного действия гипертермии и патогенеза в листьях растений ячменя. Установлено, что величина отношения содержания восстановленной и окисленной форм аскорбата статистически достоверно снижалась при стрессовых воздействиях и значительно повышалась в результате предварительной обработки проростков β -АМК за трое суток до измерения. Особенно выразительно и быстро изменение редокс-состояния аскорбата проявилось после ТШ: через 10 мин после прекращения нагревания проростков оно снижалось на порядок, а на фоне действия β -АМК не только возвращалось к величине, наблюдавшейся в контроле, но даже превышало ее. Праймирующая активность концентрации β -АМК, выбранной в результате использования тест-системы, была продемонстрирована в полевых и вегетационных экспериментах с растениями ячменя сорта Магутны.

Дальнейшее развитие исследований должно быть направлено на использование предложенного в работе подхода для расширения видов тестируемых растений и ассортимента иммуномодулирующих веществ с целью создания защитных смесей.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ, грант №Б18М-069.

ИНДУКЦИЯ НАКОПЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ ПОЛИФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ В КАЛЛУСАХ ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Бачище Т.С., Мартысюк А.В., Макаров В.Н.

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,
Минск, Беларусь*

Известно, что культивирование тканей и клеток в искусственных условиях позволяет получать различные ценные продукты, которые ранее использовались в очень ограниченном количестве из-за отсутствия источников сырья. Современные методы культивирования растительных клеток и тканей позволяют накапливать целевые продукты в гораздо больших количествах, чем в интактных растениях. Кроме того, изолированные ткани и культуры клеток можно подвергать воздействию различных физических и химических стимулов, вызывая усиление биосинтеза вторичных метаболитов. В настоящей работе исследовано влияние различных условий культивирования каллусных культур фасоли обыкновенной на индукцию синтеза полифенолов.

В качестве объекта использовали каллусные культуры фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* L.) сорта Анфиса, выращенные на питательной среде Мурасиге-Скуга [1], дополненной 2,4-Д (3,0 мг/л) и кинетином (1,0 мг/л) в различных условиях: 1) в условиях освещения 35 W/m²; 2) при гипотермии (4 °C) в отсутствии освещения. Контролем служили каллусы, выращенные в термостате при комнатной температуре 22 °C. Визуальным показателем накопления полифенолов служило изменение окраски каллуса до разных оттенков бурого цвета. Количественное содержание полифенолов определяли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Фолина-Чокальтеу [2].

Общее содержание полифенолов в контрольных каллусах составило 4,43 мкг/г сырой массы. Увеличение общего содержания фенольных соединений в 1,7 раза (до 7,53 мкг/г сырой массы) обнаружено при культивировании в условиях освещения (35 W/m²). При действии холодового стресса (4 °C) общее количество полифенолов увеличивалось незначительно (4,86 мкг/г сырого веса) относительно контроля. Обнаружено, что в условиях гипотермии пролиферация клеток фасоли замедлялась, о чем свидетельствовало уменьшение сырой массы и размеров колоний, при этом каллус становился более плотным. В условиях освещения каллус фасоли развивался по рыхлому типу, однако содержание полифенолов при этом существенно возрастало. Следует отметить, что в изученных условиях культивирования все каллусы оставались жизнеспособными.

Таким образом, в результате проведенных исследований, обнаружена стимуляция общего синтеза полифенолов в каллусной культуре фасоли в условиях освещения, что создает научную основу использования этого метода для индукции антиоксидантов полифенольной природы в практических целях. Обсуждаются перспективы дальнейшего развития исследований, направленных на расширение видового состава изучаемых объектов и подбор условий культивирования, стимулирующих синтез вторичных метаболитов полифенольной природы.

Библиографические ссылки

1. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P.473–497.
2. Naz S., Ali A., Iqbal J. Phenolic content in vitro cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.) during callogenesis and organogenesis // *Pac. J. Bot.* 2008. Vol. 40. N 6. P. 2525-2539.

ДЕЙСТВИЕ ДОНОРА МОНООКСИДА УГЛЕРОДА (CORM-2) НА $K^+(Ca^{2+})$ КАНАЛЫ И АКВАПОРИНЫ ЭРИТРОЦИТОВ

Бесчасный С.П., Гасюк Е.Н.

Херсонский государственный университет, Херсон, Украина

Монооксид углерода (CO), который относится к группе газотрансмиттеров, продуцируется практически всеми клетками организма и участвует во многих механизмах межклеточной сигнализации. Соединения – доноры CO (carbon monoxide-releasing molecules, CORMs) являются перспективными для терапевтического применения [1]. К таким донорам принадлежит димер трикарбонилдихлорорутения (II) (CORM-2). Известно, что эритроциты, непосредственно связанные с метаболизмом CO, являются важной моделью для изучения влияния различных биологически активных соединений на мембраны, ионные каналы [2].

Перед экспериментом эритроциты свежей донорской крови предварительно отмывали в фосфатном-солевом буферном растворе с глюкозой. Для того чтобы доказать влияние CORM-2 на $K^+(Ca^{2+})$ каналы, в параллельной пробе эти каналы блокировали клотримазолом. Для исследования действия на аквапорины 1 и 3 (AQP1, AQP3) эритроцитов проводили их блокаду с использованием хлорида ртути и нитрата серебра. Каждую суспензию эритроцитов инкубировали в гипо-, изо- и гиперосмолярных растворах (220, 320, 420 и 520 мОсм) и соответственно в инкубационную среду добавляли активный и инактивированный (который потерял CO) CORM-2 в концентрациях 6, 10, 50, 100 и 200 мкМ. После инкубирования проводили измерения степени светорассеяния полученной пробы. Культивирование эритроцитов с различными концентрациями CORM-2 показало дозозависимое действие последнего на $K^+(Ca^{2+})$ каналы. Было выяснено, что CORM-2 способен блокировать $K^+(Ca^{2+})$ каналы. Это подтверждается тем, что светорассеяние суспензии эритроцитов после обработки CORM-2 было аналогично показателю, полученным после обработки клотримазолом. Необходимо отметить, что максимальное блокирующее влияние CORM-2 на $K^+(Ca^{2+})$ каналы наблюдалось при концентрации 200 и 10 мкМ. Однако, в концентрации 100 мкМ в гипотоническом растворе (220 мОсм) наблюдался обратный эффект – выход воды из эритроцитов и уменьшение их объема. Указанное явление можно объяснить действием на аквапориновые каналы эритроцитов.

Также было установлено, что CORM-2 влияет и на транспорт воды в эритроцитах путем воздействия на AQP3. Этот эффект также оказался дозозависимым: наиболее активная концентрация составляла 6-50 мкМ. Можно утверждать, что CORM-2 повышает устойчивость эритроцитов к гипертоническому стрессу, стабилизирует их объем в гипер- и гипотонической среде действуя на AQP3. Вопрос связывания CORM-2 с аквапоринами эритроцитов является перспективным для дальнейших исследований, поскольку последние играют важную роль в увлажнении кожи, заживлении ран и росте опухолей. В результате эксперимента было выявлено, что кроме CO, который высвобождается после добавления CORM-2, на мембрану эритроцита действует рутений, который и образует карбонильное соединение.

Библиографические ссылки

1. Motterlini R., Foresti R. Biological signaling by carbon monoxide and carbon monoxide-releasing molecules // Am J Physiol Cell Physiol. 2017. Vol. 312, № 3. P. 302-313.
2. Трубачева О.А., Шахристова Е.В., Галич А.И., Петрова И.В. Влияние повышенной Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости на деформируемость эритроцитов // Вестник Томского государственного педагогического университета. 2011. № 5. С. 165-168.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Болдова А.Е., Тюрин-Кузьмин П.А., Свешникова А.Н.

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
Москва, Россия*

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) – мультипотентные стволовые клетки, способные к пролиферации, самовосстановлению и дифференцировке в ткани различных типов. Регуляция ответа МСК на внешнее воздействие может происходить повышением концентрации свободных ионов кальция в цитозоле [1]. В частности, кальциевый ответ в МСК индуцируется агонистами сопряженных с G-белком (GPCR) рецепторов, например, нейромедиаторами. Однако механизмы кальциевой сигнализации в МСК все еще полностью не известны.

Целью настоящей работы является построение достоверной компьютерной модели кальциевой сигнализации мезенхимальных стромальных клеток.

Компьютерная модель гомогенной системы представляет собой систему ДАУ, описывающую реакции внутриклеточной сигнализации. Модель содержит два структурных модуля: кальциевый модуль, описывающий концентрации вторичных мессенджеров (инозитол-1,4,5-трисфосфат (ИФ3) и ионы кальция), и мембранный модуль, описывающий работу рецепторов к внешним раздражителям (норадреналину). Для валидации данной компьютерной модели был проведен ряд экспериментов по измерению концентрации ионов свободного кальция в цитозоле. Исследования были выполнены с помощью флуоресцентной микроскопии при загрузке МСК жировой ткани человека флуоресцентным зондом Fura-2.

Путем последовательного построения модели было получено, что при отсутствии влияния со стороны кальция на динамику вторичных мессенджеров и работу рецепторов наблюдается выход кальция из ЭПР и переход к новому устойчивому состоянию. Добавление рецепторов к ИФ3 1, 2 и 3 типов позволяет изменить характер кальциевого ответа на малых временах, а также реализовать режим осцилляций в системе. Включение положительных и отрицательных обратных связей (кальций-индуцируемый синтез и деградация ИФ3), а также потоков ионов кальция через внешнюю мембрану дает возможность получить ответ по типу «все-или-ничего», наблюдаемый в эксперименте. Также было обнаружено, что величина кальциевого ответа зависит от активности рецепторов к ИФ3 и АТФазы SERCA, а также от концентрации субстрата для производства ИФ3, в то время как концентрация внешнего активатора (норадреналина) влияет на время ответа. Аналогичные результаты для МСК встречаются в ответ на АТР [2].

Таким образом, в результате работы была построена математическая модель внутриклеточной сигнализации мезенхимальных стромальных клеток, достоверно описывающая экспериментальные наблюдения по ответу на действие норадреналина. Работа поддержана стипендией Президента РФ СП-2903.2019.4.

Библиографические ссылки

1. Tyurin-Kuzmin P.A. et al. Angiotensin receptor subtypes regulate adipose tissue renewal and remodelling // FEBS Journal. 2020. V.287. P. 1076-1087.
2. Kotova P.D. et al. Coupling of P2Y receptors to Ca^{2+} mobilization in mesenchymal stromal cells from the human adipose tissue // Cell Calcium. 2018. V.71. P. 1-14.

ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЙОД-АККУМУЛИРУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ

Обернихин С.С., Яглова Н.В., Назимова С.В., Яглов В.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека», г. Москва, Россия

Йод-аккумулирующая функция щитовидной железы обеспечивается работой йонного канала в наружной цитоплазматической мембране, осуществляющего транспорт йодидов в тироцит против градиента концентрации. Его формирует гликопротеин натрий-йодный симпортер (НЙС). В наших предыдущих работах мы показывали значительные изменения в продукции тиреоидных гормонов вследствие воздействия на организм эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ). Это явление требует всестороннего исследования, так как в Российской Федерации помимо широкомасштабного воздействия низких доз ДДТ и его метаболитов на население и биосферу отмечается дефицит йода в большинстве регионов. Цель исследования – изучение продукции мембранного гликопротеина НЙС при воздействии низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в различные периоды развития организма.

Первую экспериментальную группу составили половозрелые самцы крыс Вистар. Длительное воздействие низких доз ДДТ в пределах его максимально допустимых уровней в пищевых продуктах вызывало снижение продукции у них тиреоидных гормонов. Отмечалось снижение экспрессии в клетках НЙС, что вызывало реактивное усиление органификации йодидов в клетках. Восстановление продукции НЙС достигалось за счет активации пролиферативных процессов в железе, то есть увеличения клеток-продуцентов. Это указывает на невозможность клеток активировать экспрессию НЙС при продолжающемся воздействии ДДТ.

Вторую экспериментальную группу составили новорожденные самцы крыс Вистар, которые подвергались аналогичному по длительности воздействию ДДТ. У крыс этой группы также отмечалось снижение функциональной активности щитовидной железы. По сравнению с контрольной группой отмечалось статистически значимое снижение процента клеток с высокой экспрессией НЙС в периферических зонах долей щитовидной железы. В центральной зоне долей отмечалось незначимое усиление экспрессии НЙС. Уменьшение синтеза НЙС в большей части паренхимы подтверждало и снижение его концентрации в сыворотке крови. После достижения половой зрелости у крыс в периферических зонах долей не выявлено существенных изменений экспрессии НЙС, но отмечалось появление участков массивной гибели эпителия и деструкции фолликулов. По сравнению со значениями контрольной группы аналогичного возраста выявлено статистически значимое уменьшение высоко экспрессирующих НЙС фолликулярных тироцитов. Также отмечалось и снижение концентрации НЙС в системном кровотоке. Показатели тиреоидного статуса соответствовали гипотиреоидному состоянию. Проллиферативные процессы в железе не развивались. Сравнение изменений в обеих опытных группах, показало, что при воздействии дисраптора с первых дней жизни йод-аккумулирующая функция страдает сильнее, так как к нарушениям экспрессии НЙС присоединяется гибель тироцитов без активации пролиферации. Это свидетельствует о нарушении формирования регуляторных механизмов в железе.

Таким образом, эндокринный дисраптор ДДТ необратимо подавляет экспрессию тироцитами мембранного гликопротеина НЙС, обеспечивающего йод-аккумулирующую функцию щитовидной железы и нарушает развитие компенсаторно-приспособительных реакций, направленных на восстановление железой йод-аккумулярующей функции.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ МОДЕЛИ ОБРАТИМОЙ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Васильев Г.А.¹, Гарсон Д.А.К.^{1,2}, Филькова А.А.^{1,2,3}, Свешникова А.Н.^{1,2,3}

¹*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

²*Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, Россия*

³*Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия*

Основная задача тромбоцитов – безъядерных клеток крови – состоит в образовании устойчивого агрегата в месте повреждения стенки сосуда. В настоящее время наиболее популярным методом оценки функциональности тромбоцитов является тест агрегометрии. Однако данный тест за счет его широкой вариабельности между донорами позволяет определять поведение тромбоцитов только качественно, а не количественно. Одним из интересных феноменов, наблюдаемых в агрегометрии, является распад агрегатов, образованных в присутствии ионов кальция, т.н. обратимая агрегация. Для изучения механизмов данного процесса, а также при попытке создать количественную систему оценки результатов теста агрегометрии недавно была предложена математическая модель, описывающая обратимую агрегацию тромбоцитов с помощью двух обыкновенных дифференциальных уравнений [1]. Модель основана на приближении суспензии тромбоцитов, состоящей из одиночных тромбоцитов и агрегатов. Результатом работы модели является определение пяти параметров, характеризующих экспериментальную кривую агрегометрии, физиологический смысл которых не выяснен.

Целью настоящей работы является исследование математической модели [1] методами нелинейной динамики с целью определения физиологического смысла параметров, а также возможного способа редуцирования их количества.

Численное интегрирование модели проводилось с помощью набора методов PyDSTool языка программирования Python 2.7. Пять параметров модели определялись методами автоматической оценки на основе экспериментальных данных. Кривые агрегометрии были получены на агрегометре Solar AP 2110 при активации богатой тромбоцитами плазмы крови здоровых доноров, взятой на цитрат натрия, при действии АДФ (Sigma-Aldrich, USA). Разрешение этического комитета ЦТП ФХФ РАН.

Исследование системы проводилось после её приведения к безразмерному виду. Проведённый качественный анализ модели показал, что у данной системы при наборе значений параметров, описывающих экспериментальные данные, есть одна нетривиальная особая точка типа устойчивый узел. Для различных наборов параметров построены фазовые плоскости с изоклинами, определены особые точки и построены графики зависимости модельных переменных от времени. Проведённое исследование показывает, что все пять параметров модели влияют на стационарный уровень агрегации тромбоцитов, один параметр влияет на время достижения максимальной агрегации и три параметра влияют на начальную скорость образования агрегатов. Предложены аналитические функции зависимости значений параметров от концентрации активатора.

Работа поддержана грантами РФФИ 17-00-00138 и 18-34-20026.

Библиографические ссылки

1. Filkova A.A., Martyanov A.A., Garzon Dasgupta A.K., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. Quantitative dynamics of reversible platelet aggregation: mathematical modelling and experiments // Sci. Rep. 2019.

ЭФФЕКТ ФЛАВОНОИДОВ НА СТРУКТУРУ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ МЕМБРАН

Вейко А.Г.

Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, Гродно, Беларусь

В настоящей работе мы оценили количественные изменения физического состояния, динамику и структуру модельных 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC) липидных мембран (липосом) при взаимодействии с флавоноидами: кверцетином, нарингенином и катехином. Наши измерения флуоресцентной анизотропии зондов ТМА-DPH и DPH показали, что наиболее липофильный флавоноид – кверцетин и менее липофильные – полярный катехин и нарингенин, взаимодействуют с липосомными мембранами DMPC и в зависимости от дозы уменьшают микровязкость (повышают жесткость) липидного бислоя на разных глубинах, однако влияние флавоноидов на гидрофобную зону более выражено по сравнению с внешней липидной границей – разделом вода / мембрана. Кверцетин в большей степени изменял текучесть мембран, эффект нарингенина на жесткость был значительно ниже, и мы не наблюдали эффекта катехина. Эффект флавоноидов зависел от их растворимости в воде. Используя метод дифференциальной сканирующей калориметрии, мы исследовали влияние флавоноидов на термотропные свойства DMPC мембран. Термограммы демонстрируют фазовый переход липосом DMPC при температуре 24,3 °С и пик предварительного перехода при 12 °С. Флавоноиды вызывали исчезновение предтранзитивного пика и понижение температуры основного фазового перехода, уширение калориметрического пика и уменьшение энтальпии фазового перехода. Наиболее выраженные эффекты были вызваны кверцетином и нарингенином. Мы наблюдали, что включение флавоноидов, кверцетина и нарингенина, кроме катехина, в липидный бислой снижало температуру и энтальпию основного мембранного фазового перехода из-за дестабилизации мембраны и увеличения гетерогенности мембраны. Точно так же было показано, что некоторые халконы и флавононы интеркалировали в мембраны DPPC и DMPC и снижали температуру их плавления в результате изменения порядка липидов, характеристик упаковки и гидратации мембраны [1]. Снижение кооперативности перехода (расширение пика перехода) было интерпретировано как результат повышенной гетерогенности системы из-за появления микродоменов с различным содержанием флавоноидов [1]. Ранее Тараховский и соавторы предположил, что флавоноиды могут имитировать действие холестерина в мембранах и способствовать образованию микродоменов [2].

Чтобы понять физико-химическую природу флавоноид-фосфолипидных взаимодействий, мы измерили изменения дзета-потенциала и липосомального диаметра в присутствии изученных флавоноидов. Влияние кверцетина на размер и потенциал мембраны было значительным, включение молекул кверцетина в липосомную мембрану приводило к значительному увеличению размера липосом DPPC.

В заключение, отмечается высокая биологическая активность флавоноидов, связанная с модуляцией биофизических параметров биологических мембран. Интеркаляции флавоноидов в мембрану влияет на порядок упаковки молекул фосфолипидов и содержание воды в липидном бислое.

Библиографические ссылки

1. Wesołowska O. et al. Interaction of prenylated chalcones and flavanones from common hop with phosphatidylcholine model membranes // BBA. 2014. Vol. 1838. P. 173-184.
2. Tarahovsky Y.S., Muzafarov E.N., Kim Y.A. Rafts making and rafts braking: how plant flavonoids may control membrane heterogeneity // Mol Cell Biochem. 2008. Vol. 314. P. 65-71.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С ПЕРЕХОДНЫМИ МЕТАЛЛАМИ НА СИСТЕМУ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Войтехович М.А., Кулинкович А.В., Смолич И.И., Демидчик В.В.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Органические кислоты – наиболее обильные внутриклеточные метаболиты. Пути их синтеза и роль в биохимических превращениях хорошо изучена. Однако пока не ясна их функция в апопласте, куда они попадают в больших количествах в составе экссудатов. Недавно нами было установлено, что экзогенный аскорбат (L-аскорбиновая кислота), который известен как основной антиоксидант клетки, может выступать в качестве сигнально-регуляторного агента, запускающего Ca^{2+} -сигнализацию в случае его выброса в апопласт. При этом аскорбат вступает во взаимодействие с редокс-активными ионами меди и железа в клеточной стенке, генерируя гидроксильные радикалы, активирующие Ca^{2+} -проницаемые ионные каналы. Могут ли схожую реакцию запускать другие органические кислоты остается открытым вопросом. В этой связи целью настоящей работы было исследовать возможную редокс-зависимую активацию Ca^{2+} -сигналов (временное повышение уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$) в ответ на введение в наружную среду органических кислот и их комплексов с переходными металлами (Cu^{+2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$ и $\text{Mn}^{2+/3+}$).

В работе использовались интактные корни 7-12-дневных проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh., экспрессирующие экворин и Ca^{2+} -эквинометрия. Тестировалось влияние органических кислот (аскорбата, малата, цитрата и фумарата) в концентрациях 1-30 ммоль/л на $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в клетках корня. В качестве положительного контроля использовалась обработка 1 ммоль/л аскорбата в буферном растворе с 10 ммоль/л CaCl_2 (pH 6,0). Было показано, что данная обработка вызывает временное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ с пиком $38,6 \pm 3$ нмоль/л. Аскорбат в концентрациях 10 и 30 ммоль/л вызывал увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ на 162 ± 15 нмоль/л и 315 ± 18 нмоль/л соответственно. Аскорбат-индуцируемые Ca^{2+} -сигналы имели волнообразную форму с одним пиком, достигая максимума в течение 3-5 мин в зависимости от тестируемой концентрации. Другие исследованные кислоты в концентрации 1 ммоль/л не вызывали подобной реакции. Однако, введение в среду 10 ммоль/л цитрата и фумарата индуцировало рост $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ на $16,4 \pm 2$ нмоль/л и $23,2 \pm 6$ нмоль/л соответственно. Дальнейшее увеличение концентрации фумарата не приводило к росту $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$. При тестировании 30 ммоль/л цитрата отмечался рост $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ на $110,5 \pm 14$ нмоль/л, а 30 ммоль/л малата на $36,5 \pm 4$ нмоль/л. При добавлении металлов в концентрации 1 ммоль/л был обнаружен рост $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ на $221,6 \pm 20$ нмоль/л (медь), $18,0 \pm 3$ нмоль/л (железо) и $19,7 \pm 2$ нмоль/л (марганец). Введение в среду совместно с аскорбатом ионов меди и железа в концентрации 1 ммоль/л стимулировало аскорбат-индуцируемое повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ до пиков $673,0 \pm 40$ нмоль/л и $242,2 \pm 20$ нмоль/л соответственно. Комплекс 1 ммоль/л марганец-аскорбат уменьшал $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ почти в 3 раза по сравнению с чистым аскорбатом. Комплекс 1 ммоль/л марганец-малат вызывал увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ более чем в 3 раза по сравнению с чистым малатом. Остальные кислоты в комплексах с металлами не вызывали индукции Ca^{2+} -сигналов, а в некоторых случаях выступали в роли ингибиторов этих сигналов. Например, 1 ммоль/л комплексы цитрат-медь и малат-медь снижали $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ чистой меди в 1,7 и 2,8 раза соответственно. Фумарат не вступал в редокс-реакцию ни с одним из протестированных металлов.

МЕХАНИЗМЫ СБОРКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КОМПЛЕКСА ПРОТРОМБИНАЗЫ НА ПОВЕРХНОСТИ ФОСФОЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛ

**Ганцева Е.Р., Ганцева А.Р., Коваленко Т.А.¹, Пантелеев М.А.^{1,2},
Свешникова А.Н.^{1,2}**

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
физический ф-т, Москва, Россия*

¹*Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия*

²*Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Д. Рогачева, Москва, Россия*

Система плазменного свертывания представляет собой каскад ферментативных реакций между сериновыми протеиназами и их кофакторами, называемыми факторами свертывания. Его задача заключается в предотвращении кровотечения и реализуется посредством образования фибринового сгустка. Ключевую роль в каскаде свертывания играет ферментативный комплекс протромбиназы, активирующий белок протромбин с образованием тромбина, который участвует в образовании фибрина. Протромбиназа состоит из факторов Ха и Va, которые обратимо связываются с отрицательно заряженными фосфолипидными поверхностями в присутствии ионов кальция [1]. Связывание фактора Ха с фактором Va теоретически может осуществляться как напрямую при посадке фактора Ха из раствора на мембранно-связанный фактор Va, так и при связывании двух мембранно-связанных факторов, и преобладающий путь сборки комплекса остается неизвестным.

Целью настоящей работы было определение преобладающего пути сборки ферментативного комплекса протромбиназы на поверхности фосфолипидных везикул.

Методы. Построена математическая модель активации протромбина комплексом протромбиназы на поверхности фосфолипидных везикул. Модель представляет собой систему из 13 ОДУ, записанных в соответствии с законом действующих масс. В системе учитывается связывание факторов Ха, Va и протромбина с фосфолипидной мембраной, формирование протромбиназы по двум возможным путям и образование фермент-субстратных комплексов. Полученные дифференциальные уравнения интегрировались численно в *Сорасi* с помощью метода LSODA.

Результаты. Согласно модели, преобладающий путь сборки комплекса протромбиназы зависит от соотношения концентраций факторов Va, Ха и липидов. При концентрации липидов = 2 мкМ, концентрации Ха = 0.05 нМ, концентрации Va = 0.008 нМ преобладает путь сборки протромбиназы с поверхности, а при концентрации липидов = 2 мкМ, концентрации Ха = 3 нМ, концентрации Va = 10 нМ преобладает путь сборки протромбиназы из раствора. С помощью модели были получены предсказания, согласно которым зависимость концентрации сформировавшегося тромбина от времени будет иметь различный вид для различных путей сборки протромбиназы в двух экспериментальных постановках: 1) при предынкубации Va с везикулами и последующим добавлением Ха и II, 2) при предынкубации Ха с везикулами и последующим добавлением Va и II.

Работа поддержана грантами РФФИ 17-00-00138 и 18-34-20026.

Библиографические ссылки

1. Giesen P., Willems G., Hemker H., Hermens W. Membrane-mediated Assembly of the Prothrombinase Complex // Membrane-mediated assembly of the prothrombinase complex. J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266. P. 18720-18725.

МЕТАБОЛИЗМ ЦИНКА В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Гармаза Ю.М.

ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”,
Минск, Беларусь

Новый термин “металлом”, который вошел в обиход современной микроэлементологии, можно охарактеризовать, как распределение свободных и связанных ионов металлов в каждом компартменте отдельно взятой клетки. Именно количественные (определение свободных/лабильных и общих концентраций ионов металла в клетке) и функциональные (описание регуляции клеточного уровня ионов металлов и возможного их действия на клеточное функционирование) подходы лежат в основе понимания биологической значимости металлов. Не удивительно, что поддержание или контроль определенного внутриклеточного баланса ряда микроэлементов (напр., цинка) – “непростая работа” для клетки. Уникальные химические свойства цинка позволяют ему являться кофактором многочисленных ферментов и белков, что отражается на его относительно высокой суммарной клеточной концентрации (0,1–1мМ). В то же время известно, что в свободной форме цинк проявляет определенную токсичность за счет возможности связываться с многими белками даже в наномолярных концентрациях и приводить, например, к ингибированию ряда ферментов или индукции белок-белковых взаимодействий. Поэтому в ходе эволюции в клетках выработалась сложная регуляторная система, обеспечивающая поддержание физиологического уровня цитозольного Zn^{2+} , которая включает 24 мембранных белка-транспортера, относящихся к семействам ZIP и ZNT; Zn-связывающие белки, такие как металлотионеины (MT); Zn-чувствительные молекулы, такие как MTF-1; везикулярные сайты хранения Zn^{2+} - цинкосомы. Но, несмотря на это, в литературе описаны случаи, когда размер внутриклеточного пула цинка может быстро изменяться (увеличиваться/истощаться) и приводить к нарушению биохимических процессов. Это означает, что нарушение клеточного метаболизма цинка может лежать в основе патогенеза ряда заболеваний.

В наших исследованиях, где в качестве модельной системы были выбраны эритроциты человека, показано, что стрессовый агент - пероксид водорода, повышает уровень цитозольного лабильного цинка из-за высвобождения ионов из внутриклеточных связывающих сайтов на белках. Этот заново высвобожденный лабильный цинк впоследствии, вероятно, накапливается в цинкосомах. Таким образом, цинкосома может служить для буферизации цитозольного цинка при кратковременных нарушениях ионного гомеостаза. Известно, что именно цинкосомы и MT участвуют в хранении цинка, который впоследствии может быть мобилизован при его дефиците в клетке. Нами продемонстрировано, что в условиях клеточного дефицита цинка, смоделированного с помощью хелаторов этого иона *in vitro*, происходит активация экспрессии цистеин-обогащенных белков MT на фоне разнонаправленного изменения содержания восстановленного глутатиона (GSH), который может выступать в роли низкоаффинного Zn-связывающего сайта. В свою очередь, в экспериментах *in vivo*, проведенных на эритроцитах периферической крови пациентов с сахарным диабетом II типа, нами также выявлено значимое снижение количества цитозольного пула цинка на фоне 3-кратного снижения концентрации GSH и 2-кратного увеличения уровня экспрессии MT.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании в эритроцитах человека жестких механизмов регуляции гомеостаза цинка, нарушение которых может привести к запуску патологических процессов, что было продемонстрировано на примере сахарного диабета II типа, где цинковый метаболизм играет важную роль в этиопатогенезе данной патологии.

ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

Гарсон Д.А.К.^{1,2*}, Корнейчук А.Д.¹, Филькова А.А.^{1,2,3}, Свешникова А.Н.^{1,2,3}

¹*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

²*Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, Россия*

³*Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия*

*e-mail: andreigarzondk@gmail.com

Тромбоциты – безъядерные клеточные фрагменты, главной задачей которых является образование агрегата в месте повреждения. Одним из основных физиологических индукторов агрегации является АДФ, высвобождаемый активированными тромбоцитами. При активации тромбоцитов слабыми активаторами, каким и является АДФ, наблюдается феномен обратимой агрегации тромбоцитов. Процесс дезагрегации наблюдается *in vitro* в присутствии ионов кальция в среде, при этом в цитратной крови без ионов кальция агрегаты остаются стабильными, наблюдается необратимый характер агрегации. Одной из возможных причин данного явления может являться ингибирование ионами кальция синтеза тромбоксана А₂ (ТхА₂) – вторичного активатора, необходимого для образования стабильного тромба. Построение модели процесса обратимой агрегации и её исследование позволит установить связь между концентрацией внешних ионов кальция и характером агрегации.

Цель работы – определение связи концентрации внешних ионов кальция и синтеза ТхА₂ с помощью построения модели обратимой агрегации и её валидации на экспериментальных данных. Методом исследования является компьютерное моделирование на языке Python. Для валидации модели и получения параметров агрегации проводились измерения обратимой и необратимой агрегации тромбоцитов по методу Борна на агрегометре Solar AP 2110 при активации богатой тромбоцитами плазмы крови здоровых доноров, взятой на цитрате натрия, АДФ (Sigma-Aldrich, USA). Разрешение этического комитета ЦТП ФХФ РАН.

В результате работы построена компьютерная модель агрегации тромбоцитов, основанная на предположении, что вероятность образования агрегата зависит только от того, проходит ли реакция с агрегатом или одиночным тромбоцитом. Модель учитывает сильную активацию тромбоцитов внутри больших агрегатов, что приводит к синтезу ТхА₂. Единственным ограничением модели является фиксированный максимальный размер агрегата. В рамках данной модели была исследована зависимость наработки вторичного активатора от концентрации внеклеточного кальция. По кривым агрегации, соответствующим активации в ответ на АДФ при различном уровне ионов кальция в среде, были подобраны параметры модели и получены соответствующие концентрации вторичного активатора. На основе этих данных была построена зависимость максимальной концентрации ТхА₂ и скорости его наработки от концентрации кальция. Было показано, что существует критическая концентрация кальция, при которой резко падает скорость наработки ТхА₂, что ведёт к качественному изменению характера агрегации.

Таким образом, одной из причин различного характера агрегации является связь производства вторичного активатора – тромбоксана А₂ с уровнем внеклеточного кальция. Работа поддержана грантами РФФИ 17-00-00138 и 18-34-20026.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ С ГАЛОФОБНЫМИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

Горбунов Н.П., Костевич В.А., Соколов А.В.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Миелопероксидаза (Мро) – димерная пероксидаза нейтрофилов и моноцитов, каждый протомер димера состоит из легкой и тяжелой цепи, с которой ковалентно связан гем. В результате взаимодействия с пероксидом водорода Соединение I Мро способно окислить хлорид-ион до хлорноватистой кислоты – мощного антимикробного и галогенирующего агента. Ряд социально значимых заболеваний, в том числе атеросклероз, сахарный диабет, хроническая почечная недостаточность, ревматоидный артрит, сопровождается активацией нейтрофилов и моноцитов, секрецией Мро и накоплением галогенированных молекул – биомаркеров галогенирующего стресса. В настоящее время Мро рассматривается в качестве мишени противовоспалительной терапии. Вместе с тем полное подавление активности Мро может грозить развитием инфекций, а также препятствовать нормальному разрешению воспаления. В качестве альтернативного подхода нами рассматривается создание иммуноаффинного сорбента, специфически связывающего избыток Мро. Целью данной работы было получение моноклональных антител, анализ их специфичности и сайта взаимодействия с Мро человека.

С помощью иммунизации мышей препаратом Мро человека и последующей гибридизации лимфоцитов по Милштейну-Келлеру нами была получена гибридома (клон 2F7), продуцирующая моноклональные антитела, интересным свойством которых было разобщение комплекса с Мро в нейтральной среде при повышении концентрации NaCl выше 1 М. Это свойство подтвердилось в условиях твердофазного иммуноферментного анализа и при иммуноаффинной хроматографии Мро на 2F7-агарозе. Полученные антитела 2F7 были названы галофобными.

С целью установления специфичности 2F7 к Мро был проведен Вестерн-блоттинг с образцами белков плазмы крови и экстракта нейтрофильных лейкоцитов, который показал, что 2F7 специфически взаимодействуют с димерной Мро в отсутствие восстановителя в образце, а при восстановлении взаимодействуют с тяжелой цепью Мро. Оказалось, что 2F7 не взаимодействуют с Мро из нейтрофилов крыс, несмотря на 97 % гомологию её первичной последовательности с Мро человека. Модификация Мро флуорескаминол, реагирующим с первичными аминок группами, отменила взаимодействие с 2F7. Наконец, иммуноаффинная хроматография плазмы крови с добавлением Мро показала, что фермент сорбируется на 2F7-агарозе вместе со своим физиологическим ингибитором, церулоплазмином. Т.е. антитела 2F7 не конкурируют с церулоплазмином за взаимодействие с Мро. Учитывая, что трехмерная структура комплекса Мро и церулоплазмина была установлена с помощью рентгеноструктурного анализа, мы провели анализ возможных сайтов взаимодействия с антителами 2F7, сравнивая отличия между Мро человека и крысы, а также площадки контакта с церулоплазмином в структуре PDB: 4ejx. В результате было выявлено две последовательности, обогащенные катионными аминокислотными остатками: 451LGTVLRNKL460 и 485LKRGKGRVG492. Следующим этапом работы планируется синтез указанных пептидов и анализ их взаимодействия с антителами 2F7.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ – МД-1901.2020.4.

АНАЛИЗ ТОКОВ ОРГАНИЧЕСКИХ АНИОНОВ ЧЕРЕЗ ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ КЛЕТОК КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

**Гриусевич П.В., Толкачева Ю.В., Новосельский И.Ю., Нитиевский В.А.,
Соколик А.И., Демидчик В.В.**

Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

Органические кислоты играют исключительно важную роль в жизни растений. Они вовлечены в важнейшие метаболические пути, преобразование энергии в клетке, регуляцию устьичной активности, контроль pH, синтез предшественников аминокислот и адаптацию к стрессовым воздействиям [1]. Анионы-лиганды органических кислот напрямую участвуют в формировании устойчивости к алюминию, хелатируя данный металл в прикорневом пространстве [2]. Предполагается, что органические кислоты могут функционировать в качестве сигнальных молекул и модулировать экспрессию генов [3;4]. Экссудаты органических анионов критически важны для формирования растительно-микробных сообществ и поглощения металлов-микроэлементов [5].

Несмотря на высокую физиологическую значимость органических анионов, механизмы их транспорта в растительной клетке изучены недостаточно. Особый интерес представляет выявление роли анионных каналов в этом процессе. До сих пор данная роль не подтверждена экспериментально для высших растений. Целью настоящей работы являлось измерение и анализ токов органических анионов через ионные каналы плазматической мембраны клеток корня модельных растений *Arabidopsis thaliana* L. Анализ проводился с использованием электрофизиологической техники пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка». Объектом исследования являлись протопласты, выделенные из клеток корня с помощью целлюлолитических и пектолитических ферментов.

В настоящей работе было показано, что плазматическая мембрана клеток корня арабидопсиса обладает проницаемостью к следующим органическим анионам: аскорбату, цитрату и малату. Токи данных органических анионов характеризовались слабой потенциал-зависимостью и быстрой кинетикой активации, чем были схожи с ранее обнаруженными у высших растений токами анионных каналов семейства ALMT (ALuminum-activated Malate Transporters). Ингибитор анионных каналов антрацен-9-карбоновая кислота значительно снижала аскорбат-, малат- и цитрат-индуцируемые токи. Таким образом, потоки аскорбата, малата и цитрата потенциально опосредовались анионными каналами семейства ALMT. Кроме того, было установлено, что плазматическая мембрана клеток корня арабидопсиса не обладает проницаемостью к фумарат-, пропионат- и глюконат-анионам. Ранее токи аскорбата, катализируемые анионными каналами, у растений исследованы не были. Быстрый выход аскорбата из клетки в результате функционирования аскорбат-проницаемых анионных каналов дает возможность предположить, что аскорбат может выполнять определённые сигнальные функции, в особенности, с учетом его высокой редокс-активности в качестве восстановителя ионов меди и железа в биологических системах.

Библиографические ссылки

1. Igamberdiev A. U., Eprintsev A. T. Organic Acids: The Pools of Fixed Carbon Involved in Redox Regulation and Energy Balance in Higher Plants // Front. Plant Sci. 2016. Vol. 7. P. 1042.
2. Meyer S., De Angeli A., Fernie A. R. et al. Intra- and extra-cellular excretion of carboxylates // Trends Plant Sci. 2010. Vol. 15. P. 40-47.
3. López-Bucio J., Nieto-Jacobo M. F., Ramírez-Rodríguez V. et al. Organic Acid Metabolism in Plants // Plant Sci. 2000. Vol. 160. P. 1-13.
4. Makavitskaya M., Svistunenko D., Navaselsky I. et al. Novel roles of ascorbate in plants: induction of cytosolic Ca^{2+} signals // J Exp. B. 2018. Vol. 69. P. 3477–3489.

АППАРАТНО-ПРОГРАММНЫЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СИНАПТИЧЕСКИХ И НЕЙРОСЕТЕВЫХ ПРОЦЕССОВ В НЕРВНОЙ ТКАНИ

Денисов А.А.^{1,2}, Булай П.М.¹, Питлик Т.Н.¹, Никифоров А.В.¹, Токальчик Д.П.²,
Пашкевич С.Г.², Черенкевич С.Н.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Институт физиологии НАНБ, Минск, Беларусь

Всестороннее изучение особенностей работы мозга и нервной ткани на различных уровнях, механизмов функционирования биологических нейронных сетей имеет не только фундаментальную научную значимость, но и служит основой для разработки прикладных нейрокогнитивных технологий и высокотехнологичных способов решения задач биомедицинского характера [1, 2]. Современное развитие микроэлектронных, вычислительных и других технологий открывает возможности для разработки новых высокоэффективных методов изучения нервной ткани. Нами разработан аппаратно-программный комплекс для исследования синаптических и нейросетевых процессов в срезах гиппокампа крысы с использованием современных подходов в области микроэлектроники, вычислительной техники и 3D-печати.

Основой установки является система регистрации и стимуляции электрической активности нейронов на базе 16-канального интегрального усилителя биопотенциалов с дифференциальными входами и цифровым последовательным интерфейсом. Усилитель имеет программируемый коэффициент усиления и содержит программно-управляемые фильтры входных сигналов. Использование дифференциальных входов позволяет оптимизировать конфигурацию регистрирующих и рефератных электродов для минимизации помех при стимуляции. Для обработки получаемых данных и управления процессом эксперимента разработано специальное программное обеспечение.

Для обеспечения жизнедеятельности срезов гиппокампа *in vitro* разработана проточная регистрационная камера. Камера обеспечивает подведение оксигенированной перфузионной среды с двух сторон среза и снабжена системами регулировки уровня и демпфирования колебаний раствора. Для регулирования температуры в камере разработан термостабилизатор, включающий в себя нагреватель, теплообменник и пропорционально-интегрально-дифференциальный регулятор. Регистрационная камера разработана в виде цифровой трехмерной модели и изготовлена с применением метода трехмерной печати, что позволяет оперативно вносить модификации в соответствии с требованиями проводимого исследования – возможно проведение экспериментов не только с нервной тканью, но и с другими электровозбудимыми тканями, например, миокарда.

Многоканальная программируемая система регистрации и стимуляции позволяет проводить на срезах гиппокампа не только опыты по изучению свойств синаптической пластичности с классическим дизайном эксперимента, но и открывает возможности для проведения более сложных исследований взаимодействия групп нейронов на нейросетевом уровне. Система регистрации обладает значительным потенциалом для миниатюризации, а параметры каналов усиления позволяют использовать ее для разработки систем нейроинтерфейса человек-компьютер.

Библиографические ссылки

1. Kriegeskorte N, Douglas P.K. Cognitive Computational Neuroscience // Nat Neurosci. 2018. Vol. 21. P. 1148-1160.
2. Musk E. An Integrated Brain-Machine Interface Platform With Thousands of Channels // J Med Internet Res. 2019. Vol. 21. P. e16194.

ФОРМИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПАТТЕРНОВ МЕТОДОМ БИОПЕЧАТИ

Денисов А.А.^{1,2}, Досина М.О.², Токальчик Ю.П.², Пашкевич С.Г.², Черенкевич С.Н.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Институт физиологии НАНБ, Минск, Беларусь

При проведении исследований механизмов работы мозга широко применяются модельные системы *in vitro*, позволяющие воссоздавать процессы функционирования нервных клеток и тканей в детально контролируемых условиях, что дает возможности для моделирования различных нейрофизиологических явлений и исследования биофизических механизмов работы биологических нейронных сетей. В настоящее время этот подход приобретает новые возможности благодаря интеграции методов клеточного культивирования и аддитивных технологий 3D-печати. Методы биопечати позволяют создавать упорядоченные клеточные паттерны не только на плоскости, но и в трехмерном пространстве, что важно для исследования функционирования биоинженерных нейронных сетей с топологией, соответствующей условиям *in vivo* [1].

Для внедрения таких методов в прикладные медицинские области необходим значительный объем исследовательской работы по отработке методов формирования гетерогенных клеточных конструкций, создания трехмерных скаффолдов, в том числе, имитирующих внеклеточные условия в мозге. С этой целью нами разработана экспериментальная установка для отработки методов биопечати на основе метода шприцевого дозирования загруженного клетками гидрогеля.

Разработанная установка основана на системе трехмерного позиционирования печатающего узла под управлением микрокомпьютера. Подача гидрогеля осуществляется при помощи шприцевого экструдера. Узел экструдера оснащен системой датчиков, позволяющих производить автоматическое позиционирование экструдера в требуемой области. Для печати гидрогель с клетками загружается в шприц, дозатор позиционируется у дна чашки Петри и происходит процесс формирования заданного паттерна в соответствии с программой. Разработаны алгоритмы дозирования, учитывающие инерционность подачи гидрогеля при малом диаметре дозатора с учетом особенностей формируемого паттерна и стадии печати.

Для отработки методики культивирования клеток в напечатанных конструкциях использовали культуру крысиной глиомы С6. В качестве основы для гидрогеля использовали желатин, который растворяли в среде DMEM для получения 3% раствора. Затем добавляли 0.5% альгината натрия. В образовавшийся гель добавляли клеточную суспензию и заполняли им дозатор. При помощи разработанной установки формировали гидрогелевые паттерны с клетками на дне чашки Петри, которые затем фиксировали 10% раствором хлорида кальция, заливали средой DMEM и помещали в CO₂-инкубатор. Получено, что клетки в желатиновом гидрогеле в процессе пролиферации образовывали трехмерные кластеры. Отростки, формируемые клетками, были более мелкими и тонкими, чем при росте на поверхности.

Разработанная методика может применяться для исследования патологических процессов в нервной ткани, при моделировании процессов пролиферации опухолевых клеток в трехмерном пространстве. В настоящее время данная методика дорабатывается для формирования трехмерных паттернов клеток первичной культуры коры головного мозга крысы на поверхности планарного микроэлектродного массива.

Библиографические ссылки

1. de la Vega L, Lee C, Sharma R, Willerth SM. 3D bioprinting models of neural tissues: the current state of the field and future directions // Brain Res Bull. 2019. Vol. 150. P. 240-249.

ИНДУКЦИЯ ОДНО- И ДВУЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В КЛЕТКАХ ПРОТОНЕМЫ МХА *PHYSCOMITRELLA PATENS* В ОТВЕТ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕСС ФАКТОРОВ

Звонарев С.Н.¹, Касперович Е.С.¹, Мацкевич В.С.¹, Angelis K.J.², Демидчик В.В.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²*Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of Czech Republic, Praha 6, Czech Republic*

Одной из реакций растительной клетки на воздействие абиотических стресс факторов является генерация активных форм кислорода (АФК), которая может являться причиной индукции запрограммированных процессов деградации клеточного содержимого, включая ДНК. В настоящей работе с использованием модельной системы для анализа синтеза АФК и деструкции ДНК – протонемы мха *Physcomitrella patens*, был исследован качественный состав АФК, генерируемых при засолении и стрессе, вызванным тяжелыми металлами, и проведена оценка происходящих при этом «программируемых» (двойных) и «генотоксических» (одиночных) разрывов ДНК. Ростовые тесты с использованием сред с различным содержанием NaCl, показали, что протонемная стадия мха устойчива к концентрациям NaCl вплоть до 300 мМ. Схожие тесты с тяжелыми металлами, такими как Ni и Cu, продемонстрировали невысокую толерантность мха к данным стресс факторам: растения погибали при концентрациях 1мМ и выше.

В дальнейшей работе использовались 7-дневные протонемные клетки. Генерацию супероксидного анионного радикала определяли с использованием флуоресцентного зонда ди гидроэтидиума (ДГЭ) с УФ-возбуждением и стандартного фильтра Nikon FITC для регистрации флуоресцентного излучения. Использовались две разных техники Comet: нейтральный Comet assay для обнаружения двунитевых разрывов ДНК и щелочной Comet assay который более чувствителен к одностранным разрывам ДНК.

Было показано, что доминирующей АФК при воздействии NaCl является супероксидный анионный радикал, также в значительных количествах синтезируются гидроксильные радикалы, и в меньшей степени, H₂O₂. Тесты на базе техники СОМЕТ показали, что обработка 100-500 мМ NaCl вызывает значительное увеличение как дву-, так и одноцепочечных разрывов ДНК. Тушители гидроксильных радикалов, такие как тиомочевина или диметилсульфоксид, ингибировали образование разрывов ДНК в ответ на NaCl. Схожие результаты были получены при обработке мха Ni и Cu. Обработка растений мха солями данных тяжелых металлов в концентрациях 1-10 мМ приводила к увеличению одно- и двуцепочечных разрывов ДНК по сравнению с контролем.

Таким образом, NaCl неожиданно индуцировал как «программируемые», так и «генотоксические» повреждения ДНК в гидроксил-зависимой манере. Тяжелые металлы, такие как Ni и Cu, также вызывали одно- и двуцепочечные повреждения ДНК. Мы предполагаем, что индукция одноцепочечных разрывов потенциально может быть важна для стимуляции новых наследуемых мутаций, необходимых для лучшей приспособляемости к абиотическим стресс факторам окружающей среды в растительных популяциях.

ВОВЛЕЧЕНИЕ БЕЛКОВ ЖАСМОНАТНОГО СИГНАЛИНГА В РЕАЛИЗАЦИЮ СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ СЕРОВОДОРОДА У *Arabidopsis thaliana*

Колупаев Ю.Е.^{1,2}, Ястреб Т.О.¹, Дмитриев А.П.³

¹Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков, Украина

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, Харьков, Украина

³Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, Украина

Ключевой посредник-газотрансмиттер – сероводород (H_2S) находится в функциональной связи со стрессовыми фитогормонами, в том числе с жасмоновой кислотой. Так, обнаружено усиление генерации сероводорода у растений арабидопсиса при их обработке жасмоновой кислотой [1]. С другой стороны, молекулярно-генетическими методами получены данные, указывающие на возможность влияния H_2S на экспрессию гена, кодирующего белок COI1, который считается рецептором жасмоната и участвует в удалении белков-репрессоров транскрипционных факторов жасмонатного сигналинга [2]. Другой белок жасмонатного сигналинга – транскрипционный фактор JIN1/MYC2 – контролирует экспрессию генов, индуцируемых не только жасмонатом, но и абсцизовой кислотой и рассматривается в качестве одного из узловых в стрессовом сигналинге, в том числе при формировании защитных реакций растений на засуху и засоление [3]. Для проверки рабочей гипотезы о вовлечении белков жасмонатного сигналинга в реализацию стресс-протекторных эффектов сероводорода сравнивали влияние его донора (NaHS) на солеустойчивость растений арабидопсиса дикого типа (Col-0) и мутантов по компонентам жасмонатного сигналинга – *coil* и *jin1*.

Для экспериментов использовали 5-недельные растения *Arabidopsis thaliana* L. соответствующих генотипов, которые выращивали в водной культуре на среде Хогланда при 21/16°C (день/ночь), освещении 6000 лк и фотопериоде 10 ч. Внесение донора H_2S (50 мкМ NaHS) в среду инкубации растений вызывало повышение солеустойчивости у дикого типа, что выражалось в снижении под его влиянием водного дефицита листьев, уменьшении содержания продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ), стабилизации проницаемости мембран и содержания хлорофилла при действии 175 мМ NaCl. Также под влиянием обработки NaHS при засолении у растений Col-0 повышалась активность супероксиддисмутазы, каталазы и гваяколпероксидазы, увеличивалось содержание сахаров. Предварительная обработка мутантов *coil* и *jin1* донором H_2S не предотвращала вызываемое действием NaCl усиление ПОЛ и не способствовала уменьшению проницаемости мембран и сохранению пула хлорофиллов в стрессовых условиях. Также у обоих мутантов, обработанных NaHS, не наблюдалось повышения активности антиоксидантных ферментов при действии засоления, а содержание сахаров снижалось. Однако у мутанта *coil* предшествовавшая солевому стрессу обработка NaHS уменьшала проявление водного дефицита.

Сделано заключение о вовлечении компонентов жасмонатного сигналинга в реализацию стресс-протекторного действия доноров сероводорода и оксида азота. Высказано предположение, что транскрипционный фактор JIN1/MYC2 играет более важную роль в процессах индуцирования солеустойчивости растений арабидопсиса экзогенным H_2S по сравнению с белком COI1.

Библиографические ссылки

1. Shan C., Wang T., Zhou Y., Wang W. Hydrogen sulfide is involved in the regulation of ascorbate and glutathione metabolism by jasmonic acid // Biol. Plant. 2018. V. 62. P. 188–193.
2. Barrera-Ortiz S., Garnica-Vergara A., Esparza-Reynoso S et al. Jasmonic Acid-Ethylene Crosstalk // J. Plant Growth Regul. 2018. V. 37. P. 438–451.
3. Ton J., Flors V., Mauch-Mani B. The Multifaceted Role of ABA in Disease Resistance // Trends Plant Sci. 2009. V. 14. P. 310.

СИГНАЛЬНЫЕ И АДАПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ, ИНДУЦИРУЕМЫЕ Ni^{2+} И КОМПЛЕКСАМИ Ni -ГИСТИДИН, В КЛЕТКАХ КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

**Мацкевич В.С., Шикер А.А., Лицкевич К.С., Рекиш А.Л.,
Смолич И.И., Демидчик В.В.**

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Никель является одним из наиболее токсичных тяжелых металлов для растений. Токсическое влияние никеля сопровождается генерацией активных форм кислорода (АФК) и индукцией окислительного стресса. Считается, что синтез АФК и окислительное повреждение запускают каскад дальнейший повреждений клетки. Однако, механизм синтеза АФК под действием избыточных уровней никеля пока не ясен, так как Ni^{2+} не обладает редокс-активностью в биологических условиях и не катализирует формирование свободных радикалов, повреждающих органические молекулы клетки. Нами выдвинута гипотеза, согласно которой для активации АФК-генерирующих свойств никеля требуется формирование комплексов Ni^{2+} с природными хелаторами, такими как гистидин. Гистидин (Гис) обладает высоким сродством к никелю, и часто отмечается увеличение его уровня в организме при никелевом стрессе. Целью настоящего исследования являлось установить роль взаимодействия Ni^{2+} с Гис в индукции сигнальных реакций в корне высших растений в условиях никелевого стресса. В опытах с регистрацией прорастания модельных растений *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. на среде с никелем было показано, что высокие уровни Ni^{2+} ингибируют формирование и рост корневой системы. Дозозависимость данного эффекта имела S-образный вид с полумаксимальным ингибированием при 0,2-0,3 мМ Ni^{2+} и полным ингибированием при 3 мМ Ni^{2+} . Добавление Гис вместе с никелем (2:1) значительно снижало токсичность Ni^{2+} . В ростовых тестах с заменой среды Ni^{2+} ингибировал рост корней арабидопсиса, однако при более высоких концентрациях (начиная с 3 мМ). Растения *rhd2*, лишённые НАДФН-оксидазы, были менее чувствительны к никелю: торможение роста регистрировалось лишь при добавлении 10 мМ Ni^{2+} . Введение Гис снижало токсическое действие Ni^{2+} на рост корня растений дикого типа, но не имело эффекта на *rhd2*. Тесты с флуоресцентным зондом дигидроэтидиум (ДГЭ) показали, что Ni^{2+} не вызывает генерации АФК в корне. Добавление никеля на фоне Гис активировало значительную продукцию АФК. В этом случае максимум флуоресценции ДГЭ отмечался при 30-минутном стрессировании Ni^{2+} -Гис₂. Зона роста растяжением была наиболее чувствительна к воздействию никеля. Добавление антиоксидантов (диметилсульфоксида) снижало уровень АФК под действием никеля. Тестирование уровня свободного Ca^{2+} в цитоплазме клеток корня показало, что Ni^{2+} не вызывает изменений $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$, однако на фоне Гис он индуцировал Ca^{2+} -сигналы. Таким образом, получено подтверждение того, что в присутствии Гис никель приобретает свойства индуктора сигнальных процессов, таких как генерация АФК и повышение уровня Ca^{2+} в цитоплазме. Вероятно, это позволяет растительной клетке распознать и приспособиться к повышенному содержанию никеля. С использованием комплекса молекулярных и физиологических подходов выявлены гены-мишени Ni^{2+} -Гис₂ в клетке, такие как редокс-чувствительный K^+ -канал GORK, глутатион-редуктаза GR1, Ca^{2+} -зависимая протеинкиназа СРК6 и др.. Также были проведены опыты с сельскохозяйственными видами, которые показали высокую чувствительность к никелю растений пшеницы и подсолнечника и низкую чувствительность к данному тяжелому металлу гороха (его минимальный рост наблюдался даже при 10 мМ Ni^{2+} в среде). Вероятно, это связано с большой активностью уреазы у бобовых.

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЭТАНОЛА КАК СУБСТРАТА НА КУЛЬТУРУ КЛЕТОК МИКРОВОДОРОСЛИ *EUGLENA GRACILIS*

Мокросноп В. М., Золотарева Е.К.

Институт ботаники имени Н. Г. Холодного НАНУ, Киев, Украина

Зеленая жгутиковая микроводоросль *E. gracilis* известна своей способностью к использованию этанола в качестве источника углерода и энергии. Отличие *E. gracilis* от большинства других представителей микроводорослей в том, что при относительно высоких концентрациях этанола в питательной среде, до 2%, культура *E. gracilis* не только не погибает, но продолжает накапливать биомассу. Средняя экспериментальная концентрация этанола в среде для *E. gracilis* составляет 100-177 мкМ, тогда как культура зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* уже при 10 мкМ этанола проявляет признаки задержки роста и гибели клеток. В наших исследованиях, связанных с определением эффектов этанола на культуру *E. gracilis* в процессе ее роста обычно используется концентрация спирта 100 мкМ. Согласно нашим предыдущим исследованиям, содержание этанола в питательной среде культуры *E. gracilis* остается на уровне >50% от начального по окончании экспоненциальной фазы роста культуры, т.е. переход в стационарную фазу роста не определяется лимитированным количеством субстрата. Целью данной работы было определить минимальную концентрацию этанола как субстрата, которая бы влияла на культуру микроводоросли подобно 100 мкМ. В данной работе было проанализировано диапазон концентраций этанола в питательной среде культуры *E. gracilis* на ее рост, содержание фотосинтетических пигментов и запасного полисахарида.

Исследования проводились на микроводоросли *E. gracilis* var. *bacillaris* с использованием солевой питательной среды Крамера-Майерса, в которую вносили разные исходные концентрации этанола: 25, 50, 75 и 100 мкМ. Подсчет концентрации клеток в культуре, измерение рН культуральной жидкости, анализ содержания хлорофиллов, каротиноидов и парамилона проводили в лаг и экспоненциальной фазе роста культур.

Результаты исследований показали, что в вариантах с внесением 50, 75 и 100 мкМ этанола в питательную среду по достижении экспоненциальной фазы роста культур наблюдается снижение рН до 2.8, при этом концентрация клеток и содержание фотосинтетических пигментов в них приблизительно одинакова. рН культуральной жидкости варианта, где вносили 25 мкМ этанола снизилась лишь до 5.5 от начальной (6.8), а концентрация клеток была на ~25% ниже в сравнении с другими вариантами. В лаг фазе роста концентрация парамилона в культуре с содержанием экзогенного спирта 100 мкМ была наибольшей среди всех вариантов. Таким образом, для стимуляции роста культуры *E. gracilis* достаточно 50 мкМ этанола, но для получения парамилона благоприятна концентрация 100 мкМ.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ И АНАЛИЗ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ СРЕЗА ГИППОКАМПА

Никифоров А.В., Питлик Т.Н., Денисов А.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Функционирование нейронных сетей лежит в основе работы центральной нервной системы, при этом нейросетевые процессы отвечают за функции обработки и хранения информации. Изучение механизмов работы биологических нейронных сетей позволяет получать новые знания о фундаментальных принципах функционирования мозга [1]. При исследовании базовых принципов межнейронных коммуникаций в условиях нейромодулирующих воздействий широко используются эксперименты с гиппокампом – отделом мозга, играющим важную роль в процессах обучения [2]. В гиппокампе четко сформированы отдельные слои пирамидальных нейронов, что позволяет использовать внеклеточные методики микроэлектродной регистрации и стимуляции электрической активности для мониторинга процессов синаптической передачи как *in vivo*, так и *in vitro*. Слоистое строение гиппокампа позволяет при работе с лабораторными животными выделять срезы, сохраняющие основную структуру синаптических связей между слоями и проводить эксперименты в более контролируемых условиях, чем *in vivo*.

При исследовании процессов межнейронной передачи в срезах гиппокампа *in vitro* регистрирующие электроды, как правило, размещают в дендритном и пирамидальном слоях области CA1, что позволяет регистрировать полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы (пВПСП) и популяционные спайки (ПС) соответственно. пВПСП характеризуют эффективность синаптической передачи, а ПС – нейрональную возбудимость. При проведении электрофизиологических экспериментов возникает задача мониторинга амплитудных параметров пВПСП и ПС. С этой целью нами разработаны специализированные программные средства для визуализации этих сигналов и анализа их характеристик.

Для создания программных модулей использовали среду обработки данных JupyterLab и язык программирования Python. Разработанные программные модули позволяют принимать экспериментальные данные по сети Ethernet, производить цифровую фильтрацию данных, рассчитывать амплитуду пВПСП и ПС и отображать получаемые графики в режиме реального времени. Средствами виджетов JupyterLab реализован графический интерфейс пользователя, позволяющий контролировать процесс эксперимента.

Используемая система JupyterLab является современной, веб-ориентированной программной средой с широкой поддержкой и имеет большой набор готовых библиотек для вычислений и визуализации, что способствует эффективной реализации процедур анализа данных. Особенностью предлагаемого нами подхода является интеграция процесса приема, визуализации и обработки результатов экспериментов на основе единой высокоуровневой среды, что упрощает и унифицирует процесс разработки программных средств для автоматизации эксперимента и обработки экспериментальных данных.

Библиографические ссылки

1. Denisov A.A., Bulai P.M., Pitlik T.N., Molchanov P.G., Pashkevich S.G., Dosina M.O., Cherenkevich S.N. Patterns of Electrical Activity Generated by Biological Neural Network *in vitro* // Open semantic technologies for intelligent systems. 2018. P. 265–268.
2. Rebola N, Carta M, Mulle C. Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: implications for memory encoding // Nat. Rev. Neurosci. 2017. Vol. 18. P. 208-220.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ АФК-ЗАВИСИМОГО СЕНСОРА В СТРУКТУРЕ КАЛИЕВОГО КАНАЛА GORK

Новосельский И.Ю., Гриусевич П.В., Демидчик В.В.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Активные формы кислорода (АФК) участвуют как в процессах нормальной физиологии, так и в патофизиологических явлениях у высших растений [1]. Так, было показано, что некоторые ионные каналы способны выступать в качестве АФК-сенсоров в растительной клетке [2], однако до сих пор не известно, что выступает в роли мишени АФК в макромолекулярном комплексе канала. В настоящей работе представлены данные, совокупно подтверждающие наличие АФК-чувствительного сайта в комплексе K^+ -канала GORK. В данном исследовании использовались корни *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh четырех типов: 1) дикий тип Wassilevskija – ‘WS-0’; 2) нокаутные мутанты *gork1-1*, лишенные функционального белка GORK (1 линия); 3) *gork1-1* с возмещенным нативным GORK (2 линии); 4) *gork1-1*, экспрессирующий GORK с заменой C151S (3 линии). Были адаптированы стандартные электрофизиологические протоколы в режиме фиксации напряжения. Биоинформационный анализ структуры GORK показал его аналогию с ранее описанным K^+ -каналом SKOR, имеющим АФК-чувствительный центр и отвечающим за загрузку K^+ в сосуды ксилемы. Похожий центр был идентифицирован в структуре GORK (цистеин в положении 151). Анализ выходящих токов K^+ у растений дикого типа (WS-0) продемонстрировал наличие АФК-активируемых быстрых и медленных компонент в наружу-направленной проводимости плазматической мембраны. У растений-нокаутов *gork1-1*, лишенных функционального белка GORK, медленная компонента тока отсутствовала, а обработка смесью, генерирующей гидроксильные радикалы, не приводила к ее заметным изменениям. Для растений *gork1-1* с возмещенным нативным каналом GORK показана нормальная активация медленных наружу-направленных токов. Линии *gork1-1*, экспрессирующие GORK с заменой цистеина 151 на серин, демонстрировали снижение чувствительности к смесям, генерирующим гидроксильные радикалы. Таким образом было получено подтверждение того, что Цис-151 в комплексе наружу-выпрямляющего K^+ -канала GORK участвует в прямом взаимодействии с АФК и опосредует активацию данного канала в ответ на продукцию в среде АФК. Явление активации K^+ -канала GORK под действием АФК может потенциально вовлекаться в реакции, связанные с регуляторными функциями АФК, а также лежать в основе индукции запрограммированной клеточной гибели и автофагии в корне высших растений.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ЗЕЛЕННОЙ И КРАСНОЙ ОБЛАСТЕЙ СПЕКТРА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Плавский В.Ю., Микулич А.В., Барулин Н.В., Ананич Т.С., Собчук А.Н.,
Третьякова А.И., Плавская Л.Г., Леусенко И.А.

Институт физики имени Б.И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Изучение модулирующего действия лазерного излучения на клетки спермы животных в зависимости от длины волны представляет интерес как для выяснения вклада различных молекул–фотоакцепторов в реализацию фотобиологического эффекта, так и для практического применения методов фотобиомодуляции в репродуктивных биотехнологиях для увеличения вероятности оплодотворения ооцитов за счет повышения сохранности и подвижности сперматозоидов.

В настоящей работе, используя сперму осетровых рыб в качестве модельной системы, чувствительной к действию оптического излучения, впервые выполнены сравнительные исследования влияния низкоинтенсивного лазерного излучения зеленой (длина волны $\lambda = 532$ нм) и красной ($\lambda = 632.8$ нм) областей спектра одинаковой средней плотности мощности (3 мВт/см^2) на функциональные характеристики сперматозоидов. Наличие выраженных фотобиологических эффектов наблюдается через 24 и 48 часов после облучения спермы и последующего ее хранения в охлажденном состоянии. Подтверждения биомодулирующего действия излучения (по сравнению с контрольными, необлученными образцами) получены при анализе подвижности сперматозоидов, процента подвижных сперматозоидов в образцах спермы и эффективности фертилизации (оплодотворения икры). Указанные исследования выполнены с использованием компьютерной системы анализа параметров подвижности сперматозоидов, созданной на базе тринокулярного биологического микроскопа проходящего света и программного обеспечения MMC Sperm.

Показано, что в зависимости от энергетической дозы, излучение красной и зеленой областей спектра способно оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее влияние на подвижность сперматозоидов, что соответствует закону Арндта-Шульца. В то же время правило Бунзена–Роско о взаимозаменяемости времени и плотности мощности при обеспечении одинаковой энергетической дозы не выполняется. Вопреки распространенному мнению о больших перспективах использования излучения коротких длин волн в репродуктивных биотехнологиях (из-за более эффективного поглощения излучения клеточными хромофорами и повышенной генерации активных форм кислорода), получены убедительные доказательства более выраженного стимулирующего эффекта излучения красной области спектра. Среди возможных причин снижения стимулирующего эффекта при переходе от излучения красной к зеленой области спектра рассматривается повышенная наработка активных форм кислорода (АФК), способных при высокой концентрации оказывать ингибирующее действие на биологические системы. С использованием люминол-зависимой хемилюминесценции установлено образование АФК при воздействии на сперму лазерного излучения зеленой области спектра; при воздействии излучения красной области спектра эффективность генерации АФК практически не отличается от контроля.

Показано, что результат действия оптического излучения на сперму рыб (как и на другую биологическую систему) является балансом двух процессов: а) активации, реализуемой с участием ферментов дыхательной цепи, ионных каналородопсинов Opn3 , катионных каналов с транзитным рецепторным потенциалом TRP; б) наработкой АФК, способных играть активирующую сигнальную роль при малых концентрациях и ингибировать процессы при высокой концентрации АФК в клетках.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА КАРБОКСИФЛУОРЕСЦЕИНОВЫХ БИФЛУОРОФОРОВ

Поведайло В.А.¹, Тихомиров С.А.¹, Широканов А.Д.¹, Шманай В.В.², Яковлев Д.Л.¹

¹*Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Флуорофоры на основе флуоресцеина нашли широкое применение в биоаналитических исследованиях. При биоанализе в качестве флуоресцентных маркеров часто используются 5- и 6-карбоксифлуоресцеины (5-FAM, 6-FAM). Для увеличения чувствительности флуоресцентной регистрации анализируемого вещества нами синтезированы бифлуорофоры (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ на основе 5-FAM и 6-FAM, соединенных между собой линкером, что позволяет присоединять фактически два флуорофора на одну точку связывания мишени за счет ковалентной связи линкерной группы. Анализируемое вещество присоединяется к линкеру посредством [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения.

Измерения энергетических характеристик синтезированных бифлуорофоров в растворе показали, что интенсивность флуоресценции (6-FAM)₂ в 2,4 раза ниже интенсивности (5-FAM)₂ при прочих равных условиях. В работе проведены детальные исследования спектрально-кинетических и поляризационных характеристик синтезированных бифлуорофоров.

Спектры поглощения в буферном растворе первой электронной полосы обоих бифлуорофоров совпадают, а максимум спектра флуоресценции (5-FAM)₂ смещен в низкочастотную область на 6 нм по отношению к спектру (6-FAM)₂. Для мономерных форм в буферном растворе значения времен жизни сравнимы, а квантовые выходы для 6-FAM и 5-FAM равны соответственно 0,915 и 0,834. Времена жизни в возбужденном состоянии (5-FAM)₂ и его мономера составляют 4,17 нс, тогда как почти двукратное снижение значения τ , равное 2,18 нс, обнаружено у (6-FAM)₂.

Сходство спектральных характеристик в области перекрытия и существенные различия времен жизни возбужденных состояний бифлуорофоров могут быть связаны с конформационной структурой молекул в возбужденном состоянии, которая в значительной степени контролируется вязкостью среды. Для снижения конформационной подвижности проведены исследования (5-FAM)₂ и (6-FAM)₂ в водно-глицериновых растворах и в водных в присутствии поверхностно активного соединения Тритон X-100. Показано, что увеличение вязкости раствора сопровождается существенным ростом времени жизни возбужденных состояний, степени поляризации и интенсивности флуоресценции только у (6-FAM)₂. Полученный результат можно объяснить наличием большего числа доступных конформационных состояний для данного бифлуорофора в возбужденном состоянии по сравнению с (5-FAM)₂, что связано с наличием или отсутствием стерических препятствий для конформационной перестройки.

Проведены измерения относительных квантовых выходов флуоресценции (η^{rel}) комплексов 5-, 6-FAM и 5-, (6-FAM)₂, ковалентно связанных линкером с одноцепочечными олигонуклеотидами, и комплексов с моноклональным антителом во втором случае. Отношения квантовых выходов комплексов с участием мономерных флуорофоров практически совпадают, не зависят от типа линкера и близки к значению для мономерных меток. Иная картина наблюдается для комплексов с бифлуорофорными метками. Комплексы с меткой (6-FAM)₂ не снижают, а увеличивают η^{rel} по отношению к флуорофору, тогда как комплексы с меткой (5-FAM)₂ снижают η^{rel} .

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект Ф20В-003).

АНАЛИЗ СИСТЕМЫ ВЫХОДА K^+ ИЗ КЛЕТОК КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОФИЗИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ

Самохина В.В., Мацкевич В.С., Соколик А.И., Демидчик В.В.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Калий – важный макроэлемент, играющий первостепенное значение в жизни растений и выполняющий фундаментальные физиологические функции. Установление механизмов поддержания калиевого баланса в организме растений является важной задачей современной физиологии растений и биофизики. В последние годы показано, что выход K^+ из клеток опосредуется специализированными белками - K^+ -каналами. В настоящей работе детально исследована доминирующая группа калиевых каналов, обеспечивающих наружу-направленный поток K^+ в клетках корня высших растений - GORK (Guard cell Outwardly Rectifying K^+ channel). Нами выявлена уникальная особенность данного канала – способность активироваться под действием активных форм кислорода (АФК), которые генерируются в ответ на стрессовые воздействия и стимулы развития. В структуре канала GORK идентифицирован АФК-чувствительный центр (Цис-151), который участвует в активации выхода K^+ из клеток корня растений. Проведена генетическая модификация данного центра – Цистеин (Цис.-151) заменен на редокс-инертную аминокислоту – Серин (Сер.-151). Также проведено тестирование стресс-индуцированного выхода калия из клеток корня *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. с помощью радиоактивно-меченного трейсера ($^{86}Rb^+$) и проведено сравнение его у растений, обладающих нативным и генетически модифицированным Цис.-151. В работе также проведены глубокие исследования по фенотипированию растений-нокаутов по GORK и растений с заменой и возвратом АФК-чувствительного Цис.-151. Показано, что у растений дикого типа выход $^{86}Rb^+$ ускорялся под действием NaCl в 5 раз, смеси, генерирующей гидроксильные радикалы (Cu^{2+} /аскорбат) в 3 раза, H_2O_2 в 2,5 раза. Близкие значения увеличения скорости выхода изотопа были зарегистрированы в случае растений *gork1-1* с возмещенным GORK. В то же время, скорость стресс-индуцируемого потока $^{86}Rb^+$ была в 2 раза ниже у нокаутов по K^+ -каналу *gork1-1*, а также у *gork1-1*, экспрессирующих GORK с заменой Цис.-151 на Сер.-151. Эти данные свидетельствуют о том, что GORK напрямую вовлекается в выход K^+ в ответ на обработку NaCl, H_2O_2 и АФК. При этом сенсором выступает Цис.-151. Также продемонстрировано, что линии арабидопсиса *gork1-1* и *gork1-1*, экспрессирующие GORK с заменой Цис.-151 на Сер.-151, обладают пониженной чувствительностью к абиотическим стрессорам. Таким образом, в ходе проведенных опытов впервые выявлен и детально охарактеризован АФК-чувствительный центр в структуре GORK (Цис.-151), участвующий в конститутивной и стресс-индуцированной активации K^+ -каналов GORK под действием АФК. Показано, что устранение функционального Цис.-151 приводит к значительному снижению чувствительности растений к солевому, осмотическому и окислительному стрессу.

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОЙ МЕТКИ К PIP3

**Силинг Е.А.¹, Глухова А.А.², Мартьянов А.А.^{2,3}, Пантелеев М.А.^{2,3},
Свешникова А.Н.^{2,3}**

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

³Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, Россия

Введение. Фосфатидилинозитол-3-4-5-фосфат (PIP3) – фосфолипид внутреннего слоя мембран клеток эукариот, участвующий в процессах внутриклеточной сигнализации: пролиферации, аутофагии, изменении цитоскелета клеток, везикулярном транспорте. Регуляция происходит посредством прямого взаимодействия с мембранными белками, или с помощью мембранного рекрутирования цитозольных белков, имеющих специфичные домены (домены гомологии плекстрина – PH). [1] Вариабельность аминокислотного состава PH-домена связывают с функциональной эволюцией белков, его содержащих. Существующие метки к PIP3 обладают рядом недостатков: низкой аффинностью, дороговизной и сложностью подготовки препарата.

Методы. AQUA клонирование последовательности PH-домена белка GRP1 в плазмиду pET28a, содержащую кодирующую последовательность белка eGFP. При клонировании использовали штамм XL E.coli. Моделирование плазмиды и дизайн праймеров были выполнены на платформе benchling.com. Экспрессию рекомбинантного белка PH(GRP1)-EGFP осуществляли в штамме BL 21 DE3 E.coli, очистку белка производили на Ni-NTA колонке. Затем проводили диализ очищенного белка против PBSx1. Характеристику спектров поглощения и флуоресценции проводили при помощи спектрофотометрии и флуориметрии.

Результаты. Была получена плазида, содержащая последовательность химерного белка, состоящего из PH-домена GRP1 и eGFP. Плазида была амплифицирована в XL E.coli и очищена с помощью Miniprep. Экспрессия белка проводилась в штамме BL 21 DE3 E.coli. Белок был выделен, очищен на никелевой колонке и переведен в буфер PBS. Посредством флуориметрии и спектрофотометрии белок был проверен на соответствие спектру GFP.

Заключение. Была отработана методика получения рекомбинантных меток H(GRP1)-EGFP. В результате отработки получен белок, потенциально способный селективно связываться с PIP3, дифференцируя его от других фосфоинозитидов. Для подтверждения этого результата, необходимы дальнейшие эксперименты. Вес метки – 46 кДа.

Финансирование. Работа поддержана грантами РФФИ 17-00-00138 и 18-34-20026.

Библиографические ссылки

1. Mark A. Lemmon. Pleckstrin Homology (PH) domains and phosphoinositides // Biochem Soc Symp. 2007. Vol. 74. P. 81-93.

МЕХАНИЗМЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ВЫСШИЕ РАСТЕНИЯ

Смолич И.И., Лукашевич В.А., Демидчик В.В.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Наночастицы (НЧ) – твердые объекты с геометрических размером не превышающим 100 нм. Благодаря наноразмерности НЧ обладают рядом уникальных физико-химических свойств, таких как высокое соотношение площади к объему, способность по-особому взаимодействовать с электромагнитным излучением, каталитические характеристики, высокая мобильность в биологических системах. Большинство НЧ производится на основе тяжелых металлов и их оксидов. Наиболее распространенным наноматериалом, примерно 25% от всех производимых, является так называемое «наносеребро», в частности сферические частицы с размером 10-100 нм. Также очень широко используются медные НЧ. Целью настоящей работы являлось изучение закономерностей воздействия НЧ серебра и меди на высшие растения на уровне целого организма и отдельной клетки. В качестве объекта исследования использовались растения *Arabidopsis thaliana* L., представляющие собой важнейшее модельное растение в современной экспериментальной биологии. Были протестированы наночастицы серебра и меди одинаковых размеров (около 40 нм в диаметре). В ходе проведенных экспериментов было установлено, что НЧ серебра и меди оказывают ингибирующее действие на рост корней и листьев арабидопсиса. Для НЧ серебра эффект на рост основного корня регистрировался при 300 мг/л, достигая максимума при 3000-5000 мг/л. Для НЧ меди порог концентраций, которые оказывают ингибирующее действие был ниже: 5 мг/л вызывало примерно 30% снижение скорости роста корня, а при 15 мг/л – 60%. Измерение площади листа производилось при помощи CCD-камеры в реальном времени в течение 9 суток параллельно с измерением параметра Fv/Fm (максимального квантового выхода фотосистемы II). Было показано, что НЧ серебра и меди оказывают ингибирующее влияние на рост листа, при этом эффект наблюдался при несколько более высоких концентрациях наночастиц в среде, чем для корня. Параметр Fv/Fm, отражающий эффективность работы фотосинтетического аппарата, значительно снижался под действием НЧ металлов (в среднем на 70-80%). Введение НЧ в окружающий раствор практически мгновенно активировало увеличение уровня цитоплазматической активности Ca^{2+} в клетках корня. Данный эффект снимался блокаторами неспецифических Ca^{2+} -проницаемых катионных каналов. При добавлении НЧ также наблюдалась генерация активных форм кислорода клетками корня. Опыты с использованием техники пэтч-кламп показали, что НЧ способны активировать особую группу Ca^{2+} -проницаемых каналов, которые по свойствам были схожи с механочувствительными катионными каналами, ранее обнаруженными в данной системе. Также были проведены тесты с использованием спектроскопии электронно-парамагнитного резонанса. Они продемонстрировали, что ионы серебра не способны катализировать генерацию гидроксильных радикалов в корне, но могут вызывать окисление аскорбиновой кислоты в интактной растительной клетке. Таким образом, проведенные исследования показали, что НЧ металлов вызывают ингибирующее влияние на рост растений и фотосинтез. Они могут быть распознаны растительной клеткой при помощи классических сигнальных путей, таких как Ca^{2+} - и АФК-зависимая регуляция. Наночастицы металлов, вероятно, активируют механочувствительные каналы плазматической мембраны клеток корня, а также разрушают важнейший антиоксидант клетки – аскорбиновую кислоту.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ НИЗКОЧАСТОТНЫМ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫМ ПОЛЕМ НАНОМАСШТАБНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ И МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТИ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ

**Стародубцева М.Н.^{1,2}, Челнокова И.А.^{1,2}, Шклярова А.Н.¹, Цуканова Е.В.¹,
Егоренков Н.И.², Чешик И.А.^{1,2}**

¹ГНУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси», Гомель, Беларусь

²УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

Понимание механизмов биологических эффектов низкочастотного электромагнитного поля, производимого электрическими сетями и различными приборами, важно для создания гигиенически комфортных условий жизни человека. В научной литературе имеются противоречивые данные о влиянии низкочастотных электромагнитных полей на живые клетки, включая влияние на генный материал клеток, на их выживаемость и пролиферацию, а также на различные клеточные сигнальные пути. Вопросы изменения механических свойств клеток, состава и состояния их поверхностного слоя при действии низкочастотного электромагнитного поля практически не изучались. Цель работы – выявление изменения параметров структуры и механических свойств поверхностного слоя эритроцитов и лимфоцитов крови после однократного воздействия электромагнитным полем частоты 50 Гц. Смешанную артериально-венозную кровь крысы линии Wistar, полученную при декапитации на фоне глубокого эфирного наркоза, подвергали действию электромагнитного поля (50 Гц, 0,79 мТл) в течение 30 минут и 2 ч. В качестве контроля использовали кровь, хранящуюся при тех же условиях, но в отсутствии электромагнитного поля. Выделенные из крови эритроциты и лимфоциты фиксировали 1% раствором глутарового альдегида и высушивали при комнатных условиях. Атомно-силовую микроскопию проводили с использованием микроскопа Bioscope Resolve (Bruker) с инвертированным световым микроскопом Axio Observer в режиме сканирования PeakForce QNM иглой-зондом SCANASYST-AIR (радиус 2 нм). Для количественного анализа параметров свойств (модуля упругости, силы адгезии, параметра диссипации энергии) записывали сканы размером 250 нм×250 нм с разрешением 256×256 пикселей со скоростью 0,3 Гц.

Карты распределения механических свойств для наномасштабных участков поверхности эритроцитов характеризуются наличием определенной структуры, соответствующей ячеистой структуре мембранного скелета (актин-спектриновой сети). Электромагнитное поле (30 мин) вызывает увеличение вариабельности наномасштабных структур для разных клеток в популяции, что ведет к неоднородности в распределении клеток по механическим свойствам: появляются клетки, как с меньшими, так и большими в сравнении с контрольными значениями модуля упругости и сил адгезии. Карты механических свойств для поверхности лимфоцитов на участках 250 нм×250 нм имеют более тонкую однородную структуру. При действии электромагнитного поля (30 мин) наблюдается увеличение, как модуля упругости, так и силы адгезии в сравнении с параметрами для контрольных лимфоцитов. При этом для всех выборок значение силы адгезии для лимфоцитов существенно меньше значения силы адгезии для эритроцитов. При хранении крови в течение 2 ч при комнатных условиях модуль упругости и силы адгезии для поверхности эритроцитов и лимфоцитов увеличиваются, а в присутствие электромагнитного поля увеличение этих параметров существенно меньше. Выявленные наномасштабные изменения структуры и механических свойств поверхностного слоя форменных элементов крови указывает на существенное вовлечение кортикального цитоскелета в формирование их стрессового и адаптационного ответов при действии низкочастотного электромагнитного поля на кровь *in vitro*.

ОСОБЕННОСТИ МОДИФИКАЦИИ РАБОТЫ ИОННЫХ КАНАЛОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ РАСТЕНИЙ НА СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ БРАССИНОСТЕРОИДЫ

Стрельцова Д.Е.¹, Жабинский В.Н.², Хрипач В.А.², Демидчик В.В.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Понимание механизмов регуляции ионных каналов важно для оптимизации и рационального использования минеральных удобрений, направленной регуляции количества и качества урожая, разработки генно-инженерных подходов повышения стрессоустойчивости растений. Паттерн пассивной ионной проводимости плазматической мембраны растений формируется в результате тканеспецифичной и дифференцированной экспрессии ионных каналов. В последние годы предполагается, что фитогормоны выступают в роли важнейших регуляторов данного паттерна, а именно пространственного и временного (онтогенетического) распределения ионных каналов в клетках и тканях растений. В настоящей работе впервые рассмотрен вопрос о том, каким образом активность катионных каналов растений *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. модифицируется на фоне повышенного содержания в среде культивирования стероидных фитогормонов – брассиностероидов (БС). Использованы условия выделения внутрь-направленных Ca^{2+} - и наружу-направленных K^{+} -токов (наружный раствор: 20 мМ Ca^{2+} ; внутренний раствор пэтч-пипетки: 80 мМ K^{+}), позволившие детально исследовать работу деполяризационно-активируемых K^{+} -каналов, а также гиперполяризационно-активируемых и потенциал-независимых Ca^{2+} -проницаемых катионных каналов. В контрольных условиях протопласты, выделенные из корня *Arabidopsis thaliana* (Col-0), демонстрировали стандартные по величине входящие и выходящие катионные токи, демонстрирующие мгновенно- и медленно-активирующуюся компоненту. В области деполяризующих напряжений наблюдалась активация выходящего калиевого тока, усиливающаяся со временем. Данный ток сохранял стабильность более одного часа, что позволило провести его детальный анализ. В результате было показано, что выращивание растений из семян в условиях *in vitro* на фоне 10 нМ 24-эпибрассинолида (24-ЭБ) приводило к снижению амплитуды внутрь- и наружу-направленных токов. Проводимость мембраны, рассчитанная по ветвям входящего и выходящего тока, уменьшалась приблизительно в 2 раза. Культивирование растений на среде с добавлением 24-эпикастестерона (24-ЭК) (10 нМ) активировало наружу- и внутрь-направленные токи. В этом случае рассчитанная по ветви входящего тока проводимость плазматической мембраны протопластов увеличивалась приблизительно в 4,3 раза, а рассчитанная по ветви выходящего тока – примерно в 3 раза. Таким образом, было показано, что БС при добавлении в среду культивирования модифицируют работу ионных каналов, что вероятно может приводить к изменению процессов роста и развития растений.

ВЛИЯНИЕ ГРАВИСТИМУЛЯЦИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ КАЛЬЦИЙ-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ ВЕРХУШЕЧНЫХ ЛИСТЬЕВ ТОМАТА

Суховеева С.В., Кабачевская Е.М., Волоотовский И.Д.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Актуальной проблемой современной биологии растений является изучение молекулярно-генетических особенностей развития гравитропической реакции - направленного роста растительных органов относительно вектора гравитации. Особый интерес представляет исследование аспектов трансдукции отрицательного гравитропического сигнала в надземных органах растений. Ионы кальция – один из ключевых компонентов сигнальной системы растительного организма, контролирующей самые разнообразные процессы в растительной клетке. Существующие на данный момент представления о механизмах участия кальций-связывающих белков на транскрипционном уровне в формировании гравитропической реакции растений оказываются недостаточными для составления целостной и полной картины путей и механизмов развития реакции на молекулярно-биологическом уровне, поэтому актуальным представляется проведение исследований в этом направлении.

Предположительно, генами, участвующими в формировании гравитропического ответа листьев растений, могут являться гены изоформ кальций-связывающего белка кальмодулина *CAM2*, *CAM3*, а также ген *PBPI* (PINOID-binding protein 1), кодирующий белок, связывающий серин/треониновую киназу PINOID в ответ на изменение содержания ионов кальция.

С целью оценки уровня относительной экспрессии *CAM2*, *CAM3* и *PBPI* при действии гравистимула изучали влияние на экспрессию этих генов поворота растений томата на 90° относительно гравитационного вектора. Для исключения побочного эффекта изменений условий освещенности после поворота растений горизонтально и возможного развития дополнительной фототропической реакции на экспрессию изучаемых генов, перед началом гравистимуляции растения помещали в темноту на 24 ч для их адаптации к темноте. Оценку изменений экспрессии проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени путем определения изменений экспрессии данных генов на транскрипционном уровне.

Обнаружено, что в клетках листьев томата увеличение уровня экспрессии *PBPI* регистрируется во временном промежутке 3-24 ч, *CAM3* - 6-24 ч, а у *CAM2* через 3 ч после начала воздействия гравистимуляции по сравнению с контрольной группой растений.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов были обнаружены изменения генной экспрессии исследованных генов на уровне транскрипции в надземных органах растения, причем не в месте непосредственного гравитропического изгиба стебля томата, а в клетках его верхушечных листьев. Это указывает, в частности, на то, что развитие гравитропической реакции наблюдается даже в органах растений, в которых отсутствует видимый визуальный эффект ростовой реакции. Полученные данные свидетельствуют о возможном участии в формировании реакции отрицательного гравитропизма в листьях растений томата генов, ассоциированных с белками кальций-зависимых сигнальных систем.

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСПОРТНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Тамашевский А.В.

*ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”,
Минск, Беларусь*

Известно, что основным методом лечения онкогематологических заболеваний является интенсивная химиотерапия. Однако, несмотря на высокий процент ремиссий, количество пациентов-долгожителей оказывается не таким значительным. Кроме того, что химиотерапия может являться причиной тяжёлых побочных эффектов, особенно у пожилых людей, её неэффективность может обуславливаться феноменом множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) – невосприимчивости клеток опухоли одновременно к целому ряду лекарственных средств с широким спектром механизмов воздействия на внутриклеточные мишени. Это явление связывают с функционированием АТФ-зависимых транспортеров суперсемейства ABC, которые снижают внутриклеточную концентрацию лекарственных соединений путем их выброса из клеток с использованием энергии гидролиза АТФ. К настоящему времени у человека выявлено 48 представителей ABC суперсемейства с различными физиологическими функциями и лишь три из них (Р-гликопротеин (Р-gr), белок множественной лекарственной резистентности 1 (MRP1) и белок, ответственный за резистентность клеток рака молочной железы (BCRP)) непосредственно связаны с фенотипом МЛУ.

Конститутивная экспрессия транспортеров МЛУ отмечена во многих органах и тканях человеческого организма, в том числе и в лимфоцитах периферической крови (за исключением BCRP), однако их физиологическая функция до сих пор точно не определена. Тем не менее, значимость роли ABC транспортеров в поддержании клеточного гомеостаза подчеркивает тот факт, что почти треть дефектных ABC генов человека связана с заболеваниями.

В наших работах, где в качестве объектов исследований были выбраны лимфоциты периферической крови здоровых доноров и пациентов при хроническом В-лимфоцитарном лейкозе (В-ХЛЛ), впервые был установлен характер регуляции функциональной активности Р-gr и MRP1 с помощью окислительно-восстановительного баланса (ОВБ). Обнаружено, что в интактных клетках как в норме, так и при лейкозе увеличение пула активных форм кислорода (АФК) способно активировать, а его снижение – ингибировать транспортную активность Р-gr и MRP1. При изменении содержания АФК относительно физиологического диапазона в В-лимфоцитах доноров происходила инверсия в характере регуляции активности белков МЛУ. В тоже время в лейкозных В-клетках Р-gr и MRP1 были способны сохранять установленный характер регуляции в более широких диапазонах изменения ОВБ по сравнению с В-лимфоцитами доноров. Также было показано, что изменение ОВБ, вызванное воздействием применяемых при терапии В-ХЛЛ лекарственных средств, способно контролировать жизнеспособность В-лимфоцитов доноров в большей степени, чем лейкозных В-клеток.

Установлено, что функциональная активность мембранных белков Р-gr и MRP1 в лимфоцитах здоровых доноров, зависит от концентрации и латерального распределения холестерина в их мембранах. Причем, транспортная активность Р-gr лишь частично определяется содержанием холестерина, в то время как функционирование MRP1 в значительной степени зависит от концентрации свободного холестерина в плазматических мембранах лимфоцитов. Таким образом, различия в регуляции транспортной активности исследуемых белков МЛУ в лимфоцитах доноров и пациентов с В-ХЛЛ могут определяться как изначальным содержанием в них АФК, так и структурно-функциональным состоянием их мембран.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕРАЦИИ АФК ПРИ ВЫВЕДЕНИИ МИКРОКЛОНОВ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯ *EX VITRO*

Уснич С.Л., Наекова С.К., Колбанов Д.В., Мацкевич В.С., Пржевальская Д.А., Черныш М.А., Лазерко Н.В., Демидчик В.В.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Микроклональное размножения в условиях *in vitro* является одной из важнейших методик современной биотехнологии растений. Для промышленного производства многих видов декоративных древесных растений данная методика является доминирующей. Стадией, лимитирующей эффективность микроклонального размножения растений, является перевод микроклонов из условий *in vitro* в условия *ex vitro*, приводящий к гибели большей части растений. Не ясны физиологические основы данной гибели и не выработаны меры, устраняющие данное явление. Согласно выдвигаемой нами и некоторыми другими научными группами гипотезе причиной гибели растений при выводе в условия *ex vitro* является раневой и осмотический стресс, приводящие к генерации АФК и развитию окислительного стресса. Последний является индуцирующим фактором для некроза и запрограммированной клеточной гибели. Целью настоящей работы было исследование механизмов генерации АФК при переносе растений в условиях *ex vitro* у древесных растений и анализ воздействия на этот процесс низкомолекулярных антиоксидантов.

Объектами исследования являлись корни 10-дневных проростков *Arabidopsis thaliana*, а также трехмесячных микроклонов *Forsythia intermedia* и *Betula pendula* var. *Carelica*, выращенных в условиях *in vitro*. Уровень генерации АФК анализировался с помощью флуоресцентного зонда дигидроэтидиум, избирательно взаимодействующего с супероксидом (фильтр FITC). Использовался флуоресцентный микроскоп Nikon Eclipse TS100F.

Использование дигидроэтидиума совместно с фильтром FITC позволило высокоточно измерить сигнал 2-гидроксиэтидина (продукта прямого взаимодействия с супероксид-радикалом) в корнях, что важно для избегания артефактов, связанных с формированием комплексов этидиума и ДНК (не детектируемого FITC). Максимальный уровень супероксид-зависимой флуоресценции 2-гидроксиэтидина отмечался через 60 мин после переноса растений в условия *ex vitro*, после чего интенсивность флуоресценции снижалась. Экспозиция в течение 60 мин была в дальнейшем выбрана в качестве рабочей. Было исследовано влияние ферментативных (СОД, КАТ) и низкомолекулярных (тиомочевина, ДМСО) антиоксидантов, а также блокаторов Ca^{2+} -проницаемых катионных каналов (гадолиний) и кремниевых минералов (диатомит) на генерацию АФК в клетках корня арабидопсиса, форзиции и березы. Максимальный ингибирующий эффект на генерацию супероксида был обнаружен при обработке раствором тиомочевины (1 мМ), которая согласно литературным данным является гасителем гидроксильного радикала (HO^{\bullet}). Значительное воздействие на синтез супероксида также оказывала обработка диатомитом (10%) - кремний-содержащей горной породой, используемой в декоративном питомниководстве. На основе полученных данных были разработаны и протестированы приемы прайминга тиомочевинной и диатомитом при производстве посадочного материала декоративных древесных растений, показавшие высокую эффективность как в отношении жизнеспособности микроклонов, так и стимуляции корнеобразования.

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕРВНЫХ КЛЕТОК *LYMNAEA STAGNALIS*

Харитонов В.Р., Сидоров А.В.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Нервные клетки беспозвоночных характеризуются высокой степенью устойчивости к действию различных химических и физико-химических факторов [1]. Вместе с тем, по своим функциональным, связанным со способностью к генерации, проведению и интеграции электрических сигналов, характеристикам, они демонстрируют поразительное сходство с нейронами высших позвоночных. Очевидно, что понимание клеточных механизмов, определяющих такую резистентность, может быть использовано при разработке различных нейропротекторных средств, существенно повышающих вероятность нормального функционирования мозга в условиях стресса различного происхождения. Колебания редокс равновесия, в том числе и в нервной ткани, рассматривается в качестве основного фактора провоцирующего развитие разнообразных нарушений мозговых функций [2]. Целью данной работы было оценить взаимосвязь между морфологическими характеристиками культивируемых нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis* и их способностью противостоять накоплению активных форм кислорода (АФК) в условиях кратковременного окислительного стресса.

В работе использовали клеточный материал из состава центральных нервных ганглиев *Lymnaea*. Его выделение проводили путём разрыва соединительно-тканной оболочки нервного узла и последующего вымывания из него клеток, сопровождающегося механическим разделением последних. Дальнейшее культивирование проводили по модифицированной методике [3]. Для оценки внутриклеточного накопления АФК использовали флуоресцентный зонд 2',7'-дихлородигидрокси-флуоресцеин диацетат (DCFDA), в концентрации 10 мкМ (время инкубации с клетками 30 мин). Окислительный стресс инициировали добавлением 1 мМ перекиси водорода (конечная концентрация) в культуральную среду, содержащую FeSO₄ и ЭДТА (20 мкМ). Изображения получали на флуоресцентном микроскопе (Nikon, $\lambda_{ex/em}$ 505/525 нм), а их последующий анализ проводили посредством программы ImageJ. Статистическая обработка выполнена с использованием программы Statistica 6.0.

Добавление пероксида водорода приводит к быстрому, в течение 5 мин, возрастанию флуоресценции, однако уже по прошествии 15–20 мин её интенсивность снижается в 1,5–2 раза, сохраняясь на таком уровне в течение длительного (часы) промежутка времени. Установлено, что существует небольшая, статистически достоверная прямая зависимость интенсивности флуоресценции от размера нейронов, свидетельствующая о более интенсивном накоплении АФК в клетках большего объёма – значения коэффициента корреляции варьировались от 0,2 до 0,4 в зависимости от возраста культуры. В то же время, для клеток более «молодой» культуры (72 ч) была характерна меньшая, в 1,5 раза (достоверно, $z = 3,80$, $P = 0.0001$) интенсивность относительной (на ед. площади клетки) флуоресценции, по сравнению с нейронами «старой» культуры (144 ч). Предполагается, что степень антиокислительной защиты клеток нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* зависит от их морфо-функциональных характеристик.

Библиографические ссылки

1. Сидоров А.В. Функциональная активность нервных центров беспозвоночных. Минск: БГУ, 2011. 247 с.
2. Beal M.F. Aging, Energy, and Oxidative Stress // Ann. Neurol. 1995. Vol. 38. P. 357–366.
3. Fathi-Moghadam H., Winlow W. Comparative Effects of Halothane and Isoflurane on K⁺ and Ca²⁺ Currents // EC Neurology. 2019. Vol. 11.9. P. 741–749.

МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ ТЕПЛОВЫХ НЕЙТРОНОВ НА СВОЙСТВА СЕМЯН ХЛОПЧАТНИКА ПО ДАННЫМ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ

Ходжазода Т.А., Муллоев Н.У.

Российско-Таджикский (Славянский) университет, Душанбе, Таджикистан

Результаты исследования показывают, что облучение семян ионизирующим излучением приводит к улучшению энергии прорастания и всхожести [1].

В связи с тем, что для Таджикистана хлопок является стратегической агрокультурой, представляет интерес исследование проявлений закономерностей изменения энергии прорастания и всхожести, наблюдаемых у семян пшеницы и кукурузы в зависимости от дозы влияния нейтронного облучения на семена хлопчатника.

В данной работе исследованы механизмы влияния предпосевного нейтронного облучения на посевные качества семян хлопчатника в полевых условиях и проведён сравнительный анализ параметров их ИК- спектров.

Измерения ИК-спектров семян хлопчатника проводились в твёрдом кристаллическом состоянии в виде таблеток с КВг на инфракрасном спектрофотометре IRAffinity-1 с преобразованием Фурье [2].

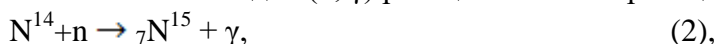
Анализ и обобщение полученных результатов показывают, что облучение тепловыми нейтронами семян хлопчатника приводит к существенному изменению их спектроскопических параметров. Причина изменения спектроскопических параметров полосы поглощения исследованных образцов, возможно, связана с изменением массы ядра атомов колеблющейся группы.

Распространенные виды ядерных реакций под действием нейтронов являются реакции радиационного захвата нейтронов типа (n, γ) :



Эти реакции с большой вероятностью идут под действием тепловых нейтронов [3].

Одним из возможных видов (n, γ) реакции является реакция типа



в результате которой появляется стабильный изотоп азота ${}_7N^{15}$.

Согласно [3], другой возможный канал ядерной реакции имеет вид



также идущий от тепловых нейтронов (${}_1p^1$ -протон).

По-видимому, при определенной дозе облучения за счет реакции (2) ${}_7N^{14}$ преобразуется в ${}_7N^{15}$ в результате чего массы ядра атомов колеблющейся группы увеличиваются и, соответственно, происходит понижение частоты колебаний колеблющейся группы. Дальнейшее увеличение дозы облучения приводит к реакции типа (3) и увеличению концентрации атомов ${}_6C^{14}$.

Библиографические ссылки

1. Серегина М.Т., Орлов В.В., Батыгин Н.Ф. Стабильность воспроизведения стимуляционного эффекта при предпосевном облучении семян сельскохозяйственных растений // Радиобиология. 1982. Т. XXII, вып. 4. С. 507-511.
2. Прикладная инфракрасная спектроскопия / под. ред. Д. Кеделла. М.: Химия, 1970. 376с.
3. Мухин К.Н. Экспериментальная ядерная физика. М: Изд-во «Атомиздат», 1974. 584с.

СТРУКТУРНЫЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОВЕРХНОСТНОГО СЛОЯ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫСЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ ПРОМЫШЛЕННОЙ ЧАСТОТЫ

**Цуканова Е.В.¹, Шклярова А.Н.¹, Челнокова И.А.^{1,2},
Горох Г.А.¹, Стародубцева М.Н.^{1,2}**

¹Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Беларусь

²Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Промышленные и домашние электрические сети и электроприборы являются основными источниками электромагнитных полей промышленной частоты (ЭМП ПЧ) в жизни человека. В большинстве европейских стран используется переменный ток с частотой 50 Гц.

Целью работы являлась оценка изменения параметров структурных и механических свойств поверхности моноклеарных клеток крови крысы после однократного воздействия ЭМП ПЧ (50 Гц), измеренных с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Обработку ЭМП ПЧ цельной крови крысы линии Wistar проводили *in vitro* с помощью экспериментальной установки с использованием катушки Гемгольца (50 Гц, 0,79 мТл). Моноклеары крови выделяли на градиенте плотности Histopaque-1077. Суспензию клеток помещали на стекла с адгезивным покрытием, инкубировали 15 мин (37 °С), добавляли 1% глутаровый альдегид (15 мин, 37 °С), отмывали и высушивали при комнатной температуре. Изучение структурных и механических свойств поверхности клеток проводили на атомно-силовом микроскопе BioScope Resolve в режиме картирования наномеханических свойств PeakForce QNM на воздухе и оптическом микроскопе Axio Observer 3. Использовали зонд ScanAsyst-Air (R=2нм).

По данным световой микроскопии отмечено увеличение диаметра лимфоцитов, подвергнутых воздействию ЭМП промышленной частоты на протяжении 30 минут. При этом инкубация клеток в течении 120 минут в ЭМП ПЧ не привела к существенным изменениям диаметра лимфоцитов. Изучение механических свойств наноразмерных участков (250 нм×250 нм, 256×256 пикселей) клеточной поверхности с помощью АСМ показало, что кратковременное воздействие ЭМП ПЧ (30 минут) оказало влияние на модуль упругости клетки – он имеет показатель ниже контрольного. Однако продолжительная (120 минут) инкубация клеток в электромагнитном поле увеличивает данный параметр. Так же было отмечено увеличение (почти в 2 раза относительно контроля) силы адгезии поверхности клеток при воздействии ЭМП промышленной частоты на протяжении 120 минут.

Из полученных данных следует, что однократное кратковременное (30 мин) воздействие электромагнитного поля носит положительный характер на поддержание механических свойств лимфоцитов при инкубации *in vitro*. Изменения параметров структурных и механических свойств поверхности лимфоцитов после однократного воздействия ЭМП с частотой 50 Гц имеют тенденцию к определению электромагнитного поля как стресс-фактора и адаптации клеток к его воздействию.

РАДИКАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В СТРУКТУРАХ КЛЕТКИ

Шаповалов Ю.А.

Казахский национальный университет им. аль Фараби, г.Алматы, Республика Казахстан

Основные биокаталитические процессы, протекающие в клетках, невозможны без образования и участия в них свободных радикалов. Ежедневно каждая клетка генерирует огромное количество биоорганических соединений, обладающих естественно радикальной природой, которые затем участвуют в жизненно важных окислительно-восстановительных ферментных реакциях, связанных с отдачей или приобретением электронов, происходящих в полиферментных комплексах клетки. Основными, из ряда переносчиков redox эквивалентов в клетках, являются коферменты: NAD^+ , NADP^+ , FAD, FMN, CoQ. Приобретая электрон от субстрата, коферменты восстанавливаются и, обратно, при отдаче электрона наблюдается их окисление. Перенос энергии и электронов в фермент-кофакторном комплексе протекает через систему образования комплексов с переносом заряда (КПЗ). Коферменты в фермент-кофакторных комплексах приобретают промежуточные свободно-радикальные хиноидные и семихиноидные формы: $\cdot\text{NAD}$, $\cdot\text{NADP}$, $\cdot\text{FAD}$, $\cdot\text{FMN}$, $\cdot\text{CoQ}$. Радикальный трансмембранный перенос протонов и электронов сопровождается ферментативной регенерацией коферментов.

Важную роль в процессах переноса энергии и электронов в активный центр биокатализаторов выполняют радикалы природных пигментов каротиноидов, которые способны нековалентно связываться с белками, кофакторами и мембранными липидами, образуя КПЗ. Ряд каротиноидов образуют комплексные соединения с ионами металлов: Ca^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} и Hg^{2+} . Каротиноиды, в основном, локализируются в липофильной области биологической мембраны (БМ), образуя стабильные каротино-белковые комплексы; они модулируют физические свойства мембран, расширяя диапазон фазового перехода из состояния геля в жидкокристаллическую структуру. Одноэлектронный характер взаимодействия каротиноидов и их комплексов с хинонами и образование КПЗ в реакциях β -каротина, кантаксантина и 8'-апо- β -каротина-8'-аля с хинонами были изучены методом оптической спектроскопии и электронного парамагнитного резонанса [1].

Исследовалось образование КПЗ между β -каротином и липидом - кардиолипином. Существенное расширение (до 100 нм) полосы поглощения β -каротина в длинноволновую область наблюдается при образовании комплекса кардиолипина с β -каротином и незначительное до 30 нм для комплекса β -каротин-лецитин. Проведенные экспериментальные исследования показали, что система каротин-липид способна образовывать КПЗ, посредством которого возможен электронный перенос через липидо-каротиноидную структуру БМ. Эффективность электронного переноса через липидо-каротиноидную структуру существенно возрастет при воздействии на неё квантов света, что можно наблюдать в процессах фотосинтеза, протекающих в тилакоидах хлоропластов. Анализ спектра поглощения указывает на то, что комплексы каротина с коферментами, могут выполнять активную светособирающую функцию при фотосинтезе в области длин волн в диапазоне от 350 до 500 нм, а также 770-1100 нм. Причем возможен перенос энергии от хлорофиллов А и В на комплекс каротиноида с коферментом, что не нарушает правило передачи энергии от пигмента с меньшей длиной волны к пигменту с большей длиной волны. В диапазоне спектра 440-770 нм светособирающую функцию выполняют хлорофилл А и хлорофилл В.

Библиографические ссылки

1. Поляков Н.Э., Лёшина Т.В. Некоторые аспекты реакционной способности каротиноидов // Успехи химии. 2006. Т.75. С. 1175-1192.

СЕРОВОДОРОД КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПОСРЕДНИК ИНДУЦИРОВАНИЯ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ЭКЗОГЕННОЙ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

Шкляревский М.А.¹, Карпец Ю.В.¹, Швиденко Н.В.¹, Колупаев Ю.Е.^{1,2}

¹Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков, Украина,
e-mail: plant_biology@ukr.net

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, Харьков, Украина

Салициловая кислота (СК) является одним из фитогормонов, задействованных в формировании устойчивости растений к стрессорам различной природы. Во многих работах показана возможность индуцирования экзогенной СК устойчивости растений к экстремальным температурам, обезвоживанию, засолению, действию тяжелых металлов и других стрессоров. Ее защитные эффекты реализуются с участием ряда сигнальных посредников, в том числе активных форм кислорода и оксида азота [1, 2]. Однако на участие H₂S как посредника физиологического (стресс-протекторного) действия СК указывают лишь единичные экспериментальные данные [3]. При этом связь между состоянием ключевой протекторной системы – антиоксидантной – и изменением эндогенного содержания H₂S в ответ на обработку растений СК специально не исследовалась. Целью работы было изучение возможного участия H₂S в индуцировании СК антиоксидантной системы проростков пшеницы и развитии их теплоустойчивости.

Для исследований использовали 4-суточные (на момент начала эксперимента) проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала. Обработка проростков 1 и 10 мкМ СК или 0,1 и 0,25 мМ донором сероводорода (NaHS) вызывала повышение их устойчивости к повреждающему прогреву (10 мин при 45°C). При этом под влиянием СК происходило транзитное увеличение содержания сероводорода в корнях с максимальным эффектом через 2–3 ч после начала обработки. Обработка корней СК вызывала повышение в них активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и гваяколпероксидазы. Под влиянием донора сероводорода NaHS существенно повышалась активность СОД и каталазы. Также обработка корней проростков СК и NaHS уменьшала вызываемое прогревом накопление продуктов пероксидного окисления липидов. Ингибиторы синтеза сероводорода гидроксилламин и пируват калия частично устраняли вызываемые СК эффекты повышения активности антиоксидантных ферментов и развития теплоустойчивости проростков. В то же время комбинированная обработка 10 мкМ СК и 0,1 мМ NaHS способствовала дополнительному увеличению активности антиоксидантных ферментов и повышению выживаемости проростков после прогрева. Полученные результаты дают основания полагать, что сероводород участвует в процессе индуцирования теплоустойчивости проростков пшеницы экзогенной СК. Вероятно, что эти эффекты реализуются в тесной функциональной связи с другими сигнальными посредниками, в частности, с АФК и оксидом азота, количество которых в растительных клетках также изменяется при действии СК [1, 2]. Характер такого взаимодействия H₂S с другими компонентами сигнальной сети при реализации физиологических эффектов СК может стать предметом дальнейших исследований.

Библиографические ссылки

1. Колупаев Ю.Е. и др. Индукция теплоустойчивости coleoptилей пшеницы салициловой и янтарной кислотами // Прикл. Биохим. и микробиол. 2012. Т. 48, № 5. С. 550–556.
2. Fang H., Liu Z., Long Y., Liang Y., Jin Z., Zhang L., Liu D., Li H., Zhai J., Pei Y. The Ca²⁺/calmodulin2-binding transcription factor // Plant J. 2017. V. 91, № 6. P. 1038–1050.
3. Li Z.-G., Xie L.-R., Li X.-J. Hydrogen sulfide acts as a downstream signal molecule // J. Plant Physiol. 2015. V. 177. P. 121–127.

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

STRUCTURAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF THE SURFACE OF ERYTHROCYTES AFTER INTRAVITREAL ADMINISTRATION OF ANTIFUNGAL DRUGS TO RABBITS

Shkliarava N.M.¹, Chelnokova I.A.^{1,2}, Karachrysafi S.³, Papamitsou Th.³, Sioga A.³, Komnenou A.⁴, Karampatakis V.⁵, Starodubtseva M.N.^{1,2}

¹Institute of Radiobiology of the NAS of Belarus, Gomel, Belarus, ²Gomel State Medical University, Gomel, Belarus, ³Laboratory of Histology and Embryology, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece, ⁴School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece, ⁵Laboratory of Experimental Ophthalmology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

The frequency of fungal infections is increasing every year, which is a worldwide significant medical and social problem. Fungal endophthalmitis is a serious vision-threatening infection. Intravitreal administration of antifungal agents is one of the dominant therapeutic approaches in this ocular disease. For the treatment of mycoses, drugs different by origin, mechanism of action, indications for use and methods of administration are used, which lead to various negative side effects on the whole body. Antifungal drugs act on blood cells changing their functional properties. Atomic force microscopy (AFM) is used to study various properties of the cell surface at nano- and microscale levels, including the parameters of surface topography, distribution of friction forces, adhesion, and elasticity. The purpose of the study is to reveal the changes in the structure and mechanical properties of the surface of peripheral blood erythrocytes after intravitreal (IV) administration of two antifungal agents, micafungin and voriconazole, in an animal model. Experiments were conducted on New Zealand White Rabbits. Solutions of micafungin, voriconazole or balanced salt solution were injected into the mid-vitreous of the rabbits' eyes (study groups and control group, correspondingly). Blood sampling was performed after 10 days from the last IV injection. Erythrocytes were fixed with 1% glutaraldehyde (37 °C, 15 min) and dried. Scanning was performed using a Bruker BioScope Resolve AFM in a contact mode in air (DNP-10 probe). We recorded images of the whole cells and small surface areas of 2.5 µm × 2.5 µm, 256×256 pixels.

Administration of antifungal drugs to a rabbit led to a significant change in the distribution of erythrocyte shapes in the blood: for double administration of micafungin spherocytosis up to 10-32% and for sequential administration of micafungin and voriconazole echinocytosis up to 12-97% were revealed. When analyzing AFM images of small areas of the erythrocyte surface of animals after antifungal drug administration, qualitative and quantitative changes in the parameters of the distribution of sliding friction forces between the tip of the AFM probe and the cell surface were detected. On the surface of many cells, the presence of membrane defects such as holes or small areas with frictional properties sharply distinguished compared to ones of surrounding was observed. The size of the defects was about 150 nm. Quantitative comparison of the parameters of friction forces for microscale areas of the cell surface of the control sample and study samples showed significant differences in average values of friction forces and roughness of the maps of friction forces. The roughness of friction force maps for discocytes and echinocytes of both study samples was significantly higher than the corresponding parameter for discocytes of the control sample. The average values of friction forces for spherocytes and discocytes of both study samples and echinocytes of the sample using voriconazole were significantly reduced in comparison with friction forces typical for control discocytes. These data indicate significant changes of the structure and properties of the membrane skeleton and the mechanical behavior of erythrocytes when using such antifungal agents as micafungin and voriconazole, which occurs in the long-term period after administration of the drugs and represents a potential possibility for violation of tissue blood supply.

ГИПЕРГЛИКЕМИЯ ИНИЦИИРУЕТ НЕТОЗ В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Басырева Л.Ю., Федорова Е.А., Гусев С.А., Панасенко О.М.

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Нетоз – вид программируемой клеточной гибели, происходящей у нейтрофилов и сопровождающийся выбросом нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ). Известно, что повышение концентрации глюкозы в крови (гипергликемия) влияет на активацию нейтрофилов и образование НВЛ, однако эти данные противоречивы. С одной стороны, есть указания на то, что гипергликемия приводит к активации нейтрофилов и выбросу НВЛ [1], с другой – ингибирует образование НВЛ [2]. Как известно, НВЛ могут приводить к повреждению эндотелиальных клеток сосудов [3], формированию микротромбов и препятствовать заживлению ран при сахарном диабете [4, 5]. Кроме того, наши данные показали, что при сахарном диабете 2 типа (СД2Т) с гнойно-некротическими осложнениями нижних конечностей тяжелое течение заболевания ассоциируется с повышенным количеством НВЛ в крови [6]. В связи с этим исследование влияния гипергликемии на активацию нейтрофилов и образование НВЛ приобретает важное значение.

Учитывая это, мы провели изучение влияния повышения концентрации глюкозы на способность нейтрофилов образовывать НВЛ в цельной крови доноров *ex vivo*. Количественную оценку НВЛ в крови проводили через 2 часа инкубации при 37°C в соответствии с предложенным нами методом, основанным на подсчете лейкоцитов и НВЛ в средней части стандартизованных мазков крови, окрашенных по Романовскому [7]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ STATISTICA 6.0. Содержание НВЛ в крови с уровнем глюкозы 5, 15 и 30 мМ составило, соответственно, 272±29, 452±34 и 690±42 НВЛ в 1 мкл крови. То есть, увеличение концентрации глюкозы приводит к росту количества НВЛ в крови.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что гипергликемия, инициируя образование НВЛ, может рассматриваться как пусковой фактор развития внутрисосудистой патологии. Кроме того, при выборе тактики лечения СД2Т необходимо учитывать концентрацию НВЛ в крови пациентов и не применять препараты, увеличивающие количество НВЛ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, грант № 20-15-00390.

Библиографические ссылки

1. Menegazzo L., Ciciliot S., Poncina N. et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes // *Acta Diabetol.* 2015. Vol. 52. P. 497–503.
2. Jafar N., Edriss H., Nugent K. The Effect of Short-Term Hyperglycemia on the Innate Immune System // *Am. J. Med. Sci.* 2016. Vol. 351. P. 201–211.
3. Handono K., Sidarta Y.O., Pradana B.A. et al. Vitamin D prevents endothelial damage induced by increased neutrophil // *Acta Med. Indones.* 2014. Vol. 46. P. 189–198.
4. Collison J. Increased Risk of Rheumatic Disease in IPAF // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2019. Vol. 15. N. 6. P. 317.
5. Wong S.L., Demers M., Martinod K. et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing // *Nature medicine.* 2015. Vol. 21. P. 815–819.
6. Максимов Д.И., Басырева Л.Ю., Гусев А.А. и др. Циркулирующие нейтрофильные внеклеточные ловушки у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа // *Медицинский академический журнал.* 2018. Т. 18. № 2. С. 72–77.
7. Basyreva L.Y., Brodsky I.B., Gusev A.A. et al. The effect of Intravenous Immunoglobulin on *ex vivo* activation of human leukocytes // *Hum. Antibodies.* 2016. Vol. 24, № 3–4. P. 39–44.

АКТИВНОСТЬ КАСПАЗЫ-3 И ЭКСПОНИРОВАНИЕ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА В ЭРИТРОЦИТАХ ПОДРОСТКОВ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ

Белевич Е.И.¹, Климкович Н.Н.², Козарезова Т.И.², Слобожанина Е.И.¹

¹ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

²ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь

Наиболее часто встречающейся формой анемических состояний является железодефицитная анемия (ЖДА) – патологическое состояние, при котором наблюдается снижение количества железа в организме и нарушение синтеза гема. При ЖДА происходит снижение эритропоэза, формирование «дефектных» эритроцитов с низким содержанием гемоглобина и уменьшение продолжительности их жизни [1], последнее может быть связано с запуском эриптоза. Особенно подвержены возникновению ЖДА женщины репродуктивного возраста и дети [2]. Одним из последствий анемии является гипоксия тканей, которая приводит к окислительному стрессу. Ранее нами было показано, что окислительный стресс в эритроцитах *in vitro* сопровождается активацией каспазы-3, а в образцах крови взрослых пациентов с ЖДА выявлено увеличение числа эритроцитов с активированной каспазой-3 и экспонированным фосфатидилсерином (ФС) – маркером эриптоза [3]. Происходит ли увеличение активности каспазы-3 в эритроцитах подростков с ЖДА не известно.

Цель данного исследования – оценить возможный вклад активированной каспазы-3 в развитие процесса эриптоза при ЖДА у подростков.

В работе использованы образцы крови подростков с ЖДА (возраст 12–17 лет), предоставленные ГУ «Республиканская детская больница медицинской реабилитации». Клетки с экспонированным ФС определяли по интенсивности флуоресценции FITC-меченного аннексин-V. Активность каспазы-3 определяли с помощью набора CaspGlowTM, содержащего специфический флуорогенный субстрат каспазы-3 – FITC-DEVD-fmk. Измерения выполнены с помощью проточного цитофлуориметра BD FACS Canto II (Becton Dickinson, США).

Показано, что в крови подростков с ЖДА наблюдается увеличение как количества эритроцитов с экспонированным ФС, так и клеток с активированной каспазой-3. Так аннексин-V-положительные клетки составляли $6,3 \pm 0,4\%$ от общей эритроцитарной популяции. Активация же каспазы-3 наблюдалась у $1,6 \pm 0,16\%$ эритроцитов крови подростков с ЖДА. Представленные данные демонстрируют направленность сходную с результатами, полученными ранее на образцах взрослых пациентов с ЖДА.

Таким образом, из полученных результатов следует, что в популяции эритроцитов крови подростков с ЖДА наблюдается увеличение числа эриптозных клеток, в которых запрограммированная гибель развивается по каспазо-зависимому пути.

Библиографические ссылки

1. Kempe D.S. et al. Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes // FASEB J. 2006. Vol. 20, № 2. P. 368–370.
2. Козарезова Т.И., Климкович Н.Н. Анемический синдром в практике педиатра: учеб.-метод. пособие. Мн.: БелМАПО, 2007. 226 с.
3. Белевич Е.И. Механизмы эриптоза и его роль в развитии анемических состояний // Автореферат на соискание ученой степени канд. биол. наук. Минск, 2018. 22 с.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА ЛИТИЯ НА ПРОТЕКАНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Белевич Е.И., Тамашевский А.В., Канах Ю.С., Гармаза Ю.М., Слобожанина Е.И.

*ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”, Минск,
Беларусь*

Препараты на основе солей лития широко используется для лечения и поддерживающей терапии при различных психических расстройствах. Известно, что в ядерных клетках ионы лития (Li^+) участвуют в ряде клеточных сигнальных путей, включая аденилатциклазный путь, образование эйкозаноидов, передачу сигналов посредством фосфоинозитола и гликогенсинтазакиназы. В клетки литий поступает посредством Na^+ -каналов и Na^+/Li^+ обменников, а его удаление происходит с помощью Na^+/K^+ АТФазы. При этом скорость выброса Li^+ из клеток достаточно низкая, что и приводит к его внутриклеточному накоплению и может стать причиной его токсического воздействия. Несмотря на большое количество работ, связанных с применением лития в терапии психических расстройств, механизмы его действия на клетки крови остается не ясным. Целью данной работы стало изучение влияния Li^+ в терапевтических и токсичных концентрациях на протекание свободнорадикальных процессов и жизнеспособность эритроцитов человека.

Для достижения поставленной цели были использованы терапевтические (0,1; 0,3 и 1 мМ) и токсичные (3 и 10 мМ) концентрации хлорида лития (LiCl). С помощью флуоресцентного зонда 5-хлорометил-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата ($\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$) было показано, что обработка эритроцитов 0,1-10 мМ LiCl (3ч, 37°C) приводит к снижению интенсивности флуоресценции CM-DCF (флуоресцирующая форма зонда) в среднем на 15–20% на всем диапазоне исследуемых концентраций по сравнению с интактными клетками. Такое снижение может быть обусловлено несколькими факторами. Во-первых, для того, чтобы зонд мог вступить в реакцию с активными формами кислорода (АФК), от $\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$ внутриклеточные эстеразы должны отщепить ацетатные группы, если же их активность будет ингибирована, то будет снижена и продукция $\text{CM-H}_2\text{DCF}$, способного вступать в реакцию с АФК. Во-вторых, в случае повышения проницаемости клеточной мембраны будет происходить выход CM-DCF из клетки в буфер, что проявляется в снижении интенсивности его флуоресценции в самих эритроцитах.

В связи с этим, далее с помощью флуоресцирующего красителя кальцеина была изучена цитозольная эстеразная активность (маркер жизнеспособности клеток) в Li -модифицированных эритроцитах. Проведенные эксперименты позволили выявить статистически значимое снижение жизнеспособности эритроцитов на 20–25% при воздействии на них LiCl в концентрациях 0,3–10 мМ (3ч, 37°C) по сравнению с интактными клетками. Полученные результаты согласуются с литературными данными, где воздействие Li^+ на метаболически истощенные эритроциты приводило к росту содержания цитозольного Ca^{2+} и АТФ и увеличению экспонирования фосфатидилсерина во внешнем липидном монослое мембраны, что свидетельствовало о запуске запрограммированной гибели клеток – эриптоза.

Таким образом, в эритроцитах человека, подвергшихся влиянию хлорида лития *in vitro* в высоких терапевтических и токсичных концентрациях, зафиксировано снижение уровня АФК и жизнеспособности клеток. Полученные результаты свидетельствуют как о снижении цитозольной эстеразной активности в эритроцитах, так и об увеличении проницаемости клеточной мембраны при воздействии Li^+ , что в свою очередь указывает на их потенциальную токсичность.

СТАБИЛЬНОСТЬ СУБСТАНЦИИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ

Белько Н.В.^{1,2}, Самцов М.П.², Тарасов Д.С.², Петров П.Т.³

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

³Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Фотодинамическая терапия представляет собой перспективный метод лечения онкологических заболеваний [1]. Фотосенсибилизаторы для данного метода, разрешенные к применению в клинической практике, обладают рядом недостатков, например, недостаточной глубиной проникновения активирующего излучения в биологические ткани. Одним из возможных направлений развития этого метода терапии является применение фотосенсибилизаторов, которые активируются излучением ближнего ИК диапазона.

У исследуемого индотрикарбоцианинового красителя поглощение лежит в области 700 – 800 нм, при этом он демонстрирует высокую фотодинамическую активность *in vivo* [2]. Соединение является водорастворимым (более 1,5 мМ) благодаря наличию в структуре его молекул цепочек полиэтиленгликоля с молярной массой 300 г/моль, которые присоединяют путем симметричной этерификации карбоксильных групп гидрофобного прекурсора.

В процессе синтеза субстанция фотосенсибилизатора проходит очистку и контроль чистоты при помощи хромато-масс-спектрометрии. Данный метод обладает высокой чувствительностью, точностью и достоверностью, однако требует больших временных затрат и дорогостоящего оборудования. Хранение фотосенсибилизатора в неблагоприятных условиях может приводить к гидролизу сложноэфирных связей, в результате чего в субстанции фотосенсибилизатора возникает примесь гидрофобного прекурсора. Следовательно, контроль чистоты необходимо производить также при хранении.

В водном растворе гидрофобный прекурсор образует агрегаты, что проявляется в возникновении новой полосы поглощения при 514 нм. Отсутствие перекрытия данной полосы с длинноволновой полосой поглощения фотосенсибилизатора при 706 нм позволяет однозначно идентифицировать присутствие агрегированной формы гидрофобного прекурсора.

Для оперативного определения степени чистоты субстанции фотосенсибилизатора проводится анализ спектра поглощения его водного раствора. Фотосенсибилизатор в воде обладает полосой поглощения с максимумом при 706 нм и минимумом оптической плотности при 510 нм. Загрязнение гидрофобным прекурсором приводит к появлению в спектре поглощения полосы с максимумом при 514 нм.

Описанная методика позволяет выявить загрязнение лекарственной формы фотосенсибилизатора его гидрофобным прекурсором в количестве 0,6 масс.% и более. Методика отличается оперативностью, простотой и подразумевает использование доступного оборудования (спектрофотометра).

Библиографические ссылки

1. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A. et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update // CA: a cancer journal for clinicians. 2011. Vol. 61. P. 250–281.
2. Lugovski A.A., Samtsov M.P., Kaplevski K.N. et al. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to poly-ethylene glycol for theranostics // J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2016. Vol. 316. P. 31–36.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НОВЫХ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ КАТИОННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ НА НЕЙТРОФИЛЫ ЧЕЛОВЕКА

Вахрушева Т.В., Гусев С.А., Басырева Л.Ю., Графская Е.Н., Лацис И.А., Панасенко О.М., Лазарев В.Н.

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Катионные антимикробные пептиды (АМП) в отличие от традиционных антибиотиков не вызывают резистентности у микроорганизмов, что обуславливает интерес к ним как потенциальным лекарственным препаратам. Медицинская пиявка, как и все организмы, «вооружена» антимикробными пептидами. Биоинформатический анализ её генома позволил нам идентифицировать и синтезировать катионные пептиды, обладающие антимикробным действием: Phe-Arg-Ile-Met-Arg-Ile-Leu-Arg-Val-Leu-Lys (АМП-1), Lys-Phe-Lys-Lys-Val-Ile-Trp-Lys-Ser-Phe-Leu (АМП-2), Arg-Trp-Arg-Leu-Val-Cys-Phe-Leu-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys-Val (АМП-3) [1]. Максимальная из 3-х определенных нами минимальных концентраций (МИК), ингибирующих рост *B. subtilis*, *E. Coli* и *C. Trachomatis* (МИК), составила 10, 90 и 17 мкМ для АМП-1, АМП-2 и АМП-3, соответственно. В случае использования АМП в качестве терапевтических антибактериальных агентов необходимо учитывать, что в очагах инфекции присутствуют нейтрофилы, являющиеся важнейшим клеточным звеном врожденного иммунитета, с которыми АМП неизбежно вступят в контакт. В связи с этим мы провели исследование влияния АМП на нейтрофилы человека. В цельной крови, инкубированной с АМП, оценивали образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) и число лейкоцитов. При концентрации пептидов до 20 мкМ эти показатели не отличались достоверно от таковых в контроле (кровь без АМП). Однако при 100 мкМ в случае АМП-3 уменьшилось число лейкоцитов на 30% и одновременно увеличилось количество НВЛ (что указывает на активацию нейтрофилов) в 1,7 раза по сравнению с контролем. Морфологический анализ мазков крови после инкубации с пептидами показал сохранность эритроцитов и лимфоцитов. В суспензии изолированных нейтрофилов при концентрациях пептидов, равных их МИК, наибольшую цитотоксичность проявил АМП-2, который вызвал уже через 1 ч инкубации (37°C) уменьшение числа живых клеток на 70% по сравнению с контрольными клетками. Для АМП-3 эта величина составила 40%. Число живых клеток в образцах с АМП-1 и контрольных образцах было одинаковым. С помощью метода люминол-зависимой хемилюминесценции также было продемонстрировано, что АМП-1 не активирует нейтрофилы и не влияет на активацию клеток, индуцированную форбол-12-миристан-13-ацетатом. Таким образом, среди рассматриваемых пептидов АМП-1, обладающий наименьшей МИК и продемонстрировавший наименьшую цитотоксичность по отношению к нейтрофилам, может рассматриваться в качестве основы для разработки перспективного терапевтического антибактериального средства.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 20-15-00270.

Библиографические ссылки

1. Grafskaja E., Nadezhdin K., Talyzina I. et al. Medicinal leech antimicrobial peptides lacking toxicity represent a promising alternative strategy to combat antibiotic-resistant pathogens // Eur. J. Med. Chem. 2019. Vol. 180. P. 143-153.

ВОЗМОЖНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ КАТИОННЫМИ АНТИМИКРОБНЫМИ ПЕПТИДАМИ И НЕЙТРОФИЛЬНОЙ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗОЙ

Вахрушева Т.В.¹, Панасенко О.М.¹, Матюшкина Д.С.¹, Графская Е.Н.¹, Лацис И.А.¹,
Григорьева Д.В.², Горудко И.В.², Иванов В.А.¹, Лазарев В.Н.¹, Соколов А.В.^{1,3}

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

³ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

В отношении возможного терапевтического применения катионные антимикробные пептиды (АМП) имеют такие достоинства как активность против широкого спектра микроорганизмов и низкая вероятность развития резистентности. Одним из существенных недостатков катионных АМП является их низкая стабильность в организме, виновниками которой обычно считают протеазы. Однако, в очаге инфекции, где непременно скапливаются нейтрофилы, АМП становятся мишенью для хлорноватистой кислоты (НОСІ), продуцируемой нейтрофильной миелопероксидазой при активации клеток. В работе исследовано воздействие НОСІ на АМП, сконструированные на основе биоинформатического анализа генома пиявки *Hirudo medicinalis* и продемонстрировавшие высокую антибактериальную активность: Phe-Arg-Ile-Met-Arg-Ile-Leu-Arg-Val-Leu-Lys (АМП-1), Lys-Phe-Lys-Lys-Val-Ile-Trp-Lys-Ser-Phe-Leu (АМП-2), Arg-Trp-Arg-Leu-Val-Cys-Phe-Leu-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys-Val (АМП-3) [1]. В АМП-3 и АМП-1 представлены, соответственно, остатки Cys и Met, у которых среди аминокислот самые высокие константы скорости реакции с НОСІ. АМП-2 содержит только менее реакционные остатки Trp и Lys. Результаты MALDI-масс-спектрологии пептидов, обработанных НОСІ, показали образование продуктов окисления и хлорирования. АМП-3 оказался наименее устойчивым к НОСІ, распадаясь на фрагменты, тогда как АМП-1 и АМП-2 при аналогичных условиях сохраняли целостность полипептидной цепи. Как оказалось, АМП-3 может влиять на функционирование МПО, ускоряя образование НОСІ даже в присутствии большой, характерной для *in vivo*, концентрации такого физиологического перехватчика НОСІ как таурин. В случае АМП-1 и АМП-2 такого эффекта не было. Добавление к нейтрофилам АМП-3, модифицированного НОСІ, сопровождалось усилением активации НАДФН-оксидазы клеток, а модифицированный АМП-2 приобретал способность сам активировать нейтрофилы. НОСІ является «оружием» нейтрофилов против патогенов, но в то же время избыточное образование этого высокореакционного соединения может оказывать повреждающее действие на компоненты организма-хозяина. Известно, что даже небольшие изменения в аминокислотной последовательности АМП могут сдвинуть его свойства в желаемую сторону [2]. Оценка уязвимости молекулы для НОСІ может указать направление для попыток изменения аминокислотной последовательности АМП с целью получения структуры наиболее устойчивой к условиям очага инфекции. Данные результаты позволяют предложить АМП-1 как подходящий пептид для усовершенствования структуры, повышающего её устойчивость в условиях активации нейтрофилов, с учетом уменьшения негативного влияния на эти клетки.

Работа поддержана грантами РФФИ (20-515-00006), БРФФИ (Б20Р-215).

Библиографические ссылки

1. Grafskaja E., Nadezhdin K., Talyzina I. et al. Medicinal leech antimicrobial peptides lacking toxicity represent a promising alternative // Eur. J. Med. Chem. 2019. Vol. 180. P. 143-153.
2. Lee K. et al. Interactions between the plasma membrane and the antimicrobial peptide HP // Biochem. J. 2006. Vol. 394. P. 105-114.

ЭФФЕКТЫ СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ СВИНЦА И АМИЛОИДОВ НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Венская Е.И., Лукьяненко Л.М., Зубрицкая Г.П., Скоробогатова А.С.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

По мнению Всемирной организации здравоохранения, свинец и его соединения являются одним из наиболее опасных загрязнителей окружающей среды. Известно, что поступление ионов свинца даже в небольших количествах в организм человека может приводить к необратимым изменениям в его функционировании, причем особенно уязвимыми к действию свинца являются дети. В литературе показано, что у экспериментальных животных, получавших в раннем возрасте молоко со свинцом, в зрелом возрасте происходит накопление аномального тау-белка в лобной доли мозга. Выяснение молекулярных механизмов патогенеза амилоидозов на фоне повышенного содержания ионов тяжелых металлов являются актуальной задачей. В данной работе исследовано сочетанное воздействие амилоидных структур и субгемолитических концентраций ацетата свинца на физико-химическое состояние липидного бислоя мембран эритроцитов человека и процессы генерации активных форм кислорода, протекающие в них. Оценку изменений состояния липидного бислоя осуществляли с помощью липофильных флуоресцентных зондов – 1-(4-триметиламмоний)-6 фенил-1,3,5 гексатриена (ТМА-ДФГ), пирена и лаурдана, встроенных в мембраны эритроцитов, предварительно подверженных воздействию субгемолитических концентраций ацетата свинца и амилоидных фибрилл, а по ТБК-тесту судили о процессах перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах эритроцитов человека. Амилоиды были получены из лизоцима куриного яйца. Контроль за формированием и ростом амилоидных структур осуществляли с использованием флуоресцентного красителя тиофлавина Т. Обнаружено, что предварительная инкубация эритроцитов человека с ацетатом свинца (5 мкМ) в течение 3 ч при 37°C и с амилоидными структурами *in vitro* приводит к снижению интенсивности и поляризации флуоресценции ТМА-ДФГ, а также генерализованной поляризации флуоресценции лаурдана, по сравнению с клетками, обработанными только амилоидными структурами или только ацетатом свинца при тех же условиях. Коэффициент эксимеризации пирена, встроенного в мембраны эритроцитов, при сочетанном воздействии на эритроциты ацетата свинца в течение 3 ч при 37°C и амилоидных фибрилл увеличивался по сравнению с клетками, предварительно проинкубированными с амилоидными структурами и с клетками, нагруженными только ацетатом свинца при данных условиях. Амилоидные фибриллы после трехчасовой инкубации эритроцитов при 37°C приводили к снижению содержания ТБК-продуктов, что свидетельствует об уменьшении процессов ПОЛ в их мембранах, по сравнению с контрольными клетками. В то же время сочетанное воздействие амилоидных фибрилл и ацетата свинца приводит к увеличению перекисного окисления липидов. Полученные результаты позволяют предположить, что сочетанное воздействие ионов свинца и амилоидов на эритроциты человека *in vitro* приводит к модификации физического состояния липидного бислоя мембран по сравнению с действием амилоидов или ионов свинца по отдельности.

СТРУКТУРНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО И КИСЛОТНОГО СТРЕССА

Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

На сегодняшний день доказано участие активных форм кислорода в процессах внутриклеточной сигнализации, при этом пероксид водорода считается основным плейотропным сигнальным агентом [1]. Образование пероксида водорода в клетках может стимулироваться метаболическими или стрессорными сигналами [2]. Многие патофизиологические процессы сопровождаются развитием кислотного и окислительного стресса. Умеренное повышение уровня пероксида водорода вызывает в клетке адаптивные реакции, которые не только снижают пагубное действие стрессора, но и позволяют ей лучше перенести последующий стресс. В работе изучено влияние предварительного инкубирования клеток с пероксидом водорода и в среде с различным pH на структурную стабильность эритроцитов при окислительном гемолизе.

Использовались эритроциты здоровых доноров. Гемолиз проводили в фосфатно-солевом буфере (10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 137 mM NaCl , 2,7 mM KCl , 5 mM D-глюкозы, pH 7,4) путем добавления 0,2 mM хлорноватистой кислоты к суспензии эритроцитов. Изменения структурной стабильности оценивали по изменению доли неразрушенных эритроцитов, выраженному в процентах.

Обнаружено, что предварительное инкубирование клеток в среде с низким значением pH приводит к снижению скорости окислительного гемолиза. При инкубировании клеток в средах с pH в диапазоне 4–7 наблюдалась куполообразная зависимость доли неразрушенных эритроцитов от величины pH. При pH 5,5 наблюдалось максимальное увеличение структурной стабильности, что соответствовало росту доли неразрушенных эритроцитов на 40 %.

Ранее было показано, что снижение внеклеточного pH вызывает в эритроцитах уменьшение внутриклеточного pH и усиление окислительного стресса [3]. Показано, что предварительное инкубирование клеток с пероксидом водорода в концентрациях 50 – 250 мкМ также позволяет снизить долю гемолизированных эритроцитов. Максимальный протекторный эффект зависел от времени инкубирования. Повышение доли неразрушенных эритроцитов на 40% в сравнении с контролем при инкубировании клеток с 250 мкМ H_2O_2 в течение 5 минут, на 80% – с 200 мкМ H_2O_2 в течение 10 минут и на 60% – с 175 мкМ H_2O_2 в течение 15 минут.

Таким образом, окислительный и кислотный стресс при указанных условиях приводит к активации адаптационных механизмов эритроцитов.

Библиографические ссылки

1. Sies H., Jones D.P. Reactive Oxygen Species (ROS) as Pleiotropic Physiological Signalling Agents // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020. Vol. 21, № 3. P. 1-21.
2. Sies H. Role of Metabolic H_2O_2 Generation: Redox Signaling and Oxidative Stress // J. Biol. Chem. 2014. Vol. 289. P. 8735–8741.
3. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Голубева Е.Н. и др. Роль ионов водорода в регуляции редокс-состояния эритроцитов // Биофизика. 2009. Т. 54, № 5. С. 846–851.

СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА – НОВЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ АПОПТОЗА КЛЕТОК

**Вчерашняя А.В., Мартинович И.В., Мартинович Г.Г., Шадыро О.И.,
Черенкевич С.Н.**

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

В настоящее время среди основных механизмов гибели клеток выделяют некроз, апоптоз и аутофагию [1]. Апоптоз и аутофагию относят к физиологическим запрограммированным механизмам гибели клеток, тогда как некроз является непрограммируемой гибелью клеток, вызываемой действием повреждающих факторов [2, 3]. Некроз клеток организма может приводить к структурным и функциональным повреждениям органов и тканей, в то время как программируемая гибель является регулируемым локализованным процессом, что делает препараты, механизм действия которых основан на активации программируемой гибели клеток, более перспективными для современной противоопухолевой терапии. Разработка новых методов исследования молекулярных, биохимических и биофизических показателей, позволяющих дифференцировать различные типы гибели клеток, является необходимым этапом поиска эффективных противоопухолевых препаратов. В данной работе показано, что исследование внутриклеточного распределения цитохрома *c* методом спектроскопии комбинационного рассеяния света (КР) позволяет изучать ранние стадии апоптоза, что является важным преимуществом метода в сравнении с биохимическими и морфологическими методами изучения программируемой гибели клеток.

С применением методов спектроскопии КР и флуоресцентного анализа изучены механизмы эффекторной стадии запуска программируемой гибели клеток карциномы гортани человека линии HЕr-2 при действии тимохинона (2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинона). Исследование внутриклеточного распределения цитохрома *c* проводили на основе анализа профиля интенсивности пика КР 750 см^{-1} , характерного для колебательной моды пиррольного кольца в молекуле цитохрома *c* [4]. Показано, что до стимуляции тимохиноном выявляется наличие пиков интенсивности в примембранных областях клеток, свидетельствующее о компартиментализации исследуемого белка. При этом преимущественное накопление флуоресцентного зонда этилового эфира тетраметилпродамина указывает на локализацию митохондрий в примембранных областях контрольных клеток. Установлено, что добавление тимохинона приводит к внутриклеточному перераспределению цитохрома *c*, при этом в клетках, стимулированных тимохиноном, наблюдается относительно равномерное распределение интенсивности пика КР 750 см^{-1} , что указывает на выход цитохрома *c* из матрикса митохондрий в цитозоль клетки. Показано, что высвобождение цитохрома *c* из митохондрий при действии тимохинона сопровождается снижением митохондриального потенциала, что свидетельствует об активации программируемой гибели опухолевых клеток по митохондриально-опосредованному пути. Полученные результаты указывают на перспективность применения метода спектроскопии КР в исследовании программируемой гибели клеток и возможность его применения для оценки эффективности противоопухолевых препаратов.

Библиографические ссылки

1. Danial N.N., Korsmeyer S. J. Cell Death: Critical Control Points // Cell. 2004. Vol. 116. P. 205–219.
2. Doherty J., Baehrecke E. H. Life, Death, Autophagy // Nat. Cell. Biol. 2018. Vol. 20. P. 1110–1117.
3. Chen Q., Kang J., Fu C. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis // Sig. Transduct. Target. Ther. 2018. Vol. 3. N. 18. P. 1–11.
4. Okada M., Smith N., Palonpon A., et al. Label-free Raman Observation of Cytochrome *c* Dynamics during Apoptosis // P. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. Vol. 109. P. 28–32.

ФИКСАЦИЯ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕСТАБИЛЬНЫХ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ДНК С СОЕДИНЕНИЯМИ ПЛАТИНЫ

Галюк Е.Н., Ринейская О.Н., Ландо Д.Ю.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Соединения платины, такие как противоопухолевые препараты цисплатин, карбоплатин, и их неактивные аналоги (трансплатин, диенплатин) как до инкубации с ДНК, так и в ходе связывания образуют ряд отдельных неравновесных промежуточных продуктов. Поэтому для понимания механизма противоопухолевого действия важно понимать кинетику их превращения. Образование промежуточных продуктов протекает медленно и дополнительно затрудняется присутствием хлорид ионов Cl^- . Поэтому платинирование ДНК *in vitro* обычно проводят в растворах NaClO_4 , поскольку ион ClO_4^- в отличие от Cl^- не препятствует платинированию. В то же время, Cl^- в концентрации ~ 0.1 М используется в различных экспериментах для фиксации промежуточных продуктов цисплатина [1, 2]. Высокая концентрация Cl^- в крови и низкая их концентрация в клетках и клеточных ядрах способствует доставке цисплатина к ДНК [1].

Однако наши исследования показали, что фиксация промежуточных продуктов связывания цисплатина при концентрации NaCl 0.1 М, надежная при физиологической и пониженной температуре, не эффективна при высокой температуре, используемой в экспериментах по плавлению. Поэтому мы разработали буфер следующего состава: 0.11 М NaCl , $5 \cdot 10^{-4}$ М EDTA , 0.001-0.005 М Na_2CO_3 , pH 10.5, который обеспечивает надежную фиксацию промежуточных комплексов цисплатин-ДНК, образующихся в данный момент инкубации, даже при высоких температурах, используемых в экспериментах по плавлению. Более того, использование щелочной среды усиливает снижение температуры платинированной ДНК по сравнению с неплатинированной.

Для сравнения мы показали, что, в отличие от цисплатина, фиксация комплексов трансплатина с ДНК остается надежной при концентрации NaCl 0.1 М и pH 7 как при физиологической, так и при высоких температурах. Поэтому в случае трансплатина можно исследовать промежуточные продукты связывания с ДНК как в нейтральной, так и в щелочной среде, и учитывать различия для этих сред.

Нами показано, что промежуточные монофункциональные продукты трансплатина снижают энтальпию и энтропию и разрушают тонкую структуру, зафиксированную на дифференциальных кривых плавления, как и конечные бифункциональные продукты. Однако снижение термодинамических параметров и нарушения тонкой структуры конечными продуктами трансплатина выражено значительно сильнее. Промежуточные монофункциональные продукты, образуемые трансплатином, дестабилизируют двойную спираль (снижают температуру плавления). В то же время, конечные бифункциональные продукты трансплатина стабилизируют двойную спираль. Это отличает трансплатин от противоопухолевого препарата цисплатин, для которого как промежуточные, так и конечные продукты дестабилизируют двойную спираль ДНК и снижают температуру плавления.

Библиографические ссылки

1. Bancroft D.P., Lepre C.A., Lippard S.J. Platinum-195 NMR kinetic and mechanistic studies of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) binding to DNA // J. Am. Chem. Soc. 1990. Vol. 112. P. 6860-6871.
2. Lando D.Y., Chun-Ling Chang, Fridman A.S., et al. Comparative thermal and thermodynamic study of DNA chemically modified with antitumor drug cisplatin and its inactive analog transplatin// J. Inorg. Biochem. 2014. Vol. 137, № 1. P. 85–93.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ГАЛОГЕНИРОВАННОГО АЛЬБУМИНА В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ

Григорьева Д.В.¹, Горбунов Н.П.², Костевич В.А.^{2,3}, Елизарова А.Ю.², Горудко И.В.¹, Соколов А.В.^{2,3}

¹*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

²*ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия*

³*ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия*

В настоящее время показано, что развитию воспалительных процессов способствуют белки и липиды, модифицированные гипогалоидными кислотами, генерируемыми ферментом азурофильных гранул нейтрофилов – миелопероксидазой (МРО). После модификации хлорноватистой кислотой (HOCl) альбумина (HSA), основного белка крови человека, образующийся HSA-Cl активирует нейтрофилы (инициирует респираторный взрыв, экзоцитоз МРО и синтез дополнительного количества HOCl), тем самым усиливая вероятность модификации HSA и развития воспалительной реакции по принципу положительной обратной связи. Представляется перспективным направленный поиск средств, препятствующих активации нейтрофилов галогенированными белками, с целью создания новых терапевтических препаратов для лечения воспалительных заболеваний.

С помощью иммунизации мышей HSA-Cl и последующей гибридизации лимфоцитов по Мильштейну-Келлеру нами были получены 6 гибридом (клоны 2C3, 2E6, 1H2, 3D7, 3E2, 3E6), продуцирующих моноклональные антитела против HSA-Cl (MAb). Гибридомы были инокулированы мышам и при хроматографии на геле с белком А из асцитов очищены MAb. Полученные MAb специфически распознавали HSA-Cl и не связывались с нативным HSA согласно данным твердофазного иммуноферментного анализа и Вестерн-блоттинга. MAb различались по изотипу и согласно конкурентному анализу реагировали с различными эпитопами HSA-Cl. Целью данной работы был анализ влияния MAb на активность нейтрофилов при действии HSA-Cl.

Установлено, что MAb клонов 2E6, 1H2 и 3E2 (62,5-250 мкг/мл) эффективно (на 50-80 %) препятствуют респираторному взрыву и экзоцитозу МРО из нейтрофилов, активированных HSA-Cl. В том же концентрационном диапазоне MAb клонов 2C3, 3D7 и 3E6 не только не отменяли эффект HSA-Cl на нейтрофилы, но и усиливали его (на 40-80 %), из чего можно сделать вывод об их нежелательной иммуногенности. Проведя дополнительные контрольные эксперименты, выяснилось, что все 6 клонов MAb не влияют на функциональные отклики нейтрофилов в ответ на хемотаксический пептид fMLP. Следовательно, можно заключить, что праймирующий эффект MAb клонов 2C3, 3D7 и 3E6 может быть обусловлен формированием иммунных комплексов MAb-HSA-Cl, активирующих нейтрофилы.

По результатам исследования можно сделать вывод о том, что в перспективе MAb клонов 2C3, 3D7 и 3E6 могут быть использованы для разработки на их основе тестов для выявления в плазме крови галогенированных белков и вероятно их иммунных комплексов, как маркеров наличия скрытых и/или хронических воспалительных процессов. Кроме вышеописанной функции MAb клонов 2E6, 1H2 и 3E2 могут быть использованы как прототипы для создания лекарственных препаратов, направленных на регуляцию воспалительного процесса.

Работа поддержана грантами БРФФИ (Б19PM-024), РФФИ (19-54-04004) и МД-1901.2020.4.

ВИТАМИН D₃ БЛОКИРУЕТ ОБРАЗОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

**Гусев С.А., Басырева Л.Ю., Максимов Д.И., Федорова Е.А., Яскевич А.В.,
Вахрушева Т.В., Островский Е.М., Панасенко О.М.**

*ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия*

В настоящее время известно, что чрезмерное образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) ассоциировано с сердечно-сосудистыми, аутоиммунными, онкологическими и другими заболеваниями [1]. Вследствие этого проводится поиск препаратов и подходов, препятствующих интенсивному образованию НВЛ, а также оценка влияния применяемых при данной патологии препаратов на образование НВЛ [2]. В связи с этим привлекает внимание витамин D₃, иммуномодулирующие свойства которого хорошо известны [3]. Однако результаты работ по влиянию витамина D₃ на нетоз крайне противоречивы [4, 5]. Учитывая это, мы провели изучение влияния приема витамина D₃ донорами на активацию нейтрофилов и образование НВЛ в цельной крови *ex vivo*. В качестве индуктора активации использовали форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА). Эксперименты с цельной кровью позволяют избежать процедуры предварительного выделения и обработки нейтрофилов, что максимально приближает полученные результаты к естественным процессам, происходящим в организме.

Капиллярную кровь забирали, используя ЭДТА в качестве антикоагулянта, до приема витамина D₃, через 1, 3 и 7 суток после начала приема витамина D₃ по 1000 IU ежедневно и через 7 суток после окончания приема. В образцы крови добавляли ФМА (100 нМ), инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Количественную оценку доли НВЛ по отношению к лейкоцитам проводили предложенным нами ранее методом [6]. Кроме того, у всех доноров до начала исследования определяли концентрацию 25-гидроксивитамина D₃ в крови. У всех участников исследования наблюдалось пониженное содержание витамина D₃ в крови: уровень 25-гидроксивитамина D₃ колебался в пределах от 12 до 26 нг/мл. Прием витамина D₃ приводил к тому, что индуцированное ФМА образование НВЛ постепенно уменьшалось и через 7 суток после начала приема полностью прекращалось. Через 7 суток после окончания приема витамина D₃ образование НВЛ восстанавливалось полностью.

Полученные данные позволяют предположить, что прием витамина D₃ может рассматриваться как эффективный подход к снижению чрезмерного образования НВЛ в ответ на активацию нейтрофилов и соответственно уменьшению риска развития осложнений при различных заболеваниях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ, грант № 20-15-00390.

Библиографические ссылки

1. Коротина О.Л., Генералов И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012. №4. С. 23–32.
2. Laponi M.J., Carestia A., Landoni V.I. et al. Regulation of neutrophil extracellular trap formation by anti-inflammatory drugs // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2013. Vol. 345. P. 430–437.
3. Di Rosa M., Malaguarnera M., Nicoletti F., et al. Vitamin D3: A Helpful Immuno-Modulator // Immunology. 2011. Vol. 134. P. 123–139.
4. Handono K., Sidarta Y.O., Pradana B.A., et al. Vitamin D prevents endothelial damage // Acta Med. Indones. 2014. Vol. 46. P. 189–198.
5. Agraz-Cibrian J.M., Giraldo D.M., Urcuqui-Inchima S. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces formation of neutrophil extracellular trap-like structures // Steroids. 2019. Vol. 141. P. 14–22.
6. Basyreva L.Y., Brodsky I.B., Gusev A.A. et al. The effect of Intravenous Immunoglobulin (IVIG) on *ex vivo* activation of human leukocytes. // Hum. Antibodies. 2016. Vol. 24, № 3–4. P. 39–44.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КИСЛОРОДНО-ГЕЛИЕВЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ РАБОТОСПОСОБНОСТИ СПОРТСМЕНОВ

Никандров В.Н., Жук О.Н., Домашевич Е.В., Маслова Г.Т., Урецкий В.Б.

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь
Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Гипоксия органов и тканей (особенно головного мозга, миокарда, почек, красных скелетных мышц, а также кроветворной системы) при тренировке спортсменов и участии в соревнованиях, сопровождающаяся суперактивацией гипоталамо-симпатико-адреналовой системы, диктует необходимость обеспечения адекватного кислородного режима организма в период физического перенапряжения и после него. Это решается экстренной доставкой кислорода с использованием кислородно-газовых смесей (КГС) с инертным газом, способным по физическим свойствам ускорять и улучшать доставку кислорода к тканям, не оказывая негативного действия на организм. Предпочтение отдается гелию. Он не вступает в химические реакции с биомолекулами и, судя по всему, не вызывает аллергических реакций. Гелий увеличивает объемную скорость движения КГС, улучшая общий газообмен и газовый состав крови, нормализует кислотно-щелочной баланс в организме, расслабляет гладкую мускулатуру и оптимизирует деятельность дыхательного центра. Он расширяет бронхи, позволяя кислороду глубоко проникнуть в дыхательные пути, облегчая работу дыхательных мышц, уменьшая вязкость бронхиального секрета.

По заданию ГП развития физической культуры и спорта в Республике Беларусь в 2008–2012 гг. в Институте физиологии НАН Беларуси совместно с Республиканским центром спортивной медицины были изучены особенности функционально-метаболического состояния организма спортсменов при использовании КГС в условиях больших физических нагрузок. Конечной целью являлось создание программы использования КГС у спортсменов разных видов спорта. Для выполнения задания была сформирована исследовательская группа, включающая научных сотрудников высшей квалификации в области пульмонологии, биохимии, физиологии человека, спортивной медицины и конструирования медицинского оборудования. Для подачи КГС в Минском НИИ радиоматериалов был создан оригинальный аппарат АКГС-31, позволяющий варьировать соотношение газов КГС, подогревать ее и выдерживать нужные параметры.

Исследования выполнены на 20 добровольцах и 160 спортсменах обоего пола (единоборцев, игровых и сложно-координационных видов спорта), включая членов олимпийской сборной. КГС использовали при соотношении (об.) $O_2 : He_2 - 25 : 75$, температуре 40 °С и продолжительности одного сеанса 10 мин, режиме – 16 дыхательных движений/мин. Результаты клинического обследования спортсменов, комплексного компьютерного исследования физического состояния на цифровом анализаторе «ОМЕГА-С», общего анализа крови и анализа по обеспечению организма кислородом, состоянию водно-электролитного баланса, звеньев углеводно-энергетического обмена выявили отсутствие отрицательных сдвигов в организме спортсменов. Использование КГС позволило значительно увеличить потенциал функциональных систем организма спортсменов, судя по развернутому анализу крови, критериям «уровень и резерв тренированности», «уровень и резерв энергетической обеспеченности», «уровень и резерв управления».

Расширение спектра применения разработанного нами метода применения O_2 - He_2 ингаляций в спорте, несомненно, будет способствовать улучшению общих достижений спортсменов нашей страны на международных соревнованиях. Целесообразным является использование КГС при лечении воспалительной легочной патологии, в том числе вызванной короновирусной инфекцией.

НОВЫЕ АМИНОПРОИЗВОДНЫЕ ХЛОРИНА e_6 : СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ

Зорина Т.Е.¹, Кравченко И.Е.¹, Хлудеев И.И.¹, Коблов И.В.¹, Ермилова Т.И.², Шман Т.В.², Березин Д.Б.³

¹*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

²*РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь*

³*Ивановский государственный химико-технологический Университет, Иваново, Россия*

Фотодинамическая терапия (ФДТ) - перспективный метод лечения ряда злокачественных новообразований, основанный на избирательном фотосенсибилизированном воздействии на опухолевую ткань. Основной стратегией дальнейшего развития ФДТ является создание спектра фотосенсибилизаторов (ФС) с таргетными свойствами. Обеспечить направленность действия ФС можно путем изменения его физико-химических свойств. Об этом свидетельствуют результаты исследования влияния структуры ФС при действии их на различные типы клеток или тканей. Было показано, что включение в состав тетрапиррольного кольца хлорина e_6 (Хл e_6) боковых заместителей, содержащих метильные или аминогруппы, значительно увеличивает способность пигментов накапливаться в трансформированных клетках, тканях и вызывать их фотодеструкцию. Высокий уровень накопления в малигнизированных клетках и тканях, особенности васкуляторного воздействия и высокая фотодинамическая активность этих соединений были показаны в ряде работ [1,2,3].

Целью настоящей работы было исследование физико-химических и фотофизических характеристик новых аминопроизводных хлорина e_6 (АПХл e_6), определение механизмов их фармакокинетического распределения, сравнение их активности с фотосенсибилизирующей активностью Хл e_6 и диметилового эфира Хл e_6 (ДМЭ), оценка возможности использования АПХл e_6 в качестве ФС для фотодинамической терапии.

Объектом исследования были тетрапиррольные ФС хлоринового ряда с аминогруппами (АПХл e_6): 13(1)-(2-NNN-триметиламиноэтил)амид- диметиловый эфир хлорина e_6 иодид (АПХл1) и 13(1)-метиламид-17(3)-(2,3-дигидроксиметил-1,4-хиноксалиновый эфир)хлорина e_6 (АПХл2), синтезированные в Ивановском государственном химико-технологическом Университете (Иваново, Россия), а также Хл e_6 (Frontier Scientific, США) и ДМЭ (Белмедпрепараты, Беларусь).

Показано, что АПХл e_6 являются эффективными ФС: они имеют высокий квантовый выход генерации 1O_2 и высокую фотосенсибилизирующую активность. Эффективность фотоповреждения культуральных клеток K562 существенно зависит от структурных характеристик ФС. При условии равенства поглощенных доз и концентраций по эффективности фотосенсибилизации клеток K562 хлорины располагаются в ряду АПХл2>ДМЭ> АПХл1> Хл e_6 . Фотоцитотоксичность АПХл2 почти на порядок выше, чем у Хл e_6 . Механизмы повреждения клеток (некроз-апоптоз) определяются структурными особенностями пигментов, зависят от концентрации и дозовых характеристик облучения.

Библиографические ссылки

1. Зорин В.П., Хлудеев И.И., Зорина Т.Е. Распределение порфириновых сенсibilизаторов между белковыми и клеточными элементами крови // Биофизика. 2000. Т. 45. С.313-319.
2. Зорина Т.Е., Далидович А.А., Марченко Л.Н. и др. Фотосенсибилизаторы в офтальмологии: // Офтальмология. Восточная Европа. 2011. Т. 4. С. 93-105.
3. Зорина Т.Е., Янковский И.В., Кравченко И.Е. и др. Оценка фото- и цитотоксичности этерифицированных производных хлорина e_6 и их липосомальных форм // Биофизика. 2015. Т.60. С. 922-930.

ИНТЕГРАЛЬНАЯ ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ С ДЕФИЦИТОМ ЖЕЛЕЗА В ПРОЦЕССЕ ФЕРРОТЕРАПИИ

**Зубрицкая Г.П.¹, Климкович Н.Н.², Венская Е.И.¹, Кутько А.Г.¹, Козарезова Т.И.²,
Слобожанина Е.И.¹**

¹ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

²ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск,
Беларусь

За стабильность окислительно-восстановительного баланса крови человека ответственны специализированные антиоксидантные системы (АОС), активность которых можно оценивать как по общей антиоксидантной активности (ОАА) плазмы крови, так и с помощью низкомолекулярных антиоксидантов и «ферментов II фазы защиты от окислительного стресса и токсических веществ» эритроцитов. Несмотря на большое количество работ, посвященных исследованию как АОС защиты, так и процессам окисления при железодефицитных состояниях, остается недостаточно изученным вопрос о состоянии АОС у детей с дефицитом железа, в особенности от их возраста. **Цель** настоящей работы – провести сравнительный анализ состояния ОАА плазмы крови и АОС защиты эритроцитов у детей при железодефицитных анемиях (ЖДА) до и после лечения препаратами железа. Проведен анализ образцов крови 56 детей с ЖДА в возрасте от 0 до 17 лет до и после ферротерапии (на 1-е и 14-е сутки поступления в стационар). Образцы крови детей получены из ГУ «Республиканская детская больница медицинской реабилитации» и ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя».

В нашей работе методом тролокс-эквивалент антиоксидантной активности (ТЭАА) обнаружено достоверное ($P < 0,05$) снижение ОАА плазмы крови примерно на 20% у детей с ЖДА подростковой группы (10-17 лет) после ферротерапии по сравнению с данными пациентами до лечения. У новорожденных детей с ЖДА (0-3 месяца) без ферротерапии, обнаружено увеличение ОАА плазмы крови по сравнению с группой детей с ЖДА до лечения ($0,71 \pm 0,05$ и $0,56 \pm 0,02$ соответственно). Церулоплазмин, лактоферрин и трансферрин образуют антиоксидантную систему плазмы крови, действие которой основано на окислении ионов Fe^{2+} и связывании Fe^{3+} , а также на взаимодействии этих белков с кислородными радикалами. Наши исследования показали, что в эритроцитах детей с ЖДА на фоне лечения наблюдалось достоверное уменьшение активности гем-содержащего фермента каталазы (примерно на 30-35%, $P < 0,05$), а также активности глутатионпероксидазы по сравнению с таковыми показателями до принятия ферропрепаратов ($275,8 \pm 18,2$ и $240,5 \pm 15,0$ мкмоль/мин/на 1 г Hb соответственно). Установлено, что в эритроцитах детей с ЖДА во время лечения снижалась активность глутатион-S-трансферазы (GST) по сравнению с данным показателем до лечения. Причем, обнаружены индивидуальные различия активности GST у пациентов до и после лечения. Из обследованных детей с ЖДА активность GST была повышена у 10 детей на фоне приема препаратов железа. Концентрация восстановленного глутатиона (GSH) в эритроцитах детей с ЖДА после лечения была снижена на 10-15% по сравнению с концентрацией до начала терапии.

Таким образом, полученные нами результаты согласуются с некоторыми литературными данными о том, что прием препаратов железа у детей с целью устранения железодефицитного состояния, приводят к усилению окислительного стресса, что в дальнейшем необходимо учитывать при применении протоколов ферротерапии и обосновании назначения антиоксидантов при ЖДА.

ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И БИОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Касько Л.П.¹, Лукьяненко Л.М.², Слобожанина Е.И.²

¹ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск,
Беларусь

²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Амниотическая жидкость (околоплодные воды) представляет собой очень сложную по составу и функциям среду, участвующую в питании плода, способствующую развитию его дыхательных путей и пищеварительного тракта, предохраняющую плод от механических, химических и инфекционных воздействий. В литературе показано, что патологические процессы, возникающие при нарушении развития плода, отражаются на биохимических и биофизических свойствах амниотической жидкости. Своевременное выявление беременных с повышенным риском нарушений у плода до сих пор представляет значительные трудности в акушерской практике. Для ранней диагностики патологии беременности в медицинской практике широко используется ультразвуковое обследование беременных, цитогенетические исследования амниотической жидкости и определение концентрации альфа-фетопротеина как в амниотической жидкости, так и в плазме крови. Однако, биохимические и цитогенетические методы диагностики требуют длительного времени, поэтому остается актуальной разработка экспрессных и чувствительных способов диагностики. Известно, что из-за высокой чувствительности и экспрессности, люминесцентные методы в настоящее время широко применяются в различных областях науки и медицины. Поэтому целью данных исследований явилось изучение спектрально-люминесцентных характеристик и биохимических показателей амниотической жидкости женщин с нормально протекающей беременностью и женщин с патологией беременности (врожденные пороки развития плода; беременность, осложненная резус-конфликтом; гестозы). Обнаружено значительное повышение активности ацетилхолинэстеразы в амниотической жидкости беременных с врожденными пороками развития плода по сравнению с группой женщин с нормально протекающей беременностью. Показано, что интенсивность и положение максимумов спектров ультрафиолетовой люминесценции амниотической жидкости при нормально протекающей беременности и при беременностях, осложненных синдромом задержки развития плода или резус-конфликтом, не различаются. Однако, положение максимумов спектров «видимой» люминесценции, так и спектров возбуждения люминесценции амниотической жидкости при беременности, осложненной синдромом задержки развития, находятся в более длинноволновой спектральной области по сравнению с нормой. Установлено, что при патологии беременности, связанной с пороками развития плода и при беременности, осложненной резус-конфликтом, происходит снижение уровня SH-групп белков и изменение физического состояния липидных компонентов в амниотической жидкости. Полученные экспериментальные данные позволяют говорить о перспективности применения спектрально-люминесцентных характеристик амниотической жидкости для разработки способов выявления беременных с нарушениями развития плода. Выявленные нами отличия спектрофотометрических и люминесцентных параметров амниотической жидкости при беременности с риском задержки развития плода дают возможность разработать быстрый и чувствительный метод определения внутриутробных нарушений развития плода по параметрам люминесценции амниотической жидкости.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ОСТЕОАРТРИТЕ

Коктыш И.В.¹, Башура А.М.¹, Коктыш В.Т.², Липницкий О.М.², Скоробогатова А.С.³

¹Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, ²11-ая городская клиническая больница г. Минска, ³Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Остеоартрит (ОА) является доминирующей проблемой в ревматологии и ортопедии, опережая по распространённости ревматоидный артрит. Информативными маркерами воздействия микроэлементов на ранней стадии клинической диагностики микроэлементозов принято считать цельную кровь и синовиальная жидкость, которые депонируют и накапливают микро- и макроэлементы. Цинк, медь, железо, кальций являются обязательными компонентами в различных ферментных системах, участвуют в функционировании про- и антиоксидантных систем, оказывают влияние на течение воспаления в организме человека.

Цель: установить особенности содержания меди, цинка, кальция и железа в периферической крови и синовиальной жидкости при остеоартрите.

Материалом исследования послужили синовиальная жидкость и периферическая кровь 26 пациентов с гонартрозом и коксартрозом, находящихся на стационарном лечении в учреждении здравоохранения «11-я городская клиническая больница» г. Минска. В качестве контрольной группы сравнения обследованы 10 пациентов с отсутствующими признаками деформирующих заболеваний суставов. Определение концентрации микроэлементов проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ICPE-9000, Shimadzu, Япония). Для подготовки проб к измерению проводилась минерализация образцов с использованием системы микроволновой пробоподготовки (Milestone Ethos E, Италия). Статистический анализ полученных данных проводился с помощью непараметрических методов в программе «Statistica 8.0»

Установлено статистически значимое снижение концентрации железа при увеличении содержания кальция и цинка в периферической крови у пациентов с ОА по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе сравнения ($p=0,01$, $p=0,003$, $p=0,01$, соответственно). Напротив, анализ микроэлементного состава синовиальной жидкости показал увеличение концентрации железа при снижении содержания кальция и цинка у пациентов с ОА по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе сравнения ($p=0,006$, $p=0,006$, $p=0,02$, соответственно). Показано, что изменения в содержании кальция может способствовать экструзии мениска [1], что увеличивает прогрессирование остеоартрита. Цинк блокирует апоптоз клеток различного происхождения и его эффект связан преимущественно с блокадой активности кальция и магния. Кроме того, дефицит цинка приводит к дезорганизации хондроцитов, что, вероятно, связано с дисрегуляцией металлопротеиназ [2].

Анализ микроэлементного состава синовиальной жидкости и периферической крови можно использовать в комплексной диагностике пациентов с деформирующими заболеваниями суставов.

Библиографические ссылки

1. Calcium, magnesium, zinc and lead concentrations in the structures forming knee joint in patients with osteoarthritis / D. I. Kosik-Bogacka [et al.] // J Trace Elem Med Biol. 2018. Vol. 50. P. 409-414.
2. Gaffney-Stomberg, E. The impact of trace minerals on bone metabolism / E. Gaffney-Stomberg // Biol Trace Elem Res. 2019. Vol. 188, №. 1. P. 26-34.

ОСОБЕННОСТИ ИК СПЕКТРОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ДИСЛИПИДЕМИЕЙ

Королик Е.В., Гольцева М.В., Жуковская В.А., Лубневская Г.Г., Иванов А.А.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

В настоящее время метод ИК спектроскопии, благодаря существенному повышению его аналитических возможностей в результате использования ИК-Фурье-спектрометров, находит все большее применение в медико-биологических исследованиях, в частности, для компонентного анализа плазмы крови и структуры входящих в ее состав белков, диагностики на этой основе различных заболеваний. В последние годы все больший интерес вызывает структура и метаболизм липидов в организме. Поэтому любая дополнительная информация о структурно - функционального состояния основных транспортных систем плазмы крови у пациентов с дислипидемией позволит более четко подходить к вопросу о коррекции нарушений липидного обмена, которая является актуальной проблемой практической медицины.

Целью данной работы является анализ ИК спектров плазмы крови здоровых доноров, пациентов с инфарктом мозга и пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) для подтверждения наличия или отсутствия возможных конформационных изменений молекул альбумина в плазме крови пациентов с дислипидемией разного генеза.

В работе использовалась плазма крови здоровых доноров – контрольная группа (n=34); пациентов с лакунарным инфарктом головного мозга и дислипидемией (n=22); ишемической болезнью сердца и дислипидемией (n=21). Для проведения ИК спектроскопических исследований плазмы крови пациентов нами были получены тонкие пленки на поверхности оптических окон из кристаллов KRS-5 путем нанесения дозированного количества разбавленной плазмы. В работе в качестве модельных соединений были использованы альбумин и липопротеины низкой плотности (Sigma, США). ИК спектры в области частот 400-4000 см⁻¹ регистрировались на ИК-Фурье спектрометре (Nicolet Analytical Instruments, США) при спектральном разрешении 2 см⁻¹ и числе сканирований 256.

Ранее нами методом флуоресцентного зондирования была проведена оценка связывающей способности альбумина и липопротеинов в плазме крови пациентов с лакунарным инфарктом головного мозга с дислипидемией и ИБС. Установлено, что при этих заболеваниях наблюдается увеличение связывающей способности зонда АНС в плазме крови пациентов, что может быть обусловлено либо изменением концентрации альбумина в плазме крови, либо его загруженностью лигандами, вызывающими конформационные изменения белка, которые, в свою очередь, приводят к появлению дополнительных центров связывания на альбумине. По данным биохимического анализа концентрация альбумина уменьшалась для обеих групп пациентов на 23% и 29,5%, соответственно.

Для подтверждения наличия или отсутствия возможных конформационных изменений молекул альбумина в плазме крови пациентов были прописаны и проанализированы ИК спектры пленок плазмы крови контрольной группы, пациентов с инфарктом мозга и пациентов с ИБС с различным уровнем липопротеинов. Сравнительный анализ ИК спектров этих образцов плазмы крови показал, что отличия в исследуемых образцах плазмы крови наблюдаются только в областях 3000-2800 см⁻¹ и 1800-1700 см⁻¹, которые обусловлены липидной составляющей липопротеинов. Форма контура, положение максимумов и относительные интенсивности полос Амид I, Амид II и Амид III практически такие же, как в спектре плазмы крови контрольной группы и альбумина. Так как полосы Амид I, Амид II и Амид III чувствительны к изменению вторичной и третичной структуры белков, то можно утверждать, что структура белков, в частности альбумина, в плазме крови пациентов с инфарктом мозга, ИБС и контрольной группы практически одинакова. Это свидетельствует об отсутствии дополнительных связывающих центров на данном транспортном белке.

ВЛИЯНИЕ БИЛИРУБИНА НА ФОТОПОВРЕЖДЕНИЯ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН

Крученюк Ю.В., Ананич Т.С., Плавский В.Ю.

*Институт физики имени Б.И. Степанова Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Беларусь*

Способность билирубина при высоких концентрациях в крови новорожденных детей оказывать токсическое действие на организм ребенка не подлежит сомнению. При концентрациях указанного пигмента, превышающих связывающую способность сывороточного альбумина, он взаимодействует с клетками крови, тканей, а также головного мозга младенца, вызывая развитие желтухи, а в некоторых случаях – энцефалопатии. Одним из наиболее распространенных способов снижения уровня билирубина в крови новорожденных при развитии гипербилирубинемии является фототерапия, основанная на способности излучения, соответствующего спектру поглощения билирубина, вызывать его фотоизомеризацию с образованием более гидрофильных и менее токсичных продуктов. В настоящее время в фототерапевтических аппаратах в основном используются светодиоды синей и сине-зеленой областей спектра. При этом, несмотря на широкое применение указанных методов фототерапии, возможные побочные эффекты при ее проведении продолжают привлекать внимание.

В настоящей работе воздействие света в присутствии и отсутствие билирубина на клетки крови исследовали на примере эритроцитов взрослых доноров. Эритроциты, выделенные по стандартной методике, инкубировали в отсутствие (контроль) или в присутствии 171 мкМ билирубина при 37 °С и pH 7,4 в течение часа. Суспензии эритроцитов облучали при перемешивании в течение 20 минут светом с длинами волн 465 нм и 512 нм при плотности мощности на уровне поверхности образцов ~ 12 мВт/см². Для определения вклада активных форм кислорода в фотоповреждение мембран использовали тушитель синглетного кислорода азид натрия. Повреждающее действие света на эритроциты оценивали по изменению концентрации ионов калия и поглощению гемоглобина в облученной клеточной суспензии относительно необлученной. Концентрацию ионов калия в растворе, содержащем эритроциты, измеряли с помощью атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно-связанной плазмой (IRIS Intrepid II XDL). Наличие гемоглобина в растворе определяли спектрофотометрически.

Результаты экспериментов показывают, что облучение суспензии эритроцитов без билирубина практически не сказывается на выходе калия в окружающий клетки раствор при их хранении в темновых условиях. Но в присутствии билирубина излучение зеленой области спектра оказывало более выраженный эффект по сравнению со светом синей области спектра на выход ионов калия. В то же время, при контроле выхода гемоглобина из эритроцитов, облученных без билирубина, отмечается, что они (при темновом хранении в течение 18 часов) теряют гемоглобин почти в два раза активнее, чем в случае облучения с билирубином. Полученные результаты, с одной стороны, свидетельствуют о способности излучения сине-зеленой области спектра оказывать повреждающее действие на мембраны эритроцитов в отсутствие билирубина, а с другой стороны – о способности билирубина оказывать антиоксидантное действие, значительно превышающее его сенсibilизирующие способности. Вероятно, это связано с очень низким значением квантового выхода генерации синглетного кислорода ($\Phi_{\Delta} \approx 1\%$) и высокой константой скорости тушения синглетного кислорода билирубином ($9 \cdot 10^8$ М⁻¹с⁻¹). Исследования показали, что вклад синглетного кислорода в фотоповреждение мембран эритроцитов при воздействии излучения синей и зеленой областей спектра незначителен: добавление азид натрия в облучаемую среду слабо сказывается на величине фотобиологического эффекта.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ КОМПЛЕКС НА ПЛАТФОРМЕ ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОГО НАНОАЛМАЗА

Луговский А.А.¹, Белько Н.В.², Гусаков Г.А.², Пархоменко В.А.¹, Луговский А.П.²

¹ Учреждение БГУ «Республиканский центр проблем человека»,
Минск, Беларусь

² НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ, Минск, Беларусь

В современной медицине все большее внимание уделяется развитию методов диагностической визуализации патологических очагов и их мониторинга в процессе лечения с высокой чувствительностью и молекулярной специфичностью. В связи с этим разработка новых флуоресцентных зондов для области прозрачности тканей является актуальной задачей. Такие соединения должны быть малотоксичными, обладать высокой степенью селективности накопления в клетках-мишенях, а также характеризоваться высоким коэффициентом поглощения и квантовым выходом флуоресценции. Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза (УДА) являются одной из наиболее привлекательных платформ для создания подобных комплексов. Малый размер частиц (порядка 5 нм) и их низкая токсичность делают УДА безопасными при внутривенном введении. Большая активная поверхность частиц УДА и потенциальная возможность управления ее функциональным составом делают этот материал весьма привлекательным для использования в качестве платформы для исследований клеточных процессов в биологии, диагностики и лечения болезней.

Ранее нами был синтезирован ряд красителей класса индотрикарбоцианиновых с орто-фениленовым мостиком, которые характеризуются поглощением в желто-красной области спектра и люминесценцией в красном и ближнем инфракрасном диапазонах, что соответствует области прозрачности живых тканей. Кроме того, испытания *in vivo* некоторых из этих красителей показали наличие высокой селективности накопления в опухолевых тканях. Таким образом, индотрикарбоцианиновые красители являются перспективным материалом для разработки систем визуализации биологических процессов.

Для увеличения эффективности флуоресцентного зонда был разработан наноразмерный комплекс на основе ультрадисперсного алмаза. Данные нанообъекты малотоксичны и способствуют увеличению селективности накопления препарата в ткани-мишени. В настоящей работе исследовался алмаз марки УДА-СП производства ЗАО «Синта» (г. Минск). Предварительная обработка УДА заключалась в проведении вакуумного отжига при $T \leq 750$ °С. При данной обработке структура алмазных наночастиц не затрагивается, однако при этом происходит практически полное удаление с поверхности УДА кислород- и азотсодержащих функциональных групп. Далее на поверхность УДА вводилась карбоксильная группа методом озонирования в щелочной среде в присутствии перекиси водорода. Полученные карбоксильные группы переводили в хлорангидридные воздействием оксалилхлорида и затем вводили в реакцию с гексаметилендиамином. Данный УДА ковалентно связывался с индотрикарбоцианиновым красителем через его активированный сукцинимидный эфир.

Промежуточные образцы УДА и конечный продукт исследовались методами колебательной ИК-спектроскопии, спектроскопии поглощения и флуоресценции. Полученные спектры подтверждают функционализацию промежуточных УДА, а также ковалентное привитие молекулы индотрикарбоцианинового красителя с поверхности УДА. При этом не наблюдается каких-либо значительных изменений в спектрах поглощения и флуоресценции наноструктуры УДА-краситель по сравнению с исходным индотрикарбоцианиновым красителем.

ПУЛЬСОВАЯ ВОЛНА В МАЛЫХ ИЗВИЛИСТЫХ СОСУДАХ

Кубарко А.И., Мансуров В.А.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Пульсовая волна (ПВ) – процесс взаимодействия двух сред: упругой (твердая фаза) и жидкой (жидкая фаза) – является важным фактором, влияющим на процессы циркуляции, которые в настоящее время недостаточно изучены, особенно в малых извилистых сосудах [1].

Следует отметить важные особенности малых сосудов, влияющие на процесс распространения пульсовой волны: значительная извилистость и разветвленность; наличие силы Кориолиса; сложность визуального и инструментального наблюдения. Однако развитие средств вычислительной математики дает возможность численно моделировать эти процессы с целью их детального изучения [2]. Основная **задача** данной работы показать средствами численного анализа зависимость скорости пульсовой волны от кривизны изгиба сосуда.

Методом конечных разностей моделировалось распространение ПВ в изогнутом сосуде (рис 1), с радиусом изгиба R , внутренним радиусом r , толщиной стенки h при учете нестационарного взаимодействия упругой среды (модуль Гука $E = 10^4$ Па, коэффициент Пуассона $\mu = 0,41$, плотность $\rho_y = 1200$ кг/м³) и жидкой среды (вязкость $\eta = 5$ мПа·с, $\rho_{ж} = 1050$ кг/м³). В ходе моделирования изменялся радиус кривизны от $R = 35$ мм до $R = 150$ мм модельного сосуда при фиксированных остальных параметрах.

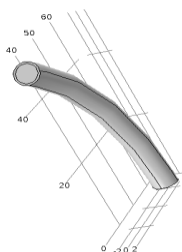


Рис. 1. Форма модельного сосуда

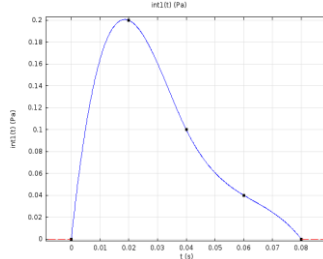


Рис. 2. Импульс давления на входе модельного сосуда

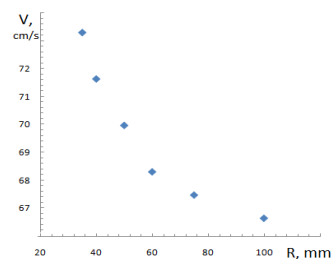


Рис. 3. Зависимость скорости ПВ V от радиуса изгиба R

Граничные и начальные условия: на входе сосуда задавался импульс давления (рис. 2); на выходе сосуда полагалось, что давление равно 0; выполняются условия прилипания на стенке сосуда; внешняя граница сосуда может свободно двигаться и наличие неотражающих условий на входе и выходе модельного сосуда.

Для проверки результатов моделирования посредством сравнения использовалась формула Моенса-Кортевега, с указанными характеристиками сред. Анализируется расстояние прошедшей волны давления для двух времен максимумов волнового процесса. На основе этих данных вычисляется скорость пульсовой волны V .

В результате (рис. 3) выявлена зависимость скорости пульсовой волны от кривизны сосуда (радиуса изгиба) – чем меньше кривизна, тем больше скорость. Объяснить можно неоднородной деформацией стенки при распространении пульсовой волны: упругая изогнутая трубка стремится выровняться под действием внутреннего давления

Библиографические ссылки

1. Safar M. E., Lacolley P. Disturbance of macro- and microcirculation: relations with pulse pressure // Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007. Vol. 293. P - H1–H7.
2. Taylor C.A and. Humphrey J.D Open Problems in Computational Vascular Biomechanics // Comput Methods Appl Mech Eng. 2009. Vol. 198. P. 3514–3523.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ МОНОФЕНОЛОВ ПРИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Мартинovich И.В.¹, Побат В.С.¹, Мартинovich Г.Г.¹, Зенков Н.К.², Меньщикова Е.Б.²,
Черенкевич С.Н.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины,
Новосибирск, Россия

Поиск эффективных методов лечения и профилактики онкологических заболеваний, несмотря на достигнутые в последние десятилетия успехи, остается одной из наиболее актуальных задач в медицине. В последнее время в качестве перспективных противоопухолевых препаратов активно исследуются природные и синтетические фенольные антиоксиданты [1, 2]. Фенольные антиоксиданты характеризуется высокой селективностью токсического действия в отношении опухолевых клеток. Предполагается, что селективная токсичность фенолов может быть обусловлена специфичностью редокс-условий в опухолях.

В опухолевых клетках в сравнении с нетрансформированными клетками наблюдается значительное повышение концентрации восстановителей, в результате которого функциональный ответ трансформированных клеток на внеклеточные сигналы отличается от реакции нормальных клеток [3, 4]. Для изучения роли восстановительного стресса в реализации механизма действия синтетических серосодержащих монофенолов нами проведено сравнительное исследование действия 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)этилтиосульфат натрия (ТС-12) и 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилсульфонат натрия (С-13) на клетки карциномы гортани линии НЕР-2 и их субпопуляцию, характеризующуюся большим содержанием восстановителей и более высокой химиорезистентностью в сравнении с контрольными клетками.

Показано, что ТС-12 в микромолярных концентрациях снижает скорость роста клеток линии НЕР-2 в культуре. Однако при действии антиоксиданта С-13, у которого в сравнении с ТС-12 в пара-пропильном заместителе тиосульфатная группа заменена сульфонатной, снижения скорости роста клеток линии НЕР-2 не наблюдалось. При действии ТС-12 и С-13 в культуре субпопуляции клеток линии НЕР-2 с более высоким содержанием восстановителей в сравнении с исходной линией токсическое действие проявляли оба соединения. При действии фенольных антиоксидантов в концентрации 80 мкМ гибель клеток в субпопуляции с более высоким содержанием восстановителей была больше на 30 %. Таким образом, внутриклеточные редокс-условия являются важным фактором, определяющим специфичность действия редокс-активных фенолов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б20У-1).

Библиографические ссылки

1. Berman A.Y., Motechin R.A., Wiesenfeld M.Y. et al. The Therapeutic Potential of Resveratrol: A Review of Clinical Trials // NPJ precision oncology. 2017. Vol. 1, P. 1–9.
2. Salehi B., Stojanovic-Radic Z., Matejic J. et al. therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials // Eur. J. Med. Chem. 2019. Vol. 163. P. 527–545.
3. Мартинovich Г.Г., Мартинovich И.В., Меньщикова Е.Б. и др. Редокс-свойства опухолевых клеток // Доклады НАН Беларуси. 2015. Том 59, № 3. С. 82–87.
4. Martinovich G.G., Martinovich I.V., Vcherashniaya A.V. et al. Mechanisms of Redox Regulation of Chemoresistance in Tumor Cells by Phenolic Antioxidants // Biophysics. 2017. Vol. 62, No. 6, P. 942–949.

СИНТЕЗ И РЕАКЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ХЛОРАМИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Мурина М.А.¹, Сергиенко В.И.¹, Рощупкин Д.И.^{2,1}

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

²ГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова» Минздрава, Москва, Россия

Хорошо известна важная роль химических модификаций молекулярных мишеней в терапевтическом действии многих лекарственных субстанций, называемых необратимыми (ковалентными) ингибиторами [1]. Нами было обнаружено явление необратимого ингибирования аминокислотными хлораминами функциональной активности тромбоцитов. В модели экспериментального тромбоза у мышей было установлено, что хлораминовые производные аминокислот и таурина оказывают эффективное противотромботическое действие [2]. Эти соединения также проявляют свойства антикоагулянтов [3]. Однако аминокислотные хлораминовые соединения взаимодействуют с сывороточным альбумином, что обуславливает применение этих соединений в относительно высоких концентрациях [4]. Настоящая работа направлена на создание на основе хлораминовых производных пуриновых и пиримидиновых оснований нового антиагреганта, молекулярной мишенью которого будут выступать рецепторы агонистов в тромбоците, определяющие активацию клетки.

Была разработана технология получения хлораминовых соединений, имеющих в своем составе пуриновые основания, в реакции с гипохлоритом натрия. Определены концентрации компонентов этих реакций, значения pH, обеспечивающие максимальный выход хлораминов. Для количественного определения исследуемых хлораминов отработан вариант спектрофотометрической йодометрии, позволяющей отличить хлорамины от возможных примесей гипохлорита. В опытах с серосодержащими пептидами и аминокислотами показано, что модифицирующая способность этих соединений характеризуется выраженной химической избирательностью по отношению к тиолам. Установлено, что новые хлораминовые соединения проявляют специфическую фармакологическую активность как антиагреганты. Они эффективно ингибируют АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Антиагрегантное свойство новых биогенных хлораминов, вероятно, обусловлено их способностью не только связываться с пуриновыми рецепторами, но и химически модифицировать серосодержащие группы рецепторов плазматической мембраны тромбоцита. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00532. Funding: The reported study was funded by RFBR, project number 20-04-00532.

Библиографические ссылки

1. Patrono C., Morais J., Baigent C. et al. Antiplatelet Agents for the Treatment of Coronary Atherothrombosis // J. Amer. College of Cardiology. 2017. Vol. 70, No.14. P.1760-1776.
2. Murina M.A., Fesenko O.D., Sergienko V.I. et al. Antithrombotic Activity of N,N-Dichlorotaurine on Mouse Model of Thrombosis *in Vivo* // Bull Exp Biol Med. 2002. Vol.134. N 1. P. 36-38.
3. Murina M.A., Roshchupkin D.I., Kondrashova K.V. et al. Inhibition of Plasma Coagulation and Platelet Aggregation with Structural Analogs of Taurine Chloramine// Bull Exp Biol Med. 2014. Vol. 157. N 2. P. 207-210.
4. Roshchupkin D.I., Buravleva K.V., Murina M.A. et al. A fluorometric study of modification of bovine serum albumin with structural analogues of taurine chloramine // Biophysics. 2017. Vol. 62. N 1. P. 24–30.

БИОМЕХАНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И ОЦЕНКА ОТДАЛЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ КОНСЕРВАТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ ВЫСОКИХ ПЕРЕЛОМОВ МЫШЕЛКОВОГО ОТРОСТКА НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ

Николаева-Киселевич А.И., Мирончик М.И., Гольцев М.В.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Проблема травматизма челюстно-лицевой области весьма актуальна. Повреждения костей лицевого отдела черепа составляют около 3% от общего числа переломов костей скелета. Среди них переломы нижней челюсти (НЧ) составляют 60-80%. Переломы в области мышелковых отростков (МО) составляют 25-40% в структуре травматических повреждений нижней челюсти. Особое место занимают субкондилярные переломы, их частота варьирует в пределах 3-14%. Основными методами лечения переломов мышелковых отростков нижней челюсти являются консервативный и хирургический. Консервативное лечение, заключающееся в применении назубных репонирующих пелотов, в определенной степени коррелирует с особенностями биомеханики нижней челюсти. Поэтому целью работы являлась оценка результатов консервативного лечения субкондилярных переломов нижней челюсти и изучение эффективности консервативного лечения с учетом биомеханических представлений процессов перемещения височно-нижнечелюстного сустава (ВНЧС). Было проведено клиническое и рентгенологическое обследование 30 пациентов, которые проходили лечение в период с 2014 года по 2018 год. Возраст пациентов варьировал от 18 до 64 лет, среди них было 16 мужчин (53,3%) и 14 женщин (46,7%).

Для определения изменений биомеханики нижней челюсти при высоких переломах мышелковых отростков в дальнейшем рассматривали данную кость как рычаг второго рода, представив ее для этого в виде пространственной рамы. Определили параметры нижней челюсти у пациентов с субкондилярными переломами после проведенного консервативного лечения. Для диагностики и определения степени тяжести дисфункции ВНЧС использовался индекс Helkimo.

Результаты консервативного лечения можно расценивать как удовлетворительные, в основном отмечаются признаки легкой дисфункции ВНЧС: от 1 до 4 баллов по индексу дисфункции ВНЧС Helkimo. Рентгенологическое наблюдение показало, что при высоких переломах мышелковых отростков в среднем теряется до 20% вертикальной высоты ветви нижней челюсти по сравнению с противоположной стороной. Угол нижней челюсти составил $128,2 \pm 2,3^\circ$, угол наклона ветви нижней челюсти - $30,1 \pm 1,4^\circ$, проекционная высота мышелка - $51,7 \pm 1,6$ мм, расстояние от подбородочного выступа до точки угла нижней челюсти - $86,0 \pm 1,6$ мм.

Проведенное исследование показало, что консервативное лечение субкондилярных переломов нижней челюсти имеет удовлетворительные результаты. С учетом рассмотрения биомеханических процессов в ВНЧС можно предполагать, что увеличение угла нижней челюсти носит компенсаторный характер, и при консервативном лечении переломов мышелковых отростков нижней челюсти биомеханика нижней челюсти существенно не изменяется.

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ УБИХИНОЛА ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ НА МОДЕЛИ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

Оболенская О.Н., Городецкая Е.А., Каленикова Е.И., Медведев О.С.

МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия

Аннотация. Инсульт продолжает быть ведущей причиной смерти и инвалидности во всем мире. Окислительный стресс играет ключевую роль в патогенезе заболевания и приводит к повреждению клеток свободными радикалами. Убихинол (восстановленная форма Коэнзима Q10) является высокоэффективным антиоксидантом. Изучали инновационную водорастворимую форму убихинола (1% водный раствор солюбилизированного убихинола, патент # RU2635993-C1), для внутривенного введения.

Цель исследования. Оценка нейропротекторного потенциала Убихинола.

Методы. Эксперимент был проведен на 31 взрослых самцах крыс Wistar (300 - 340 г). Фокальная транзиторная ишемия головного мозга выполнялась по методу Лонга (модель окклюзии левой средней мозговой артерии при помощи филамента, МСАО). Все животные были случайным образом разделены на 3 группы: 1 – ложнооперированные (n=7); 2-МСАО-растворитель (n=16); 3 - МСАО-Убихинол (n=8). Животных анестезировали хлоралгидратом (300 мг/кг, внутривентрально) и подвергали 60 минутной окклюзии средней мозговой артерии филаментом. Через 60 минут нить удаляли. Введение внутривенной дозы убихинола (30 мг/кг) или растворителя (равного объема) проводили через 45 минут после начала окклюзии. Послеоперационный неврологический дефицит во всех группах оценивали спустя 24 часа с помощью теста mNSS (шкала от 0 до 18 баллов: чем ниже оценка, тем больше неврологический дефицит). Затем крыс эвтаназировали, головной мозг животного брали для дальнейшего анализа. Объем ишемического поражения измеряли морфометрически после окрашивания тканей мозга 2%-ТТХ раствором. Процент ишемии был рассчитан как: $100 \times \text{инфаркт объем} / \text{ипсилатеральный объем полушария}$. Общий уровень коэнзима Q10 был измерен в ипсилатеральном и контралатеральном полушариях с помощью HPLC-анализа.

Результаты. Уровень эндогенного коэнзима Q10 в группе МСАО-растворитель был значительно снижен как в ипси- ($14,6 \pm 2,3$ мкг/г), так и в контралатеральном ($15,7 \pm 1,6$ мкг/г) полушариях по сравнению с ложнооперированной группой ($18,8 \pm 1,9$ мкг/г), $p < 0,01$. Однократная внутривенная инъекция раствора солюбилизированного Убихинола восстанавливала уровень коэнзима Q10 до нормальных (эндогенных) значений как в ипси- ($20,0 \pm 3,7$ мкг/г), так и в контралатеральном ($22,0 \pm 6,1$ мкг/г) полушариях. Смертность в группе МСАО-растворитель составила 43% (7/16 крыс погибло), и ни одно животное не погибло в группе МСАО-Убихинол. В ложнооперированной группе не было ни неврологического дефицита, ни повреждений мозга. Все крысы из групп МСАО продемонстрировали значительное снижение баллов неврологического дефицита по сравнению с ложнооперированными (ЛО: $17,3 \pm 2,0$ балла). Общий неврологический балл в группе МСАО-Убихинол был значительно выше по сравнению с группой МСАО-растворитель ($11,1 \pm 1,2$ по сравнению с $7,3 \pm 2,0$ балла соответственно, $p < 0,01$). Объем инфаркта в группе МСАО-Убихинол составил $15,4 \pm 11,3\%$ и был ниже на 52% по сравнению с группой МСАО-растворитель ($32,2 \pm 13,4\%$, $p < 0,01$).

Вывод. Внутривенное введение Убихинола защищает мозг в условиях фокальной транзиторной ишемии у крыс, что свидетельствует о возможном терапевтическом потенциале Убихинола при острых ишемических состояниях.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ БИЛИРУБИНА В ПЕРВОМ ДОМЕНЕ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА

Побойнев В.В.¹, Хрусталёв В.В.¹, Стожаров А.Н.¹, Хрусталёва Т.А.²

¹*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

²*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Сывороточный альбумин является главным компонентом сыворотки крови, выполняя функцию поддержания осмотического давления и транспорта различных эндогенных (билирубин, жирные кислоты, тироксин и др.) и экзогенных лигандов. В банке данных трёхмерных структур белков имеется 108 моделей с сывороточным альбумином человека. Большинство из них содержит информацию и о структуре какого-либо лиганда. Из 108 структур лишь одна 3D модель представляет собой комплекс сывороточного альбумина с билирубином (2VUE), на которой присутствует лишь одна молекула билирубина [1]. Известно также, что одна молекула альбумина связывает до четырёх молекул тироксина [2] и до 11 молекул жирных кислот [3]. При этом остаётся нерешённым вопрос о специфичности связывания каждого из этих лигандов сывороточным альбумином человека, о последовательности связывания каждого лиганда и о их влиянии на вторичную и третичную структуры белка.

Чтобы приблизиться к пониманию поставленных вопросов проведён молекулярный докинг эндогенных лигандов со структурой сывороточного альбумина человека при помощи сервера Molecular Docking Server. Информацию о структуре билирубина, тироксина и пальмитиновой кислоты брали из базы данных PubChem. В качестве модели белка, к которой проводили докинг выбрали структуру 4K2C, содержащую исключительно записи про координаты атомов белка и не имеющую аминокислотных замен. Для определения свободной энергии связывания лигандов с альбумином в качестве аминокислот-связывателей выбрали те, которые взаимодействуют с билирубином на единственной трёхмерной структуре альбумина и билирубина 2VUE [1]. Для определения характера взаимодействия между эндогенными лигандами и сывороточным альбумином человека использовали алгоритм PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler).

По результатам докинга билирубина, тироксина и пальмитиновой кислоты к структуре сывороточного альбумина, получены следующие значения энергии связывания и константы ингибирования: -4,61 ккал/моль, 417,38 мкмоль/л; -6,83 ккал/моль, 9,83 мкмоль/л; -5,16 ккал/моль, 164,28 мкмоль/л, соответственно. Более низкие значения констант ингибирования и энергии связывания пальмитиновой кислоты и тироксина доказывают, что известный сайт связывания билирубина может связывать его только в отсутствии жирных кислот, что не соответствует физиологическим концентрациям этих веществ в крови. Вероятно билирубин связывается с альбумином за счёт другого сайта связывания, возникающего за счёт изменения третичной структуры белка после взаимодействия с жирными кислотами, при возможном непосредственном участии последних в связывании. Тироксин также способен вытеснить билирубин из известного сайта связывания, однако его физиологическая концентрация настолько мала, что не может повлиять на содержание несвязанного билирубина в крови.

Библиографические ссылки

1. Zunszain P. A., Ghuman J., McDonagh A. F. et al. Crystallographic Analysis of Human Serum Albumin Complexed // J. Mol. Biol. 2008. Vol. 381. P. 394-406.
2. Petitpas I., Petersen C. E., Ha C. E. et al. Structural basis of albumin-thyroxine interactions // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003. Vol. 100. P. 6440-6445.
3. Bhattacharya A. A., Grüne T., Curry S. Crystallographic Analysis Reveals Common Modes of Binding of Medium and Long-Chain Fatty Acids to Human Serum Albumin // J. Mol. Biol. 2000. Vol. 303. P. 721-732.

ГАЛЛОЦИАНИН КАК ХЕМОСЕНСОР ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ЭФФЕКТА ГРАНУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ НЕЙТРОФИЛОВ НА РЕСПИРАТОРНЫЙ ВЗРЫВ

Ревт В.Е.¹, Горудко И.В.¹, Григорьева Д.В.¹, Соколов А.В.^{2,3}, Панасенко О.М.²

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

³ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

При дегрануляции, нетозе и некрозе нейтрофилов во внеклеточное пространство попадают многие высоко- и низкомолекулярные соединения, в том числе белки гранулярного аппарата, способные модулировать свойства самих нейтрофилов. Ранее нами было показано, что миелопероксидаза, белок азурофильных гранул нейтрофилов, может аутокринно активировать клетки [1]. С использованием недавно предложенного флуорогена для регистрации продукции супероксидного анион-радикала (O_2^-) галлоцианина (GC) [2] нами было исследовано действие лактоферрина (LF, белка специфических гранул), эластазы (NE, белка азурофильных гранул) и лизоцима (LZ, белка специфических и азурофильных гранул) на активность НАДФН-оксидазы нейтрофилов.

Продукцию O_2^- оценивали флуоресцентным методом при помощи GC (5 мкМ, $\lambda_{\text{ex}} = 360$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 490$ нм). Для характеристики продукции O_2^- использовали скорость превращения GC (v) и интенсивность флуоресценции (h), отражающую количество накопившегося флуоресцирующего продукта реакции [2]. В качестве агониста использовали хемотаксический пептид N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP, 0,5 мкМ). Все измерения проводили при 37 °С в PBS, содержащем 1 мМ CaCl_2 и 0,5 мМ MgCl_2 .

Исследуемые белки в отсутствие дополнительного стимула (fMLP) не активировали продукцию O_2^- нейтрофилами ($1 \cdot 10^6$ кл/мл). Преинкубация нейтрофилов с 3-10 мкМ LF, 9-36 мкМ LZ либо 0,02-0,4 мкМ NE при стимуляции нейтрофилов fMLP привела к увеличению параметров флуоресценции (в 1,5-2,5 раза по сравнению с контролем), что свидетельствует о праймирующем эффекте гранулярных белков в отношении нейтрофилов.

Полученные результаты указывают на общее свойство нескольких белков гранулярного аппарата нейтрофилов – аутокринный прайминг клеток, а также демонстрируют перспективность применения GC в качестве флуорогенного хемосенсора при изучении влияния белков гранул нейтрофилов на их респираторный взрыв. Скрининг различных эффекторов на функциональную активность нейтрофилов важен для тестирования препаратов, разрабатываемых для коррекции воспалительных заболеваний, сопровождаемых развитием окислительного стресса.

Работа поддержана грантами БРФФИ (Б19PM-024) и РФФИ (18-515-00004 и 19-54-04004).

Библиографические ссылки

1. Григорьева Д.В., Горудко И.В., Соколов А.В. и др. Миелопероксидаза стимулирует дегрануляцию нейтрофилов // БЭБиМ. 2016. Т.161, № 4. С. 483–488.
2. Луценко В.Е., Григорьева Д.В., Горудко И.В. и др. Взаимодействие активных форм кислорода с галлоцианином при активации нейтрофилов // Докл.НАНБел. 2019. Т.63, №6. С. 730–735.

КВАНТОМЕХАНИЧЕСКИЙ РАСЧЕТ ЗАРЯДА АКТИВНОГО ХЛОРА И АНАЛИЗ РЕАКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ХЛОРАМИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТОК АДЕНОЗИНА

Рощупкин Д.И.^{1,2}, Мурина М.А.¹

¹ГБОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова" Минздрава, Москва, Россия

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Известно, что при действии гипохлорита натрия на аденозин образуется хлораминовое производное [1,2]. В настоящей работе были исследованы физико-химические свойства новых хлораминовых соединений, в состав которых входит аденозин.

Квантомеханические расчеты молекулярных характеристик, определяющих реакционную способность хлораминов, были проведены с помощью программы GAMESS (ChemBio 3D). Оптимизацию геометрии и полной энергии осуществляли методом функционала плотности B3LYP, базис 6-31G(d,p); водное окружение моделировали поляризуемым континуумом с соответствующей диэлектрической постоянной. Расчет свойств молекул хлораминов (например, дипольного момента), характеристик хлораминовой группы атомов, включая ее ориентацию и атомные заряды Малликена, проводили в базисе 6-311. На старте двугранный угол, образованный атомами "Cl-N-C-C", составлял 180 град.

Показано, что парциальный заряд активного хлора слабо изменяется при введении в аденозина других химических групп-заместителей. Дипольный момент аденозина заметно уменьшается при его превращении в хлораминовое производное.

Установлено, что исследуемые хлорамины реагируют с серосодержащими (сульфгидрильными и сульфидными) группами. Определены константы скоростей реакций с метионином. Эти константы не высокие и у различных соединений мало отличаются друг от друга. Установлена определенная связь между константами скорости реакции хлораминов с метионином и их расчетными молекулярными показателями.

Хлораминовые производные аденозиновых соединений представляют тот интерес, что можно ожидать их ковалентного действия на аденозиновые рецепторы клеток. Поэтому эти соединения, тем самым, могут выступать как инструмент изучения пуриновых рецепторов. В частности, использование этих соединений в медико-биологических исследованиях позволит понять молекулярный механизм изменения функций тромбоцитов при ковалентной модификации их рецепторов, выяснить новые механизмы регуляции тромбообразования и откроет перспективу создания терапевтически пригодных субстанций.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00532.

Acknowledgments: The reported study was funded by RFBR, project number 20-04-00532.

Библиографические ссылки

1. Prütz W.A. Hypochlorous Acid Interactions With Thiols, Nucleotides, DNA, and Other Biological Substrates // Arch. Biochem. Biophys. 1996. Vol. 332, No. 1. P. 110–120.
2. Bernofsky C. Nucleotide chloramines and neutrophil-mediated cytotoxicity// FASEB J. 1991. Vol. 5, No. 3. P. 295-300.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА И ФЕРРИТИНА С МИТОХОНДРИЯМИ СЕРДЦА

Рууге Э.К.^{1,2}, Медведева В.А.², Иванова М.В.¹, Дудылина А.Л.¹, Шумаев К.Б.^{1,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии», Москва, Россия, ²ФГБОУ «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Москва, Россия, ³Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

В течение последнего десятилетия в биофизических лабораториях мира заметно возрос интерес к динитрозильным комплексам железа (ДНКЖ) – одному из основных метаболитов оксида азота в организме. Было обнаружено, что ДНКЖ проявляют, независимо от парциального давления кислорода, четко выраженные антиоксидантные свойства, эффективно взаимодействуя с образованными в кардиомиоцитах активными формами кислорода [1,2]. Изучение процесса образования и деструкции ДНКЖ с различными лигандами внесло существенный вклад в понимание механизмов их взаимодействия с реакционноспособными свободными радикалами и роли в качестве депо и переносчика оксида азота в организме [2].

Хорошо известно, что ферритин является одним из основных белков метаболизма железа в организме. Ферритин – мультимерный, состоящий из субъединиц двух типов (легких и тяжелых) белок, чья функция заключается в секвестрации и хранении избытка железа в клетках. Супероксидные радикалы провоцируют выделение железа из ферритина в двухвалентной форме (Fe^{2+}), которое необходимо для синтеза ДНКЖ в клетках сердечной мышцы [2,3].

Наше исследование посвящено выяснению закономерностей образования и утилизации активных форм кислорода в системах, моделирующих окислительный стресс и гипоксию различной степени в клетках миокарда, а также выяснению особенностей антиоксидантного и антирадикального действия динитрозильных комплексов железа с глутатионовыми лигандами и ферритина. Исследование было проведено с помощью спектроскопии ЭПР. Для обеспечения заданного значения парциального давления O_2 в реакционной смеси образцы помещали в газопроницаемые Sub-Lite-Wall капиллярные трубки фирмы Zeus Industrial Products, Inc. (США). Генерацию супероксидных радикалов изолированными митохондриями сердца и модельной ферментной системой изучали с помощью ЭПР-видимого перехватчика $\text{O}_2^{\bullet-}$ TIRON. Перед регистрацией спектров ЭПР от ДНКЖ в реакционную смесь добавляли цистеин, переводящий диамагнитные биядерные ДНКЖ с глутатионом в парамагнитные мооядерные комплексы.

Полученные данные позволяют заключить, что ДНКЖ с тиольными лигандами, результативно взаимодействуя с ферритином, перехватывают реакционноспособные свободные радикалы в системах, моделирующих окислительный стресс в клетках сердечной мышцы. При этом в присутствии ферритина наблюдался значимый рост антиоксидантной активности динитрозильных комплексов железа.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты 18-015-00125 и 19-015-00444.

Библиографические ссылки

1. Дудылина А.Л., Иванова М.В., Шумаев К.Б. и др. Генерация супероксидных радикалов комплексом III митохондрий сердца // Биофизика. 2016. Т. 61. С. 304-309.
2. Shumaev K.B., Dudylina A.L., Ivanova M.V. et al. Dinitrosyl iron complexes // BioFactors. 2018, Vol. 44. P. 237-244.
3. Ruuge E.K., Zabbarova I.V., Sviryayeva I.V. et al. Redox status of cardiac cells. // Current Topics in Biophysics. 2005. Vol. 29. P. 37-45.

АКТИВИРУЕМЫЙ ИЗЛУЧЕНИЕМ БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНА ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Самцов М.П.¹, Луговский А.А.¹, Тарасов Д.С.¹, Воропай Е.С.², Петров П.Т.³, Губина Л.П.³, Залашко Л.М.³, Насек В.М.³, Савин А.О.³, Санько-Счисленок Е.В.³

¹*Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь*

²*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

³*Институт биоорганической химии НАН Беларуси*

Активное развитие метода фотодинамической терапии и внедрение его в различные сферы медицинской практики: онкологию, офтальмологию, гинекологию, урологию, стоматологию и др. связано с появлением в последнее время высокоэффективных фотосенсибилизаторов (ФС) и мощных компактных источников светового излучения. ФДТ является малоинвазивным и органосохраняющим методом лечения. В работе приведены результаты исследований свойств фотосенсибилизатора на основе модифицированного полиэтиленгликолем трикарбоцианинового красителя для фотодинамической терапии злокачественных новообразований активируемый лазерным или светодиодным излучением 740 – 780 нм.

Оптимизирована схема синтеза трикарбоцианинового красителя с выходом 70 % и последующим выделением целевого продукта с чистотой 99,5%, наработаны экспериментальные образцы ФС в количестве по 40 грамм (100 доз для человека).

Проведены токсикологические исследования прототипа лекарственной формы ФС. Установлено, что LD50 составляет для самцов 113 мг/кг и самок 92 мг/кг (мыши нелинейные), что позволяет отнести ФС к 6 классу опасности (относительно безвредно). Определена фармакокинетика накопления ФС в перевивных опухолях асцитной карциномы Эрлиха, карциномой легких Льюиса (LLC) на мышах ICR, а также меланомы (Clone M-3) на мышах линии C57BL/6. Индекс контрастности в опухолевых тканях для исследованных штаммов по сравнению с окружающими мышечными и кожей составляет 5 – 8. Для трех штаммов злокачественных опухолей (асцитная карцинома Эрлиха, карцинома легких Льюиса и меланома Clone M-3) достигнут 100% коэффициент торможения роста опухоли, полная излеченность и увеличение продолжительности жизни в 2 раза.

В экспериментах на крысах с перевиваемой опухолью M1 in vivo установлено, что при увеличении длины волны фотовоздействия с 740 нм до 780 нм глубина некроза опухолевых тканей возрастает в несколько раз, что позволяет обеспечивать некроз массивных и глубококорасположенных опухолей (на крысах получена глубина до 2,7 см).

Установлена стабильность состава субстанции фотосенсибилизатора на основе трикарбоцианинового красителя в течении 3 лет при условии хранения при температуре не выше 6 °С. Разработанный ФС является потенциальным средством лечения меланомы в отличие от существующих фотосенсибилизаторов.

СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ ПРИ НАКОПЛЕНИИ В ТКАНЯХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Тарасов Д.С.¹, Самцов М.П.¹, Петров П.Т.², Насек В.М.², Савин А.О.²,
Санько-Счисленок Е.В.²

¹ НИИПФП им. А.Н. Севченко Белорусского государственного университета

² Институт биоорганической химии НАН Беларуси

Достижение успешного результата при проведении фотодинамической терапии определяется не только высокой эффективностью генерации фотосенсибилизатором (ФС) активных интермедиатов, но и правильно установленным протоколом проведения сеанса. Протокол фотодинамической терапии для конкретного ФС определяет его дозу, параметры источников света и сроки проведения фотовоздействия. При выборе временных параметров фотодинамического воздействия ориентируются на данные по фармакокинетике накопления ФС. Для исследования накопления ФС в тканях предпочтение отдается прямым методам, которые основаны на экстракции с помощью органических растворителей. Накопление и состояние ФС с полосами поглощения и флуоресценции в ближней инфракрасной области может быть выполнено посредством анализа спектрально-люминесцентных методов. Интенсивность флуоресценции при измерении контактным методом несет информацию о концентрации препарата. Оперативность получения с помощью контактной флуоресцентной спектроскопии спектральных данных позволяет контролировать процесс введения и накопления ФС непосредственно во время сеанса ФДТ.

Применение для экстракции индотрикарбоцианинового ФС [1] из тканей лабораторных животных или модельных сред на основе сыворотки крови наиболее распространенных для этих целей органических растворителей показало низкую степень его экстракции. Хотя из водных растворов ФС экстрагируется с почти стопроцентной эффективностью. На основании сравнительного анализа спектрально-люминесцентных свойств ФС в чистом экстрагенте, биологических образцах до экстракции и в супернатанте экстракта установлено, что краситель в экстрагент переходит в связанном с биомолекулами состоянии. Это затрудняет объективный контроль концентрации ФС в тканях экстракционными методами.

Исследована возможность определения концентрации индотрикарбоцианинового ФС в тканях лабораторных животных с помощью флуоресцентного контактного спектрометра. Зарегистрированы спектры флуоресценции ФС *ex vivo* при изменении толщины образцов тканей и органов мышей через 4 часа после его внутривенного введения в терапевтической дозе. Зависимость интенсивности флуоресценции ФС от толщины для всех образцов имеет сигмоидальный характер. Выполнена аппроксимация на основе теории переноса излучения в диффузном приближении. Аналогичный по характеру зависимости от толщины образца интенсивности флуоресценции ФС получены для модельного объекта на основе раствора ФС в сыворотке крови. Установлено, что фотофизические параметры индотрикарбоцианинового ФС в модельной среде на основе сыворотки крови близки к таковым в образцах тканей мышей. Показано, что раствор красителя в сыворотке крови может использоваться для калибровки при определении концентрации ФС в тканях путем регистрации сигнала флуоресценции контактным спектрометром *in vivo*.

Библиографические ссылки

1. Lugovski A. [et al.] Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics //J. Photochem. Photobiol. A. 2016. V. 316. P. 31-36.

РОЛЬ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АППАРАТА В ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ

Тимохина Е.П., Яглов В.В., Обернихин С.С., Яглова Н.В., Назимова С.В., Цомартова Д.А.

ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

Основными органеллами, обеспечивающими стероидогенез, являются митохондрии и гладкая эндоплазматическая сеть. Электронномикроскопические исследования стероидпродуцирующих клеток показали, что наибольшие изменения при подавлении или стимулировании синтеза стероидов претерпевают митохондрии, а следовательно, именно структура митохондриального аппарата служит показателем секреторной активности стероидпродуцирующих клеток [1, 2, 3]. Тем не менее, стероидогенная активность клеток как надпочечных желез, так и семенников и яичников претерпевает существенные изменения в постнатальном периоде онтогенеза. Наиболее сложное развитие и становление стероидогенеза наблюдаются в корковом веществе надпочечников. Однако изменения структуры митохондрий кортикостероцитов при развитии коркового вещества надпочечников и вклад этих изменений в обеспечение секреторного процесса изучены мало. В связи с этим, целью работы стало исследование структурных изменений митохондрий кортикостероцитов в клубочковой, пучковой и сетчатой зонах коркового вещества надпочечника крыс в процессе постнатального развития и сопоставление этих изменений с динамикой морфологических и функциональных показателей коркового вещества. Исследование проведено на 20 самцах крыс Вистар пубертатного и постпубертатного возраста. Определены количественные показатели структуры коркового вещества методом световой микроскопии и ультраструктуры кортикостероцитов с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, а также продукция соответствующих стероидных гормонов.

Выявлены изменения в продукции стероидных гормонов и структуре коркового вещества при переходе от полового созревания к половой зрелости. Установлено, что в процессе полового созревания происходит изменение размеров и числа митохондрий в кортикостероцитах, соответствующих показателям их функциональной активности. При переходе от пубертатного периода к половой зрелости в кортикостероцитах происходит реорганизация митохондриального аппарата, влияющая на активность стероидогенеза в большей степени, чем структурные изменения соответствующих зон коркового вещества. Изменения митохондрий, происходящие в клубочковой и сетчатой зонах, одинаковы, в то время как в пучковой зоне они носят качественно иной характер. Эти данные свидетельствуют о неоднозначности суждения о функциональной активности по изменению размеров зон и клеток коркового вещества надпочечников.

Библиографические ссылки

1. Domoto DT., Boyd JE., Mulrow PJ. et al. The Ultrastructure of the Adrenal Zona Glomerulosa of Rats on Potassium-Supplemented or Sodium-Depleted Diets // Am J Pathol. 1973. Vol. 72, №3. P. 433–446.
2. Nunnari J., Suomalainen A. Mitochondria: In sickness and in health // Cell. 2012. Vol. 148, №6. P. 1145–1159.
3. Zemirli N., Morel E., Molino D. Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions // Int J Mol Sci. 2018. Vol. 19, №2. P. 564.

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА В РЕЗУЛЬТАТЕ ИХ ЧРЕЗКОЖНОГО ВВЕДЕНИЯ В ОРГАНИЗМ КРЫС

Тимошин А.А.¹, Шумаев К.Б.^{1,2}, Лакомкин В.Л.¹, Абрамов А.А.¹, Рууге Э.К.^{1,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия;

²Институт биохимии имени А.Н.Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия;

³Физический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

Известно, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами являются одной из основных природных форм депонирования NO в организме животных и человека. Показано, что введение этих соединений с глутатионом путём их внутривенной, подкожной, внутрибрюшинной, и внутримышечной инъекций приводит к существенному и продолжительному гипотензивному эффекту [1]. Целью данной работы являлось исследование действия ДНКЖ с лигандами на основе глутатиона (ДНКЖ-Глт) и N-ацетил-L-цистеина (ДНКЖ-Ацц) в результате их чрезкожного введения в организм нормотензивных крыс Wistar.

В ходе работы проводился мониторинг АД, регистрация связанных с белками ДНКЖ в крови методом ЭПР, а также оценка общего уровня NO в ткани органов (сердце, лёгкое, печень, почка) с помощью такой липофильной спиновой ловушки NO, как комплексы ионов железа и диэтилдитиокарбамата (Fe-DETC₂) с регистрацией образующихся спиновых аддуктов NO-Fe-DETC₂ методом ЭПР.

В работе показано, что чрезкожное введение препарата ДНКЖ-Ацц приводило к небольшому гипотензивному эффекту (не более 5-10 %), сопровождающимся также некоторым повышением ЧСС. Методом ЭПР установлено, что нанесение на кожу животных этого соединения не приводило к формированию в крови регистрируемого количества связанных с белками моноядерных ДНКЖ. При этом сигналы NO с гемоглобином также не регистрировались.

В другой части работы проводилось исследование общего уровня NO в ткани органов (сердце, лёгкое, печень, почка) и его изменения в результате чрезкожного введения ДНКЖ. Установлено, что в результате чрезкожного введения в организм ДНКЖ-Ацц происходит существенный рост содержания спинового аддукта NO-Fe-DETC₂ в образцах ткани лёгких и печени животного, что свидетельствует об аналогичном увеличении в них общего уровня NO. Однако, при нанесении на кожу животного эквивалентного количества ДНКЖ-Глт достоверного увеличения уровня NO в органах, относительно контроля, не наблюдалось. Следовательно, ДНКЖ-Ацц способен проникать через кожный покров в организм животного, в то время как проникновение ДНКЖ-Глт в аналогичных экспериментальных условиях не выявлено.

Таким образом, показано, что в результате нанесения на участок кожного покрова крыс препарата ДНКЖ с лигандом на основе N-ацетил-L-цистеина инициируется чрезкожная транслокация этих стабилизированных форм NO в организм, в результате чего регистрируется существенное увеличение общего уровня NO в ткани лёгких и печени животного.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ, гранты №№ 18-015-00027 и 19-015-00444.

Библиографические ссылки

1. Timoshin A.A., Lakomkin V.L., Abramov A.A., et al. The hypotensive effect of the nitric monoxide donor Oxacom at different routs of its administration to experimental animals // Eur. J. Pharmacol. 2015. Vol. 765. P. 525-532.

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ДОНОРОВ NO И БЛОКАТОРОВ ЕГО СИНТЕЗА

Титов В.Ю.^{1,2,3}, Осипов А.Н.¹, Олешкевич А.А.²

¹ *Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

² *Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии-МВА имени К. И. Скрябина, Москва, Россия*

³ *ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства РАН, Сергиев Посад, Московская область, Россия*

Для изучения эффективности применения любого фармакологического средства необходим контроль его исходного содержания и метаболизма в тканях организма. В противном случае мы не можем предположить механизм наблюдаемых физиологических эффектов. В случае оксида азота такой контроль до сих пор был методически проблематичен, поскольку не все метаболиты NO могут быть обнаружены современными методами. Разработанный нами ферментный сенсор основан на способности всех нитрозосоединений обратимо ингибировать каталазу и утрачивать эту способность под действием ряда веществ, различных для каждой группы соединений [1]. Благодаря его использованию были установлены следующие факты и закономерности:

Различные нитрозильные комплексы железа в большинстве тканей представляют основной пул нитрозосоединений. Но подавляющее их большинство не имеет характерного для моноядерного динитрозольного комплекса железа (ДНКЖ) ЭПР-сигнала. Утрата такого сигнала не является признаком разрушения комплекса, поскольку последние сохраняют способность ингибировать каталазу и терять это свойство в системе ловушка NO - хелатор железа, что характерно для железо – нитрозильных комплексов [2]. Использование блокатора NO – синтазы N-нитроаргинина приводит к снижению их содержания. Но, если в эмбрионах ряда птиц эти соединения накапливаются, создавая депонированный пул NO, то в крови взрослых особей имеет место динамическое равновесие между синтезом NO, его окислением до нитрата. В связи с этим использование препаратов – доноров NO для регуляции сосудистого тонуса логически оправдано, но использование их в эмбрионах птиц, где происходит их накопление, добавление доноров NO не будет иметь физиологического эффекта. Аналогично и использование блокаторов NO-синтазы [3].

Нами также установлено, что спонтанное высвобождение NO из соединений – доноров, практически, отсутствует. Окисление NO в тканях до нитрата определяется их особенностями. А эффективность применения соединений - доноров NO полностью зависит от наличия и состояния физиологической мишени NO, поскольку именно она определяет интенсивность его перехода на ткани. Тиоловые лиганды ДНКЖ, предположительно, служат для регуляции физиологической эффективности комплекса при непосредственном взаимодействии с мишенью [3].

Библиографические ссылки

1. Титов В.Ю., Петренко Ю.М., Ванин А.Ф. и др. Определение нитрита и нитрозосоединений в биосистемах калориметрическим методом // Биофизика. 2010. т.55. С.95-106.
2. Titov V. Yu., Osipov A. N., Ibragimova L. G. et al. Modification of Biochemical Properties of Nitrosothiol by Fe^{3+} Cation // Bull. of Exp. Biol. and Med. 2019. Vol. 168. P. 41-44.
3. Titov V. Yu., Dolgorukova A. M., Vertprakhov V.G. et al. Synthesis and Metabolism of Nitric Oxide (NO) in Chicken Embryos and in the Blood of Adult Chicken// Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2020. Vol.168, N3. P. 321-325.

МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ АДДУКТОВ ПОЛИМЕТИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С БЕЛКАМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Хлудеев И.И.¹, Самцов М.П.², Тарасов Д.С.², Белько Н.В.²

¹Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники

²НИИ ПФП им. А.Н. Севченко Белорусского государственного университета

Фотосенсибилизаторы (ФС), обладающие спектрами поглощения и флуоресценции в ближней инфракрасной области могут использоваться как для лечения солидных опухолей методом фотодинамической терапии, так и для визуализации паталогических тканей при оперативном вмешательстве. К числу таких ФС относятся полиметиновые (индотрикарбоцианиновые) красители (ПК) имеющие интенсивные полосы поглощения (720-750 нм) в так называемой «полосе прозрачности тканей». Важным фактором, влияющим на характеристики накопления ФС в опухолевых клетках, является механизм транспорта этих соединений при внутривенном введении. Для большинства ныне используемых ФС показано, что они перемещаются в кровеносной системе в составе комплексов с основными транспортными белками – альбумином и липопротеинами. В данной работе исследованы механизмы связывания с белками сыворотки крови индотрикарбоцианиновых красителей с ортофениленовым мостиком в цепи сопряжения – ПК154 и ПК 220, а также с незамещенной цепью – ПК222. Отличительной особенностью ПК220 и ПК222 является наличие в структуре молекул заместителей, повышающих их водорастворимость и биосовместимость - двух молекул полиэтиленгликоля с молекулярной массой 300 Да, а краситель ПК154 представляет собой соединение с двумя карбоксильными группами [1].

Анализ связывания ПК с компонентами сыворотки крови показал, что основная масса ПК154 и ПК220 находится в составе комплексов с САЧ и ЛНП, тогда как ПК222 остается в свободном состоянии в водной фазе сыворотки крови. Разница в положении максимумов поглощения ПК во фракции ЛНП и САЧ составляла от 12 нм для ПК154 до 20 нм для ПК220, которая свидетельствует о том, что молекулы ПК в составе комплексов с ЛНП находятся в менее полярном микроокружении в сравнении с комплексами с САЧ. Возможно, молекулы ПК могут погружаться в липидный слой липопротеиновой частицы, в то время как связывание с молекулами САЧ происходит на сайтах с различным сродством к молекулам ПК. Скорее всего, глубина встраивания молекул ПК154 больше, чем для молекул ПК220, у которых цепочки полиэтиленгликоля ограничивают глубину их погружения в липидную оболочку ЛНП. При экстракции ПК из состава комплексов с белками сыворотки крови показано, что для ПК154 процесс распределения в двухфазной системе бутанол-сыворотка приводил к переходу более 50% красителя в органический растворитель, в то время как почти весь ПК220 оставался в водной фазе. Данный факт не связан с различиями в водорастворимости ПК, поскольку при смешивании растворов красителей в воде или фосфатном буфере с бутанолом около 97% как ПК154, так и ПК220 переходили в органический растворитель. Можно предположить, что в процессе образования комплексов ПК220 с белками сыворотки происходит ковалентное связывания красителя с альбумином. Наиболее вероятный путь – это взаимодействие с единственным свободным остатком Cys34 в молекуле САЧ с замещением мезо-Cl в молекуле ПК220. Образование ковалентных аддуктов САЧ-ПК220 блокирует процесс перераспределения этого красителя с белков в органическую фазу.

Библиографические ссылки

1. Lugovski A. et al. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics // J. Photochem. Photobiol. A. 2016. Vol. 316. P. 31-36.

CA²⁺-ОТВЕТ И ПРОВОДИМОСТЬ ИОННЫХ КАНАЛОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ

**Шамова Е.В.¹, Кохан А.Ю.¹, Григорьева Д.В.¹, Балабин Ф.А.², Соколов А.В.^{3,4},
Свешникова А.Н.², Горудко И.В.¹**

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН и в ФГБУ
«НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва, Россия

³ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁴ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Взаимодействие компонентов иммунной системы и системы гемостаза происходит на множестве уровней. Одним из механизмов такого взаимодействия является регуляция функциональной активности тромбоцитов белками гранулярного аппарата нейтрофилов. Ранее было показано, что миелопероксидаза (МПО) – фермент азурофильных гранул нейтрофилов – оказывает праймирующее действие на АДФ-индуцированную агрегацию и депо-зависимый вход Ca²⁺ в тромбоцитах. МПО, катализирующая реакции образования активных форм галогенов (АФГ) и кислорода (АФК), становится мишенью для АФК и АФГ будучи в очаге воспаления, что в случае острой фазы воспаления приводит к появлению в крови различных модификаций МПО (МПО-НОСI, мономерная МПО (геми-МПО) и др.). В связи с этим, в настоящей работе проведен сравнительный анализ влияния различных форм МПО (нативная димерная МПО, МПО-НОСI и геми-МПО) на способность связываться с плазматической мембраной тромбоцитов и влиять на функциональный отклик данных клеток.

Изменение концентрации внутриклеточного Ca²⁺ изучали с помощью флуоресцентного зонда CalBryte 590 методом TIRF-микроскопии. Электрофизиологические характеристики тромбоцитов детектировали методом пэтч-клэмп в конфигурации «cell-attach».

Установлено, что способность геми-МПО связываться с мембраной тромбоцитов была достоверно ниже по сравнению с нативным белком, а НОСI-модифицированная МПО в соотношении 1:100 (моль:моль) была практически не способна связываться с мембраной тромбоцитов. С помощью TIRF-микроскопии в присутствии димерной МПО и геми-МПО обнаружено увеличение частоты осцилляций свободных ионов внутриклеточного Ca²⁺ в тромбоцитах, адгезированных на VM64 (anti-CD31). Данный эффект сопровождался гиперполяризацией плазматической мембраны клеток вследствие открытия Ca²⁺-зависимых калиевых и Ca²⁺-зависимых хлорных ионных каналов плазматической мембраны. При этом влияние геми-МПО на Ca²⁺-сигнализацию и изменение проводимости ионных каналов было достоверно ниже, по сравнению с эффектами димерной МПО (в 1,5 - 2 раза). НОСI-МПО не влияла на исследуемые отклики клеток, что согласуется с результатами о низком сродстве данной формы МПО к мембранным структурам тромбоцитов. Поскольку Ca²⁺-зависимый ионный гомеостаз играют важную роль в процессах образования субпопуляций тромбоцитов, дальнейшие исследования, направленные на выяснение механизмов сигнализации различных субпопуляций тромбоцитов при действии МПО, будут важны для понимания патофизиологии гемостаза и разработки новых способов фармакологической регуляции.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что нейтрофилы способны регулировать процессы тромбоцитарного звена гемостаза не только за счет высвобождения гранулярных белков во внутриклеточное пространство, но и за счет модификации их физико-химических свойств АФГ и АФК.

Работа поддержана грантами БРФФИ №Б20Р-215 и МД-1901.2020.4.

МЕТАБОЛИТЫ ОКСИДА АЗОТА КАК ТРИГГЕРЫ МОДИФИКАЦИИ БИОМОЛЕКУЛ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ И КАРБОНИЛЬНОМ СТРЕССЕ

**Шумаев К.Б.^{1,2}, Космачевская О.В.¹, Насыбулина Э.И.¹, Топунов А.Ф.¹, Ванин А.Ф.³,
Дудылина А.Л.², Рууге Э.К.²**

¹ *Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Москва, Россия*

² *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*

³ *Институт химической физики имени Н.Н. Семёнова Российской академии наук, Москва,
Россия*

Хорошо известно, что оксид азота (NO) является важнейшим регулятором огромного числа физиологических и патофизиологических процессов в организме человека и других живых существ. Биологическая активность NO во многом связана с образованием его разнообразных метаболитов. К таким метаболитам следует отнести S-нитрозотиолы, нитрозильные комплексы гемового и негемового железа, нитроксил, высшие окислы азота, пероксинитрит и нитролипиды. Все эти производные NO могут вызывать модификацию ключевых биомолекул, в том числе нитрозилирование, нитрование, окислительную деструкцию и образование динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) связанных с аминокислотами, пептидами и белками [1-2]. Нитролипиды сами являются продуктами модификации ненасыщенных жирных кислот под действием NO, диоксида азота, и пероксинитрита.

Известно, что NO нитрозилирует железо гемовой группы в гемоглобине [1]. Кроме того, с участием SH-группы Cys93 β -субъединицы образуются связанные с гемоглобином ДНКЖ и S-нитрозотиолы [2]. Также обнаружено, что ДНКЖ с тиольными лигандами $[(RS)_2-Fe^{2+}-(NO)_2]$ обладают антиоксидантным и цитопротекторным действием [2]. В то же время, нами показано, что ДНКЖ с глутатионовыми или фосфатными лигандами влияют на окислительную модификацию гемоглобина вызванную гидропероксидом трет-бутила и пероксинитритом.

В условиях, моделирующих карбонильный стресс, различные S-нитрозотиолы $[RS-NO]$, но не ДНКЖ, стимулируют продукцию органических свободных радикалов при взаимодействии аминокислот и активного дикарбонильного соединения метилглиоксаля. Реакция этого дикарбонила с аминокислотными остатками приводит к модификации белков и образованию новых сайтов связывания ДНКЖ. С другой стороны, S-нитрозоцистеин вызывает образование ДНКЖ в митохондриях изолированных из сердца крыс, что указывает на возможную модификацию железосодержащих белков этих органелл. Нитрозилирование гемового и негемового железа происходит также в *E. coli* при инкубации бактерий с S-нитрозоглутатионом. При этом уровень нитрозилирования положительно коррелирует с устойчивостью бактерий к окислительному стрессу индуцированному гидропероксидом трет-бутила.

Полученные результаты позволяют предположить, что метаболиты NO играют роль триггеров при модификации белков в условиях окислительного и карбонильного стресса, а также связанных с ними патологий. Работа поддержана грантами РФФИ № 18-015-00125 и 19-015-00444.

Библиографические ссылки

1. Kosmachevskaya O.V. et al.. Formation of nitri- and nitrosylhemoglobin in systems modeling the Maillard reaction // Clin. Chem. Lab. Med. 2014. Vol. 52. P. 161-168.
2. Shumaev K.B. et al. Chapter Twenty-Five - Dinitrosyl Iron Complexes Bind with Hemoglobin as Markers of Oxidative Stress // Meth Enzymol. 2008. Vol. 436. P. 445-461.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ ПРОДУКЦИИ МИНЕРАЛО- И ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ ЭНДОКРИННЫМ ДИСРАПТОРОМ ДДТ

Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Нарушения стероидогенеза в корковом веществе надпочечников при воздействии эндокринных дисрапторов на развивающийся организм является актуальной медико-социальной проблемой, значимость которой обусловлена глобальностью и перманентностью воздействия эндокринных дисрапторов на организм в последние десятилетия. В наших предыдущих исследованиях мы показали, что воздействие наиболее распространенного эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) вызывает различные по длительности нарушения секреции альдостерона и кортикостерона. Цель работы – изучение ультраструктурных механизмов нарушения продукции минерало- и глюкокортикоидов при воздействии эндокринного дисраптора на развивающийся организм в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза.

У крыс, развивавшихся в условиях воздействия низких доз ДДТ, в периоде полового созревания выявлены пониженный уровень продукции минералокортикоидов и повышенный уровень синтеза глюкокортикоидов. Морфологическое изучение надпочечников выявило меньшую степень развития клубочковой зоны. После достижения половой зрелости наметилась тенденция к нормализации уровня альдостерона. При этом размер клубочковой зоны значительно превышал значения контрольной группы. При исследовании ультраструктуры клеток был выявлен ряд отличий: в пубертатном периоде доля митохондрий с отёком матрикса была в шесть раз меньше, чем у крыс контрольной группы, что свидетельствует о меньшей интенсивности синтетических процессов в митохондриях, к наступлению половой зрелости у этих животных не наблюдалось достоверного уменьшения диаметра митохондрий. Общее количество митохондрий в 1 мм² цитоплазмы была в полтора, а доля митохондрий с отёком матрикса в три раза ниже, чем в контрольной группе. То есть наблюдавшаяся тенденция к нормализации продукции альдостерона достигалась за счет гиперплазии клубочковой зоны.

В пубертатном периоде продукция глюкокортикоидов была повышена, несмотря на очаговые некрозы и нарушения микроциркуляции в наружной части пучковой зоны. Это достигалось за счет повышения функции клеток в более глубоких участках пучковой зоны, проявлявшихся увеличением диаметра, количества и процента митохондрий с отёком матрикса. Несмотря на то, что динамика возрастных изменений была такая же, как и в контрольной группе, значения этих показателей оставались на более высоком уровне. Это позволяло сохранять продукцию кортикостерона на уровне контрольных значений и после достижения половой зрелости.

Следовательно, ультраструктурными механизмами нарушения продукции минералокортикоидов надпочечниками крыс, развивавшихся при пренатальном и постнатальном воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, являются нарушения функционирования митохондрий и возрастной реорганизации митохондриального аппарата, происходящего при переходе от пубертатного периода к половой зрелости. Механизмы повышенной продукции глюкокортикоидов также связаны с компенсаторной гиперфункцией митохондрий кортикостероцитов.

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ У ЖИВОТНЫХ ТРАВМЫ АХИЛЛОВА СУХОЖИЛИЯ

Василевич И.Б.¹, Пинчук С.В.¹, Молчанова А.Ю.², Волотовский И.Д.¹

¹ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

²ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Интенсификация свободнорадикальных процессов является важным патогенетическим компонентом при заболеваниях и травмах, и сопровождается усилением воспалительных реакций и снижением репаративных процессов в организме. Целью работы явилось изучение содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-пр.) в крови, интенсивности аутофлуоресценции эритроцитов при 530 нм (возбуждение 488 нм), регистрируемой с использованием проточного цитофлуориметра, общей антиоксидантной активности плазмы крови животных (крысы) после моделирования у них механической травмы Ахиллова сухожилия (АС) и влияния на данные показатели клеточной терапии аллогенными мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) из жировой ткани. Проведенные исследования показали, что травмирование АС приводит к увеличению содержания в крови животных продуктов ПОЛ. Максимальное количество реагирующих с тиобарбитуровой кислотой продуктов регистрировалось через 14 суток после моделирования травмы, увеличиваясь от 0,114 мкмоль/л в контроле до 0,332 мкмоль/л. Через 28 суток содержание ТБК-пр. снижалось до 0,185 мкмоль/л. Установлено увеличение на 10% интенсивности аутофлуоресценции эритроцитов крови через 7 суток после травмирования животных. Далее интенсивность аутофлуоресценции снижалась, достигая через 21 сутки 85% от значений эритроцитов интактных животных. Известно, что интенсивность аутофлуоресценции эритроцитов возрастает при интенсификации окислительных повреждений белков и липидов в данных клетках и значительно выше в популяции «старых» эритроцитов по сравнению с «молодыми» [1]. Это свидетельствует об интенсификации окислительных процессов в крови травмированных животных, приводящих к окислительным повреждениям эритроцитов и элиминации из крови «старой» популяции как менее устойчивой к повреждающим воздействиям. Измерение общей антиоксидантной активности плазмы крови показало ее увеличение от 1,27 (в эквиваленте концентрации тролокса) в контроле до 1,69 мМ через 7 суток с последующим снижением до 1,55 мМ через 28 суток. Этот эффект, вероятно, является ответной реакцией организма животных на рост окислительных повреждений, индуцированных моделированием травмы АС. Клеточную терапию экспериментальных животных проводили в виде локальной инъекцией МСК в область повреждения. Установлено, что введение МСК снижает окислительные повреждения в крови моделированных животных. Эффект проявляется в снижении индуцированных травмированием АС накопления ТБК-активных продуктов ПОЛ в крови, изменений интенсивности аутофлуоресценции эритроцитов и общей антиоксидантной активности плазмы. Полученные результаты свидетельствуют, что снижение окислительных повреждений при протекании патологического процесса в организме может являться одним из механизмов терапевтического действия МСК.

Библиографические ссылки

1. Khandelwal S., Saxena R. K. Age-dependent increase in green autofluorescence of blood erythrocytes // J. Biosci. 2007. Vol.32. P. 1139–1145.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИНОЦИЦЕПТИВНОГО И РЕГЕНЕРАТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ТРАВМЫ АХИЛЛОВА СУХОЖИЛИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**Ерофеева А.-М.В.¹, Жаворонок И.П.¹, Антипова О.А.¹, Рыжковская Е.Л.¹,
Кузнецова Т.Е.¹, Василевич И.Б.², Пинчук С.В.², Волотовский И.Д.²,
Молчанова А.Ю.¹**

¹*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Травмы Ахиллова сухожилия (АС) относительно широко распространены и часто приводят к снижению качества жизни на долгие годы после повреждения [1]. Текущие терапевтические возможности для лечения повреждений сухожилий часто оказываются неэффективными и не устраняют такие последствия травмы, как хроническая теналгия и ухудшение биомеханических свойств сухожилия. Использование мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) в терапии травм сухожилий представляется перспективным, поскольку данная популяция клеток в провоспалительном микроокружении проявляет иммуномодулирующие, антиноцицептивные и регенеративные свойства. Однако ввиду малого объема проведенных по данной тематике исследований нет возможности определить наиболее оптимальную дозу МСК ЖТ для последующей разработки протоколов клеточной терапии травм сухожилий. На основании этого, целью данной работы являлось изучение влияния аллогенной трансплантации различных доз МСК ЖТ на ноцицептивные реакции, величину окружности конечности и репаративные процессы в ткани травмированного АС у крыс.

Модель травмы АС у крыс-самцов стока Wistar формировали путем его зажимания без перерезки. Аллогенную трансплантацию МСК ЖТ в область травмы выполняли по 4 разным схемам. Соответствующим группам животным осуществляли локальное введение $0,25 \times 10^6$ и $0,50 \times 10^6$ МСК ЖТ. Однократное введение данных доз выполняли на 1-е сутки после операции, двукратное введение – на 1 и 3-и сутки. В течение 28 суток ежедневно измеряли величину окружности травмированной лапы. До травмы, а также на 7, 14, 21 и 28-е сутки исследования определяли ноцицептивную чувствительность на механический стимул в тесте Рэндалла-Селитто, а также производили забор ткани АС для гистологического исследования. В результате проведенных исследований было установлено, что вызванная травмой механическая гипералгезия устранялась только после двукратного введения $0,25 \times 10^6$ МСК ЖТ, и данный эффект наблюдался на протяжении всего эксперимента. В то же время, тестируемые режимы МСК ЖТ не способствовали уменьшению окружности травмированной конечности. Двукратная трансплантация $0,25 \times 10^6$ МСК ЖТ стимулировала реорганизацию коллагеновых волокон и ослабление воспалительной реакции, в то время как введение $0,50 \times 10^6$ МСК ЖТ приводило к липоматозу, усилению воспалительных явлений и массивному разрастанию грануляционной ткани в месте травмы АС.

Таким образом, среди исследуемых доз, двукратная трансплантация $0,25 \times 10^6$ МСК ЖТ является наиболее оптимальной схемой введения и может быть использована для разработки протокола клеточной терапии пациентов с травмами сухожилий. Полученные результаты указывают на то, что доза и кратность локальной трансплантации МСК ЖТ лимитирует их терапевтическое действие в месте повреждения ткани, и требуются дальнейшие исследования.

Библиографические ссылки

1. Knapik J.J., Pope R. Achilles Tendinopathy: Pathophysiology, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, Prevention, and Screening // J. Spec. Oper. Med. 2020. Vol. 20. P.125–140.

РЕГЕНЕРАЦИЯ РОГОВИЦЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

**Марченко Л.Н.¹, Чекина А.Ю.¹, Федулов А.С.¹, Джумова М.Ф.¹,
Квачева З.Б.², Василевич И.Б.², Вологовский И.Д.²**

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Актуальной проблемой в офтальмологии является лечение заболеваний роговицы глаза, для чего требуется выполнение реконструктивных вмешательств с использованием донорских тканей. Высокая частота отторжения трансплантатов побуждает к поиску альтернативных методов лечения. В последние годы большой интерес вызывают специализированные стволовые клетки, локализованные в ткани лимба и мезенхимальные стволовые клетки, находящиеся в окружающих глаз тканях. Клеточная терапия заболеваний в офтальмологии – это быстро развивающаяся область биомедицины, целью которой является разработка методов лечения заболеваний с использованием биомедицинских клеточных продуктов (БМКП).

Цель данной работы - проведение клинических испытаний эффективности БМКП на основе аутологичных культивированных эпителиальных лимбальных стволовых клеток (ЛСК) и мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) при заболеваниях роговицы.

Из биопсийного материала ткани лимба (2-4 мм) и орбитальной или подкожной жировой клетчатки 24 пациентов с диагнозом воспалительно-дистрофических заболеваний роговицы, язвенных кератитов приготовлены монослойные культуры ЛСК и МСК ЖТ [1, 2]. Нарботана биомасса клеток в течение 1-2 пассажей. Дана оценка клеток, характеризующая их жизнеспособность (не менее 95%) и фенотипическую принадлежность к ЛСК или МСК. Приготовленные аутологичные БМКП представляли собой взвесь клеток в носителе (0,2 % гиалуронат натрия) или без носителя, в виде одной взвеси клеток в физиологическом растворе. Пациенту осуществлялось перилимбальное введение БМКП в объеме 0,4 мл физиологического раствора или носителя (500 тыс. ЛСК или 500 тыс. МСК ЖТ). Эффективность лечения оценивалась по остроте зрения, биомикроскопии роговицы, толщине роговицы по данным оптической когерентной томографии (ОКТ). При первичных эпителиально-стромальных дистрофиях роговицы проводилась клеточная перилимбальная терапия 1 раз в 3 месяца; при язвенных кератитах – 1 раз в 3 недели с использованием ЛСК или МСК ЖТ пациента. При дефиците стволовых клеток (лимбальной недостаточности, конъюнктивизации глазной поверхности) пациенту осуществлялась кератопластика и клеточная терапия проводилась в до- и послеоперационном периоде с использованием МСК ЖТ.

Установлено, что аутологичные БМКП способствовали эпителизации дефектов роговицы на 25-30 мкм по данным ОКТ, приводили к повышению остроты зрения и подавлению развития роговичного синдрома.

Обсуждаются перспективы использования БМКП в лечении офтальмологических заболеваний.

Библиографические ссылки

1. Квачева З.Б., Василевич И.Б., Чекина А.Ю., и др. Сравнительный анализ методов получения культур стволовых клеток эпителия роговицы человека // Гены & клетки. 2019. Т. XIV, № 4. С. 29–35.
2. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., et al. Multilineage Cells From Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies // Tissue Eng. 2001. Vol. 7. P. 211–228.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В БИОГЕЛЕ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА

Матиевский К.А.¹, Станиславчик К.М.², Пинчук С.В.¹, Волотовский И.Д.¹

¹ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

²УО «Белорусский государственный университет», Минск, Беларусь

В условиях культуры МСК ЖТ способны делиться с сохранением высокой пролиферативной активности и способны к дифференцировке в разные типы клеток. Это позволяет использовать их в регенеративной медицине в качестве основы для создания трансплантатов при терапии широкого круга патологий. В последнее время интенсифицировались исследования по созданию клеточных препаратов в виде тканеинженерных конструкций (ТИК), включающих кроме стволовых клеток носители, выполняющие роль матрицы для фиксации клеток. Особый интерес проблематика разработки ТИК приобретает в связи бурным развитием технологий 3D-биопечати, позволяющих получать тканевые эквиваленты с заданными геометрическими и физическими параметрами. Предполагается, что такие технологии имеют ряд преимуществ по сравнению с введением в организм суспензии исходных или дифференцированных в заданном направлении клеток. Так, введенные в составе тканеинженерной конструкции стволовые клетки значительно менее подвержены миграции из места приложения, обеспечивая этим усиление терапевтического действия вследствие пролонгированного влияния на прилегающие ткани.

Целью исследования стало изучение морфофункционального состояния МСК при их взаимодействии с альгинатом натрия, используемого в качестве основного компонента биогелей для биопечати [1], определение оптимальных условий биопринтинга и полимеризации альгинатных гидрогелей, обеспечивающих функциональную активность клеток и стерильность продукта.

В ходе проведения исследований выявлено, что МСК сохраняют высокую жизнеспособность при культивировании в альгинатных гелях концентрацией 1, 2 и 4% на протяжении пяти суток культивирования. Клетки распределены по объёму матрицы равномерно, не мигрируя по ней в течение длительного культивирования, характеризуясь низким (3-5%) содержанием клеток в состоянии некроза.

При обработке альгинатных гелей, содержащих МСК, катионами кальция происходит контролируемая полимеризация поверхности конструкции, что позволяет сохранить ее геометрические параметры, не теряя в показателе жизнеспособности клеток.

Печать ТИК производили путём послойного нанесения смеси альгината и МСК с использованием 3D-биопринтера INKREDIBLE+ (CELLINK, США), позволяющего создавать в асептических условиях конструкции различной сложности с необходимыми оператору физическими и геометрическими параметрами.

Определение жизнеспособности МСК после инкубации в альгинате натрия производили путём флуоресцентной микроскопии с использованием микроскопа OLIMPUS IX71 и красителей флуоресцеин диацетат и пропидиум иодид.

Пластичность альгинатных биогелей позволяет использовать их в качестве носителей для получения ТИК с помощью 3D-биопринтера в стерильных условиях. [2]

Библиографические ссылки

1. Li H, Liu S, Li L Rheological study on 3D printability of alginate hydrogel and effect of graphene oxide // International Journal of Bioprinting. 2016. Vol. 2. P. 54–66.
2. Fatiha Belalia, Nacer-Eddine Djelali Rheological properties of sodium alginate solutions // Revue Roumaine de Chimie. 2014. Vol. 59. P. 135-145.

АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ECHINACEA*

Меджидова К.М., Дитченко Т.И.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Активные формы кислорода индуцируют в клетках свободнорадикальные окислительные реакции, мишенью которых выступают липиды клеточных мембран, нуклеиновые кислоты, протеины и др. Оксидативный стресс приводит к широкому спектру заболеваний, в частности онкологических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, может вызывать развитие сахарного диабета и болезни Альцгеймера [1]. В норме свободнорадикальное окисление в организме контролируется внутриклеточными ферментами, низкомолекулярными липофильными и водорастворимыми антиоксидантами. Фармакологическая поддержка собственных антиоксидантных систем организма может выступать важным фактором в профилактике указанных заболеваний. Среди природных антиоксидантов, сочетающих низкую токсичность со способностью эффективно ингибировать процессы свободнорадикального окисления, ведущую роль играют фенольные соединения. К лекарственным растениям, богатым фенолпропаноидами, относятся представители рода *Echinacea*. Целью настоящей работы явился анализ антирадикальной активности (АРА) водно-спиртовых экстрактов из культивируемых *in vitro* клеток эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L. Moench) и эхинацеи бледной (*Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt.).

Суспензионные культуры инкубировали на питательной среде по прописи Мурасиге и Скуга, включающей 30 г/л сахарозы, 0,2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 0,5 мг/л кинетина и 1 мг/л β -индолил-3-уксусной кислоты, при 25 °С в темноте. Постоянное перемешивание инкубационной среды обеспечивалось с помощью орбитального шейкера со скоростью 120 об/мин. Для определения АРА водно-спиртовых экстрактов использовали метод, основанный на ингибировании стабильного хромоген-радикала 2,3-дифенилпикрилгидразила (ДФПГ) [2].

Экстракты из клеток суспензионной культуры *E. purpurea* характеризовались гораздо более выраженными антирадикальными свойствами по сравнению с экстрактами, полученными из культуры клеток *E. pallida*. В случае суспензионной культуры *E. purpurea* максимальная величина АРА отмечалась в стационарную фазу ростового цикла, тогда как для *E. pallida* – в фазу логарифмического роста. В указанных условиях величины ЕС₅₀ (концентрация экстракта, вызывающая 50%-ное ингибирование радикалов ДФПГ) составили 0,083 и 0,124%, соответственно. Количественная оценка содержания гидроксикоричных кислот (ГКК) и их производных, флавоноидов, а также суммы растворимых фенольных соединений позволила установить, что проявление антирадикальных свойств водно-спиртовых экстрактов из клеток суспензионных культур *E. purpurea* и *E. pallida* обусловлено присутствием в их составе таких простейших фенольных соединений как фенолпропаноиды. В частности, выявлена положительная корреляция между уровнями накопления ГКК и показателями АРА экстрактов на отдельных стадиях ростового цикла исследуемых суспензионных культур.

Библиографические ссылки

1. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2007. Vol. 39. P. 44–84.
2. Волков В.А., Дорофеева Н.А., Пахомов П.М. Кинетический метод анализа антирадикальной активности экстрактов растений // Химико-фармацевтический журнал. 2009. Т. 43. № 6. С. 27–31.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

Минич Я.С., Тимохина О.В., Антонец Н.Г., Филатова Е.А., Гончаров А.Е.

*Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии
Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь*

Введение. Дендритные клетки (ДК) – одни из основных антигенпрезентирующих клеток иммунной системы. На данный момент ДК широко используются в качестве биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) для лечения онкологических заболеваний. Также существуют перспективы создания БМКП на основе толерогенных (толДК) и аллогенных (аллДК) дендритных клеток. Эффективный метод криоконсервации позволит длительно хранить уже готовые БМКП, создать криобанки ДК, а также даст возможность уменьшить частоту взятия крови у пациентов.

Материалы и методы исследования. В работе использовали незрелые ДК, полученные из моноцитов доноров культивированием в среде с ГМ-КСФ и интерлейкином-4, а также толерогенные ДК, полученные культивированием незрелых ДК на монослое мезенхимальных стволовых клеток.

В составе протекторной среды для криоконсервации ДК были изучены различные соотношения бессывороточной питательной среды (AIM-V), криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) и человеческой сыворотки АВ0. Для определения оптимального соотношения данных веществ в каждом варианте раствора проверяли жизнеспособность ДК до криоконсервации и после разморозки при помощи интеркалирующего красителя 7-Аминоактиномицина D. Способность ДК к созреванию оценивали по количеству CD83+ зрелых ДК после культивирования незрелых восстановленных ДК в среде с ФНО-альфа.

Определяли оптимальный процесс поэтапной криоконсервации: оптимальное время подготовки к замораживанию (охлаждение суспензии клеток до +1 °С), замораживание (до –18 °С) и непосредственного хранения (до –80 °С).

Результаты. Установлено оптимальное соотношение компонентов протекторной среды для заморозки ДК: 40% бессывороточной среды AIM-V : 50% человеческой сыворотки АВ0 : 10% криопротектора ДМСО. Оптимизирован режим поэтапной криоконсервации ДК: подготовка к замораживанию (охлаждение от +20 °С до +1 °С в течении 1 часа), замораживание (от +1 °С до –18 °С в течении 2-х часов), завершающий этап – хранение (при температуре –80 °С) более 3х месяцев.

После восстановления криоконсервированных незрелых и толерогенных ДК, жизнеспособность клеток составляла более 95%, что свидетельствует о хорошей сохранности клеток. Восстановленные из криоконсервации незрелые ДК сохраняли способность к созреванию при добавлении индукторов, что подтверждается высокой экспрессией молекулы CD83 (более 50%).

Заключение. Разработана технология криоконсервации ДК, полученных из крови доноров. Восстановленные ДК сохраняли жизнеспособность и функциональные свойства.

ВЛИЯНИЕ СИСТЕМНОГО ВВЕДЕНИЯ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА КРЫС ПРИ ЧРЕЗМЕРНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗКАХ

**Молчанова А.Ю., Счастливая Н.И., Ерофеева А.-М.В., Морозова И.Л., Кузнецова Т.Е.,
Рыжковская Е.Л., Василевич И.Б., Пинчук С.В., Волотовский И.Д.**

*ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь*

Важным аспектом, способным отрицательно повлиять на результаты и карьеру спортсменов, является так называемый «синдром перетренированности» (overtraining syndrome, ПТС). Под перетренированностью понимают физическое, поведенческое и эмоциональное состояние, обусловленное тем, что объем и интенсивность тренировочной программы превышают восстановительные способности организма. Симптомы ПТС являются мультисистемными и обусловлены гормональными, иммунологическими, неврологическими и психологическими нарушениями в ответ на чрезмерные физические нагрузки. Длительность подобных состояний может затягиваться, даже не смотря на медикаментозное лечение, надолго выбивая спортсменов из соревновательного процесса, а иногда и заканчиваясь окончанием спортивной карьеры. В то же время, учитывая мультифакторный характер патогенеза ПТС, четкие протоколы его терапии до сих пор не разработаны, а поиск путей эффективного и более быстрого восстановления функционального состояния спортсменов все еще очень актуален. В этой связи целью исследования явилось изучение влияния системного введения мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСКЖТ) на восстановление функционального состояния организма при чрезмерном утомлении у крыс. Для формирования переутомления крыс подвергали множественным повторным плавательным нагрузкам с грузом 10% от массы тела [1]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что системное (внутривенное) введение МСКЖТ сопровождалось нормализацией уровня артериального давления, температуры тела, показателей общего и биохимического анализов крови, измененных вследствие чрезмерных нагрузок. Согласно данным гистологического исследования введение МСКЖТ также способствовало репаративным процессам в пострадавшей от чрезмерных плавательных нагрузок мышечной ткани. Улучшение функционального состояния организма лабораторных животных после трансплантации МСКЖТ также выразилось в более быстром полном восстановлении продолжительности их плавания с грузом. Наиболее эффективным режимом в данном исследовании оказалось двукратное введение МСКЖТ в дозе 1 миллион клеток на животное.

Библиографические ссылки

1. Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность. Методические рекомендации. Под редакцией Н.Н. Каркищенко. «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». 134 с.

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 2-АМИНО-4,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛФЕНОЛА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Нижегорода Д.Б.¹, Лобай М.В.¹, Сыса А.Г.¹, Ксендзова Г.А.², Шадыро О.И.²,
Зафранская М.М.¹

¹Международный государственный институт им. А. Д. Сахарова БГУ, Минск, Беларусь;

²Научно-исследовательский институт физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь

Производные 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенола проявляют противовирусные свойства и радикалрегуляторную активность в отношении различных типов органических радикалов [1], что обуславливает актуальность их дальнейшего изучения. До сих пор остается открытым вопрос об иммуномодулирующей активности производных аминифенольных соединений, в том числе определение способности инициировать продукцию интерферонов (ИФН) I и II типов и регулировать неспецифический и специфический Т-клеточный иммунный ответ.

В связи с этим целью исследования явилась оценка влияния производных 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенола на жизнеспособность, экспрессию основных фенотипических маркеров, цитокин-синтезирующую функцию и пролиферативный потенциал лимфоцитов периферической крови человека.

Материалы и методы. Мононуклеары периферической крови выделяли на градиенте плотности из цельной периферической венозной крови здоровых доноров (n=15) и культивировали в присутствии производных 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенола (N-(2-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамид (**1**), 2,4-ди-трет-бутил-6-морфолинофенол (**2**), 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил) уксусная кислота (**3**)) в концентрациях 10^{-4} – 10^{-7} М в течение 2-х, 3-х и 6-ти дней с последующим определением жизнеспособности (AnnexinV-FITC/7AAD kit), фенотипа ($\alpha\beta$ TCR-PE, $\gamma\delta$ TCR-FITC, CD3-PC7, CD8-PC5, CD56-PC7), пролиферативного потенциала (CFSE-метод) и внутриклеточной продукции γ -ИФН (IFN-PE) методом проточной цитометрии.

Результаты. Исследуемые соединения в концентрациях 10^{-5} – 10^{-7} М не оказывали цитотоксического действия и не влияли на экспрессию основных фенотипических маркеров лимфоидных клеток, в то время как в концентрации 10^{-4} М проявляли цитотоксический эффект за счет индукции вторичного некроза. Соединение **1** в концентрации 10^{-6} М и соединение **2** в концентрациях 10^{-5} М– 10^{-6} М стимулировали внутриклеточную продукцию γ -ИФН CD3⁺Т-лимфоцитами (с 14,3 (12,5÷16,1) % до 25,9 (17,0 ÷34,8)% и 23,0 (13,3÷32,7)%, соответственно, $p<0,05$), главным образом, за счет субпопуляции цитотоксических CD8⁺Т-лимфоцитов (с 18,0 (17,6÷18,4) % до 33,1 (26,8 ÷39,3)% и 29,1 (21,3÷36,9)%, соответственно, $p<0,05$). Выявлен иммуносупрессивный эффект (более 50%) соединений **1** и **3** в концентрации 10^{-5} М на митоген-индуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов.

Заключение. Наиболее выраженный иммуномодулирующий эффект с сохранением жизнеспособности и фенотипического распределения клеток иммунной системы выявлен у аминифенольного соединения **1** в концентрации 10^{-6} М.

Библиографические ссылки

1. Shadyro O.I., Ksendzova G.A., Polozov G.I. Synthesis and study of anti-radical and antiviral properties of aminophenol derivatives// Bioorg Med Chem Lett. 2008. Vol. 18. P. 2420–2423.

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ЛЕЧЕНИИ НЕДЕРЖАНИЯ МОЧИ У ЖЕНЩИН

**Пинчук С.В.¹, Молчанова А.Ю.², Нечипоренко А.Н.³, Нечипоренко Н.А.³,
Василевич И.Б.¹, Жаворонок И.П.², Новаковская С.А.², Волоотовский И.Д.¹**

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Симптомы недержания мочи (НМ) при увеличении внутрибрюшного давления проявляются более чем у 30% женщин. Данная патология обусловлена нарушением анатомической поддержки уретры, приводит к значительному снижению качества жизни пациенток и представляет собой серьезную медико-социальную проблему. Применяемые в настоящее время хирургические методы лечения этого заболевания основаны на применении синтетических имплантов (слингов), сопряжены с риском возникновения интра- и послеоперационных осложнений и появлением de novo симптомов дизурии и диспаурии. Целью исследований являлось изучение эффективности применения клеточного биокомпозита, состоящего из мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК) и биосовместимого носителя, для устранения симптомов инконтиненции у экспериментальных животных и пациенток с НМ после инъекции биокомпозита в парауретральную область. В качестве биосовместимого носителя использовали гидратированный гемостатический порошок Spongostan, после комплексирования с которым МСК длительно сохраняют жизнеспособность и активно пролиферируют [1]. В результате проведенных исследований установлено, что нарушение анатомической поддержки уретры у экспериментальных животных (самки крыс) посредством уретролизиса приводит к снижению давления в уретре, что, в свою очередь, проявляется в появлении внешних признаков инконтиненции при передвижении животных и снижении давления в мочевом пузыре при вытекании первой капли мочи. Введение экспериментальным животным в парауретральную область биокомпозита, повышает давление в уретре и необратимо устраняет внешние признаки инконтиненции, тогда как у экспериментальных животных без лечения симптомы инконтиненции сохраняются до 2 месяцев наблюдения. Гистологические исследования свидетельствуют о стимуляции клеточным биокомпозитом васкуляризации в околоуретральных тканях, регенерации мышечной оболочки стенки проксимального участка уретры, формирования соединительнотканной «манжетки», выполняющей удерживающую функцию. Введение носителя без клеток также оказывало положительное действие, однако эффект был кратковременным и исчезал после рассасывания биополимера (20 суток). В 2018-2019 гг. проведены клинические испытания аутологичных МСК в смеси с биосовместимым носителем у 10 пациенток с НМ. Установлено, что проведение клеточной терапии привело к восстановлению полного удержания мочи и улучшению качества жизни у девяти пациенток. У одной пациентки существенных изменений удержания мочи не наблюдалось. Эффект полного удержания развивается в течение 2-7 месяцев после проведения клеточной терапии и сохраняется в период наблюдения до 2 лет.

Библиографические ссылки

1. Пинчук С.В., Василевич И.Б., Волоотовский И.Д. // Тезисы докладов Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» и XIII съезда белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, 27-29 июня 2018г., Минск. – С.90.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ЛЕЧЕНИИ НЕДЕРЖАНИЯ МОЧИ У САМЦОВ КРЫС ПОСЛЕ ПРОСТАТЭКТОМИИ

Пинчук С.В.², Молчанова А.Ю.¹, Жаворонок И.П.¹, Василевич И.Б.²,
Новаковская С.А.¹, Волотовский И.Д.²

¹ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Одним из негативных последствий проведения операций на предстательной железе является появление у пациентов симптомов недержания мочи при напряжении (НМН). По данным эпидемиологических исследований наличие инконтиненции отмечают до 41% оперированных мужчин. Удаление предстательной железы приводит к снижению функционирования проксимального отдела сфинктерного аппарата уретры, а также может сопровождаться нарушением работы внутреннего сфинктера вследствие операционных повреждений нервов и сосудов. НМН значительно снижает качество жизни пациентов, является причиной развития депрессивных состояний, может приводить к потере трудоспособности. Золотым стандартом лечения НМН у мужчин признана установка искусственного мочевого сфинктера, позволяющая добиться стабильного удержания у 70-80% пациентов. Однако недостатком данного подхода является высокая стоимость импланта и значительный процент послеоперационных осложнений, что требует проведения ревизии устройства до 30% случаев. Целью работы было изучение эффективности применения клеточного биокомпозита, состоящего из мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК) и биосовместимого носителя в устранении симптомов инконтиненции у самцов крыс после удаления у них предстательной железы. В качестве биосовместимого носителя использовали гидратированный гемостатический порошок Spongostan. Биокомпозит вводили экспериментальным животным в парауретральную область на 7-е сутки после простатэктомии. В качестве информативного критерия функционирования сфинктерного аппарата животных использовали давление в мочевом пузыре при вытекании первой капли мочи. Проведенные исследования показали, что удаление предстательной железы у самцов крыс в 5,7 раза снижает давление в их мочевом пузыре при вытекании первой капли, указывая на значительное падение давления в уретре оперированных животных. В результате проведения операции начинают проявляться также внешние признаки инконтиненции при передвижении животных. В последующий период наблюдения (70 суток) давление в мочевом пузыре при вытекании первой капли незначительно возрастало (в 1,6 раза), при этом внешние признаки инконтиненции у экспериментальных животных сохранялись, что в совокупности свидетельствует о слабом восстановлении функционирования их сфинктерного аппарата. Введение биокомпозита позволило значительно улучшить показатели удержания мочи у оперированных самцов крыс: давление в мочевом пузыре при вытекании первой капли увеличивалось в 4,1 раза. Несмотря на то, что значение давления в мочевом пузыре после инъекции МСК не достигли таковых для интактных животных, проведение клеточной терапии привело к полному устранению проявления внешних признаков инконтиненции у экспериментальных животных. Введение носителя без клеток оказывало лишь кратковременный положительный эффект, обусловленный объемобразующим действием биополимера, которое исчезало после его деградации в организме. В целом полученные результаты свидетельствуют, что МСК жировой ткани в составе инъекционного биокомпозита с биосовместимым носителем значительно ускоряют восстановление функционирования сфинктерного аппарата уретры, работа которого была нарушена после операционного удаления предстательной железы.

ЗНАЧЕНИЕ КИСЛОРОДА ДЛЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МСК В УСЛОВИЯХ КУЛЬТУРЫ

Полешко А.Г., Волотовский И.Д.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Доказано, что культивирование МСК при низких концентрациях O_2 (физиологическая гипоксия) способствует реализации генетического потенциала клеток, стабилизации их биохимических реакций. Это приводит к повышению пролиферативной активности, жизнеспособности, сохранению мультипотентности МСК *in vitro*, а также снижению морфо-функциональной гетерогенности культуры клеток [1–3]. Также показано, что культивирование МСК при 5% O_2 повышает синтез ряда факторов роста, стимулируя паракринную и аутокринную активность клеток, среди них фактор bFGF, который является мощным индуктором пролиферации и высокой жизнеспособности МСК *in vitro*. В данной работе продемонстрирована роль некоторых молекулярно-эпигенетических механизмов, регулирующих адаптационные реакции МСК из жировой ткани человека при их культивировании при 5% содержании O_2 *in vitro*.

Целью работы явилось изучение влияния 5% O_2 и фактора bFGF на уровень метилирования ДНК промоторов генов *Hif1-α* и *Abcg2* в МСК человека в условиях культуры. Клетки получали из жировой ткани (с информированного согласия пациентов) и культивировали до 2 пассажа в стандартных условиях (5% CO_2 , 21% O_2 , 37°C) в питательной среде α-MEM с 10% фетальной бычьей сыворотки, на 3 пассаже МСК помещали в гипоксические условия (5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 , 37°C) и культивировали в питательной среде того же состава в течение 3 сут. Для исследования экспрессии генов белков HIF1-α и ABCG2 использовали ПЦР в реальном времени, для определения уровня метилирования ДНК – метод бисульфитного секвенирования.

Ранее нами было выявлено, что bFGF как при атмосферном содержании O_2 (21%) в среде роста клеток, так и на фоне физиологической гипоксии стимулирует пролиферацию, активирует синтетические процессы, снижает генерацию АФК в МСК, повышая их жизнеспособность [1–3]. В работе показано, что при 5% O_2 экспрессия генов кислород-зависимой α-субъединицы белка HIF1 и белка ABCG2 повышается [3], в том числе за счет снижения уровня метилирования ДНК их промоторных участков. При этом уровень метилирования регулируется и внесением в ростовую среду bFGF. Независимо от содержания O_2 в среде bFGF снижает уровень метилирования ДНК промоторов генов *Hif1-α*, *Abcg2*, что приводит к повышению их экспрессии. Полученные данные свидетельствуют о модуляторных эффектах фактора bFGF на развитие клеток в условиях нормоксии (21% O_2) и 5% гипоксии, а также роли метилирования ДНК в определении функциональной активности МСК в условиях культуры при физиологической гипоксии и в присутствии фактора bFGF.

Библиографические ссылки

1. Полешко А.Г., Лобанок Е.С., Волотовский И.Д. Влияние гипоксии на порфириновый метаболизм в МСК костного мозга // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2014. №. 1. С. 57-62.
2. Полешко А.Г., Волотовский И.Д. Роль активных форм кислорода и оксида азота в реализации механизмов адаптации мезенхимальных стромальных клеток костного мозга к гипоксии при культивировании с bFGF // Гены и клетки. 2015. Т. 10, № 2. С. 49–53.
3. Полешко А.Г., Волотовский И.Д. Роль белка ABCG2 в поддержании жизнеспособности и пролиферативной активности мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в условиях гипоксии // Биофизика. 2016. Т. 61, № 2. С. 321-327.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ И УНИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК К ЛЕНТИВИРУСНОЙ ТРАНСДУКЦИИ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ИПСК

Полешко А.Г., Волотовский И.Д.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

В настоящее время в рутинной лабораторной практике для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) используют различные протоколы, основанные как на интеграционных, так и неинтеграционных методах репрограммирования различных типов клеток. Несмотря на разнообразие подходов к процессу дедифференцировки, на данный момент максимальная эффективность репрограммирования, которой удалось добиться, составляет не более 1%. Чаще в протоколах дедифференцировки для получения ИПСК используют фибробласты и кератиноциты, что определяется их доступностью и положительным опытом репрограммирования. Установлено, что более дифференцированные клетки и клетки на поздних пассажах хуже поддаются репрограммированию. Показано, что обладающие высокой жизнеспособностью и пролиферативной активностью мезенхимальные стволовые клетки (МСК), также могут быть успешно использованы в качестве источника ИПСК [1]. В связи с этим актуальным является оценить чувствительность МСК к одному из наиболее эффективных способов доставки генетического материала в клетку при проведении дедифференцировки – лентивирусной трансдукции, которая обеспечивает стабильную и длительную экспрессию трансгена.

Цель данной работы – сравнить чувствительность МСК ЖТ и фибробластов кожи человека к заражению рекомбинантными лентивирусами, содержащими вектор лентивируса и кассету экспрессии гена белка GFP. Лентивирусный вектор с трансгеном *gfp* получали и титровали на клеточной линии НЕК293Т. Для этого клетки НЕК293Т котрансфецировали плазмидами, кодирующими структурные компоненты лентивирусов 3-го поколения: pRSV-Rev, pMDLg/pRRE, pHCMVC-VSV-G – и плазмидой с геном *gfp* в соотношении 19%:37%:7%:37%, соответственно, с использованием реагента Lipofectamine 3000 (Invitrogen) согласно рекомендациям производителя. Собранный вирусный супернатант центрифугировали и осветляли фильтрацией. Чувствительность МСК ЖТ и фибробластов к трансдукции полученными вирусными векторами оценивали методом проточной цитофлуориметрии (S3e, Bio-Rad) по количеству GFP-позитивных клеток после их заражения рекомбинантными лентивирусами в разведениях 1:200, 1:40, 1:20, 1:10, 1:4, 1:2, используемых и при титровании, в 3-х повторностях каждое. Для этого фибробласты и МСК ЖТ заранее рассаживали в количестве 6×10^4 клеток на 35 мм чашку Петри, за час до инфекции лентивирусами к клеткам добавляли 8 мкг/мл Polybrene (Sigma-Aldrich). Спустя 48 ч после инфекции считали среднее количество GFP-позитивных событий для каждого типа клеток и при каждом разведении.

В результате было показано, что между относительным количеством подвергшихся трансдукции МСК ЖТ и фибробластов кожи человека статистически значимых отличий не наблюдается. Таким образом, полученные предварительные данные свидетельствуют о том, что собранный лентивирусный рекомбинантный вектор на основе лентивирусов 3-го поколения с одинаковым титром в одинаковой степени тропен как к фибробластам кожи, так и к МСК ЖТ человека, что доказывает целесообразность использования МСК в протоколах получения ИПСК на основе лентивирусной трансдукции.

Библиографические ссылки

1. Oda Y., Yoshimura Y., Ohnishi H. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Human Third Molar Mesenchymal Stromal Cells // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285. P. 29270–29278.

ОЦЕНКА ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ПУЛИРОВАННЫХ КУЛЬТУР МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ

Рында Е.Г., Антоневиц Н.Г., Гончаров А.Е.

*Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии
Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь*

Введение. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) представляют значительный интерес для использования в качестве биомедицинского клеточного продукта (БМКП) благодаря их регенеративному потенциалу и иммуномодулирующей активности. Широко используемыми являются БМКП на основе аутологичных МСК пациента, однако, такое лечение может быть малоэффективным при некоторых заболеваниях вследствие аберрантного функционального состояния полученных клеток [1]. До сих пор является проблематичным быстрое производство достаточного количества клеточной биомассы для системного применения. Использование аллогенных культур МСК является многообещающим подходом для преодоления этих ограничений. Кроме того, объединение (пулирование) культур от разных доноров позволяет накопить клеточный материал и минимизировать изменения его биологических свойств [2]. Целью данного исследования была оценка пролиферативного потенциала культур МСК обонятельной выстилки (ОВ) для дальнейшего их пулирования и применения в качестве БМКП.

Материалы и методы исследования. Образцы ОВ были получены от 10 здоровых добровольцев. Первичные культуры МСК ОВ получали путем механической обработки тканевых фрагментов и культивировали на питательной среде DMEM / F12 + 10% FBS. На пассаже 3 (P3) МСК ОВ от 3 доноров были объединены в равной пропорции (1:1:1) и выращивались вместе до P4-P5. Перед пулированием каждая культура была окрашена красителями CellBrite. Индекс пролиферации (ИП) моно- и пулМСК ОВ рассчитывали в течение P3-P5, в смешанных культурах рассчитывали процент окрашенных клеток.

Результаты. Все 10 образцов МСК ОВ имели типичный фенотип CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD31⁻, CD45⁻, который сохранялся после пулирования. Было установлено, что 7 образцов имели более высокий показатель ИП (MSC^{hi}) по сравнению с 3 другими культурами (MSC^{lo}) ($p < 0.05$). Клетки были объединены в 2 группы в зависимости от установленного ИП: группа 1: 1^{hi}:1^{hi}:1^{hi} ($n = 2$) и группа 2: 1^{hi}:1^{lo}:1^{lo} ($n = 2$). Обе культуры пулМСК группы 1 не имели между собой различий ИП, но их ИП был выше, чем у пулМСК группы 2 ($p < 0.05$). В 1 группе равная пропорция клеток каждой культуры сохранялась на P5, в группе 2 наблюдали преобладание MSC^{hi} (1^{hi}: 0.5^{lo}: 0.4^{lo}). Пулированные культуры МСК ОВ с высоким ИП после прохождения контроля качества подвергали криоконсервации для длительного хранения (10×10^7 клеток / культура, P4).

Выводы. Был разработан метод пулирования МСК ОВ: отбор культур с высоким ИП, объединение моно-МСК в P3 с последующим накоплением биомассы пулМСК до P4 – P5. Смешивание МСК с разными ИП не привело к стимуляции общей пролиферативной активности клеток в сокультуре. Культуры клеток МСК ОВ, подвергшиеся криоконсервации, в дальнейшем могут быть использованы для проведения клеточной иммунотерапии.

Библиографические ссылки

1. Nie Y., Lau Cs., Lie A. et al. Defective phenotype of mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus // Lupus. 2010. Vol. 19. Issue 7, P. 850-859.
2. Widholz B. et al. Pooling of Patient-Derived Mesenchymal Stromal Cells Reduces Inter-Individual Confounder-Associated Variation without Negative Impact on Cell Viability, Proliferation and Osteogenic Differentiation // Cells. 2019. Vol. 8, №. 6. P. 633.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ *IN VITRO* РАЗМЕРА И ЗАРЯДА ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ВЕЗИКУЛ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДОСТАВКИ «ПУСТЫХ» ЛИПОСОМ В АЛЛОГЕННЫЕ ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ

Тимохина О.В., Гончаров А.Е., Антоневиц Н.Г., Минич Я.С., Бушмакина И.М., Мартынова М.А.

Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

Актуальность. Для модуляции иммунного ответа у онкопациентов применяют аллогенные дендритные клетки (аллДК), нагруженные опухоли-ассоциированными антигенами. Однако пока не решена задача эффективной доставки антигенов в ДК. Проводятся исследования по направленной доставке антигенов в составе особых клеточных компонентов – липосом, функциональность которых во многом определяется физико-химическими свойствами (заряд и размер везикул).

Цель: оценить влияние *in vitro* размера и заряда липосомальных везикул на эффективность доставки «пустых» липосом в аллДК.

Материалы и методы исследования. Липосомы получали из яичного фосфатидилхолина и холестерина. Суммарная концентрация всех липосомообразующих липидных компонентов составляла 50 мг/мл суспензии. Для предотвращения развития процессов пероксидного окисления липидов добавляли антиоксидант DL- α -токоферол. Формировали униламилярные (УЛЛ) и мультиламилярные (МЛЛ) липосомы положительно заряженные и нейтральные. УЛЛ формировали методом ультразвукового диспергирования (4-х кратная обработка), стерилизовали с помощью мембранной фильтрации (размер фильтра 220 нм). МЛЛ формировали методом вортэксирования, при этом более 70 % везикул имели размер от 0,25 до 1 мкм. В качестве минорного компонента, придающего липосомальной мембране положительный заряд, использовали цетилтриметиламмоний бромид. Для определения влияния размера и заряда липосом на эффективность доставки «пустых» липосом в аллДК проводили сокультивирование в течение 1 ч и 24 ч окрашенных красителем CellBright Green УЛЛ и МЛЛ с окрашенными CellBright Orange аллДК. Учет проб осуществляли на флуоресцентном микроскопе. Дополнительно осуществляли учет проб на проточном цитометре Attune NxT. АллДК, захватившие липосомы, определяли как CD45⁺CellBriteOrange⁺CellBrite Green⁺ клетки.

Результаты. Исследовано влияние *in vitro* размера и заряда липосомальных везикул на эффективность доставки «пустых» липосом в аллДК. Установлено, что УЛЛ захватываются аллДК достаточно быстро (более 90 % после 1 ч сокультивирования), причем эффективность поглощения липосом в дальнейшем (через 24 ч.) не претерпевает существенных изменений. В то же время обнаружено, что МЛЛ захватываются аллДК незначительно, как в течение 1 ч сокультивирования 58,5(54,0–63,0 %), так и после 24 ч 78,0(73,0–82,0 %). Также установлено, что наиболее эффективно в аллДК встраиваются положительно заряженные УЛЛ. Полученные данные подтверждены цитометрическим методом, при котором не отмечено захвата липосом лимфоцитами. Кроме того показано, что оптимальным является соотношение липосом (выраженное в концентрации суммарных липидных компонентов в мл суспензии) и аллДК – 1 мг/мл : 1 млн кл/мл аллДК.

Выводы. Установлено, что наиболее эффективно в аллДК встраиваются положительно заряженные УЛЛ – липосомы поглощают более 90 % популяции ДК. Кроме того показано, что оптимальным является соотношение липосом (выраженное в концентрации суммарных липидных компонентов в мл суспензии) и аллДК – 1 мг/мл : 1 млн/мл аллДК.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕНТИВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ С ЦЕЛЬЮ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Тишук О.И., Полешко А.Г., Волотовский И.Д.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Повышение эффективности репрограммирования соматических клеток для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) на сегодня является актуальной задачей клеточной биологии. В рутинной лабораторной практике для дедифференцировки клеток с целью изучения различных фундаментальных и прикладных аспектов чаще всего используют рекомбинантные лентивирусы, содержащие вставки с генами плюрипотентности *oct3/4*, *sox2*, *klf4* и *c-myc* [1]. В сравнении с другими вирусными векторами лентивирусы имеют ряд преимуществ, которые обеспечивают стабильную и длительную экспрессию переносимого ими гена. В связи с этим актуальным является оптимизировать протокол получения векторов на основе лентивирусной системы с целью улучшения эффективности репрограммирования соматических клеток.

Цель работы – подобрать протокол сборки лентивирусных векторов с высоким титром. Для сборки вирусных частиц использовали клеточную линию НЕК293Т, для определения титра полученного вирусного стока – первичную культуру фибробластов кожи человека. Целевым геном служил ген зеленого флуоресцентного белка GFP. Котрансфекцию клеток НЕК293Т проводили плазмидами, кодирующими структурные компоненты лентивирусов 3-го поколения и ген *gfp*, с использованием трансфекционного реагента Lipofectamine 3000 (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя с использованием различных соотношений плазмид по массе. Титр полученных вирусных векторов оценивали с использованием флуоресцентной микроскопии (Olympus CX-71) и проточной цитофлуориметрии (S3e, Bio-Rad) по количеству GFP-позитивных клеток после их заражения рекомбинантными лентивирусами в разведениях 1:200, 1:40, 1:20, 1:10, 1:4, 1:2, в 3-х повторностях каждое. Для этого фибробласты заранее рассаживали в количестве 6×10^4 клеток на 35 мм чашку Петри, за час до инфекции лентивирусами к клеткам добавляли 8 мкг/мл Polybrene (Sigma-Aldrich). Спустя 48 ч после инфекции считали GFP-позитивные клетки, строили кривую насыщения и выбирали фактор разведения (объем вирусного супернатанта), при котором заражается 10% клеток в популяции, когда наблюдается линейная зависимость между количеством зараженных клеток и числом внесенных вирусных частиц. По пропорции высчитывали количество вирусных частиц в 1 мл вирусного супернатанта, т.е. титр полученного лентивирусного вектора.

Установлено, что наиболее оптимальным процентным соотношением плазмид, кодирующих структурные компоненты лентивирусного вектора и переносимого гена является 63% и 37% от общего количества ДНК, соответственно. При этом плазмидный вектор оболочки лентивируса pHCMVC-VSV-G должен составлять 7%, а пакующие плазмидные векторы pRSV-Rev и pMDLg/pRRE – 19% и 37%, соответственно. Кроме того максимальный титр лентивирусных частиц наблюдался в собранном от клеток НЕК293Т супернатанте спустя 48 ч после их трансфекции, по сравнению с 24 ч и 72 ч. Подобранный протокол позволяет получить рекомбинантные лентивирусы с высоким титром – от 1×10^6 вирусных частиц в мл вирусного супернатанта, что является необходимым условием для эффективного репрограммирования соматических клеток, например, фибробластов кожи, для получения *in vitro* ИПСК.

Библиографические ссылки

1. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. Vol. 126, № 4. P. 663–676.

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ПЕЧЕНОЧНОГО СКАФФОЛДА В КУЛЬТУРАХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

**Юркевич М.Ю.¹, Дубко А.Д.¹, Лобай М.В.¹, Гулюта И.А.², Нижегородова Д.Б.¹,
Зафранская М.М.¹**

¹ УО «Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

² УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория», Минск, Беларусь

Современный этап разработок биоискусственной печени связывают с созданием тканеинженерных конструкций (скаффолдов), обладающих свойствами гепатоспецифической среды, определенной архитектоникой, достаточной механической прочностью и пористой структурой. Приоритетным направлением является использование метода децеллюляризации печени для получения каркаса с последующим заселением его клеточными культурами (мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК), гепатоцитами, эндотелиальными клетками и т.д.).

Целью работы явилась оценка потенциальной цитотоксичности децеллюляризованного печеночного матрикса путем культивирования аллогенных ММСК на сегментах скаффолда.

Методы исследования. Способ получения децеллюляризованного скаффолда включал последовательную перфузию печени лабораторных крыс (n=6) 0,1% раствором додецилсульфата натрия (SDS) через нижнюю полую вену, далее через воротную вену. Скорость перфузии соответствовала 20 мл/мин. Гистологические срезы скаффолда окрашивались гематоксилин-эозином и по Вейгерт – Ван Гизону. Культуры ММСК получали путем механической и ферментативной дезагрегации жировой ткани с последующим культивированием клеток в стандартных условиях в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин, 100 Ед/мл антибиотика-антимикотика («Gibco», Великобритания). ММСК второго пассажа в концентрации 5×10^4 клеток/лунку 24-луночного планшета вносили на сегменты скаффолда (5 мм х 5 мм). Жизнеспособность клеток оценивалась методом флуоресцентной микроскопии (окраска DAPI).

Результаты исследования. Полученный децеллюляризованный скаффолд печени при визуальном осмотре характеризовался прозрачностью, однородностью, сохранностью сосудистой сети. Пространственная архитектоника органа и структура внеклеточного матрикса полностью сохранялась, присутствовали единичные разрывы, не визуализировались гепатоциты и клеточный дебрис, отсутствовал внеклеточный тканевой отек. Содержание остаточной ДНК во всех долях децеллюляризованного скаффолда не превышало 0,1% (0,02% (0,01%÷0,05%)) от содержания ДНК в интактной печени.

При культивировании в стандартных условиях наблюдалась адгезия ММСК на сегменты скаффолда, при этом клетки сохраняли типичную веретеновидную морфологию и высокую пролиферативную активность. Через 48 часов культивирования на сегментах скаффолда жизнеспособность ММСК варьировала от 92% до 99% (95% (93%÷99%)) и не отличалась от аналогичного показателя для клеточных культур в отсутствии скаффолда (96% (92%÷99%)), $p > 0,05$.

Заключение. Децеллюляризованный скаффолд, полученный путем перфузии печени раствором анионного детергента (SDS), не обладал цитотоксичностью. При культивировании на сегментах скаффолда ММСК жировой ткани сохраняли способность к адгезии, высокую жизнеспособность (более 92%), морфологическую гомогенность и пролиферативный потенциал.

ФОТОСИНТЕЗ И ФОТОБИОЛОГИЯ

INDIVIDUAL SPECTRAL-LUMINESCENT PROPERTIES OF NH-TAUTOMERS OF THE ALKYLATED DERIVATIVES OF THE FREE BASE CORROLES

Ajeeb Y.H.^{1,2}, Petrova D.V.³, Klenitsky D.V.², Vershilovskaya I.V.², Semeikin A.S.³, Maes W.⁴, Gladkov L.L.⁵, Kruk M.M.²

¹ Art, Sciences & Technology University in Lebanon, Beirut, Lebanon

² Belarusian State Technological University, 220006, Minsk, Belarus

³ Ivanovo State University of Chemistry and Technology, Ivanovo, Russian Federation

⁴ Institute for Materials Research (IMO-IMOMEC), Hasselt University, Diepenbeek, Belgium

⁵ Belarusian State Academy of Communications, Minsk, Belarus

The molecular structure and spectral-luminescent properties of the 2,3,7,13,17,18-hexamethyl-8,12-di-n-buthylcorrole (H₃OAlkC) and 7,13-dimethyl-8,12-di-n-buthylcorrole (H₃TAlkC) were studied by luminescent and absorption spectroscopies in solutions in temperature range 288-328 K and quantum chemistry methods.

Absorption and fluorescence spectra of studied compounds were shown to be the superimposed spectra of two NH-tautomers. Individual spectra of tautomers were identified and the bands were assigned to the definite transitions. When comparing the results of analysis of the electronic absorption spectra of the C_b-substituted of the alkylated derivatives of the free base corroles with the interpretation of electronic absorption spectra of the C_m-aryl substituted derivatives [1], one can conclude on the differences in the electronic states ordering in these two cases. The second excited singlet S₂ state of the long wavelength tautomer T1 in both the H₃OAlkC and the H₃TAlkC lies lower than the S₂ state of the short wavelength tautomer T2, whereas in case of the C_m-aryl substituted derivatives the opposite pattern is observed: the S₂ state of the short wavelength tautomer T2 is lower than that of the long wavelength tautomer T1. It is likely that situation results from the different peripheral substitution architecture on these two cases. Two lowest occupied molecular orbitals are inverted: HOMO is «a_{2u}-like» when macrocycle has C_m-substitution and «a_{1u}-like» when it is substituted at C_b-positions. At the same time HOMO-1 is «a_{2u}-like» in case of C_b-substitution and «a_{1u}-like» in case of C_m-substitution.

The NH-tautomer equilibria in the ground S₀ and the lowest excited S₁ singlet states have been characterized. It was found that in the lowest excited singlet S₁ state of the H₃TAlkC the efficient NH-tautomerization takes place, whereas in the H₃OAlkC there was no shift in the equilibrium between two NH-tautomers. The observed difference is due to the different mutual positions of the lowest excited S₁ state in these two NH-tautomers. These energies have been calculated by addition of the transition energies, found from the experimental spectra, to the calculated ground state energies. As a result the S₁ states of two NH-tautomers of the H₃OAlkC have about the same energy, while the S₁ state of the T2 tautomer lies higher for 555 cm⁻¹ compared to that of the T1 tautomer.

Based on the set of the experimental and theoretical data we have concluded that the difference in the molecular conformation account for the described above spectral and functional differences. Thus, when the macrocycle is substituted at the C₂ and C₁₈ positions the macrocycle core size increases due to the steric interactions of the alkyl substituents. These interactions favor the planarization of macrocycle. On the contrary, the core size decreases when these positions are free. As a result the Δ₂₃ value, which is indicative for the magnitude of nonplanar macrocycle distortions, increases. The C₁C₁₉ bond length in the dipyrrole fragment of macrocycle is the marker of these interactions.

References

1. Beenken W.J.D., Presselt M., Ngo T.H. et al. Molecular Structures and Absorption Spectra Assignment of Corrole NH Tautomers // J. Phys. Chem., A. 2014. Vol. 118. P. 862-871.

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ФОТОСИСТЕМЫ 2 В ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE* L.) ПРИ ЗАРАЖЕНИИ *BIPOLARIS SOROKINIANA* НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ БИОГЕНЕЗА ХЛОРОПЛАСТОВ

Абрамчик Л.М., Бачище Т.С., Макаров В.Н.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

В индукции защитных реакций растений при патогенезе особую роль отводят хлоропластам. Одним из ключевых моментов этой проблемы является взаимодействие сигнальных путей, идущих из разных компартментов в ядро. Недавно было обнаружено, что в рассеивание избыточной энергии света посредством нефотохимического тушения (NPQ) вовлечен один из 6 фотосинтетических белков фотосистемы 2 (ФС 2) – субъединица PsbS, содержание которого уменьшалось после обработки растений элиситорами патогенов, что сопровождалось снижением NPQ и провоцировало накопление в хлоропласте возбужденных электронов и АФК. Эти данные повышают интерес к более глубокому исследованию функциональной активности фотосинтетического аппарата (ФСА) при инфицировании с помощью параметров РАМ-флуориметрии, позволяющих всесторонне охарактеризовать функциональную активность стрессочувствительной ФС 2.

В работе исследовали влияние грибного заражения *Bipolaris sorokiniana* Sacc. (Shoem.) на разных стадиях биогенеза хлоропластов в проростках ярового ячменя сорта Магутны на параметры РАМ-флуориметрии, измеренные на приборе Dual-PAM 100 («Walz», Германия): показатели нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ и qN), отражающие уровень тепловой диссипации поглощенной световой энергии в комплексах ФС2, рассчитанной разными способами; фотохимическое тушение поглощенной энергии (qP); количество открытых реакционных центров (qL); потенциальный квантовый выход фотохимических реакций (Fm/Fv) и др. Общим фоном служило изменение содержания фотосинтетических пигментов.

В процессе развития проростков на свету (между 6 и 12 сут) изменение Fm/Fv в контроле достоверно не отличалось от наблюдаемого при грибном заражении. Величина NPQ и qN в этом временном интервале менялась по-разному в здоровых и зараженных проростках: в контроле снижалась, а в инфицированных, напротив, увеличивалась. Кинетические кривые пересекались, демонстрируя участок, где различия между опытом и контролем существенно не проявлялись. Значения qP в здоровых и инфицированных проростках не различались на стадии максимального содержания пигментов (до 9 сут), и только на катаболическом участке хлорофиллообразования величина qP существенно снижалась при инфицировании. При этом относительное снижение последней при заражении было меньшим (75%), чем относительный прирост qN (150%). Кинетика изменения qL в листьях зараженных проростков соответствовала ходу кривой для qP.

При деэтиоляции величина Fm/Fv увеличивалась по мере накопления пигментов, но даже спустя 24 ч зеленения еще не достигала значений, характерных для зеленых листьев. При этом значения qP в контрольных и зараженных деэтиолированных проростках (0,822 и 0,789) приближались к наблюдаемым в здоровых зеленых (0,887). Однако, ни продолжительность освещения, ни грибное заражение достоверно не влияли на величину NPQ, которая мало отличалась от зеленых проростков того же возраста. Если, согласно литературным данным, снижение величины NPQ при инфицировании связано с ингибированием накопления субъединицы PsbS, то полученные нами результаты могут свидетельствовать о том, что влияние грибного заражения на синтез этого белка существенно изменялось в проростках разного возраста и зависело не только от степени развития хлоропластов, но и характера их биогенеза.

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОЛЕУСТОЙЧИВОГО ПЛАСТОМНОГО МУТАНТА «SR-3» РАСТЕНИЙ ГОРЧИЦЫ И ЕГО РОДИТЕЛЬСКОЙ ФОРМЫ «ДОНСКАЯ-5»

Аверина Н.Г.¹, Дремук И.А.¹, Усатов А.В.²

¹*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Южный Федеральный университет РАН, Ростов-на-Дону, Россия*

Засоление является одним из факторов окружающей среды, который в значительной степени ограничивает рост и развитие растений, приводя в конечном итоге к снижению их продуктивности, либо даже к гибели организмов [1]. Число генотипов хозяйственно полезных растений, способных расти на засоленных почвах, невелико. В работе использовали полученный с помощью индуцированного нитрозометилмочевинной мутагенеза солеустойчивый пластомный мутант «SR3» растений горчицы и исходный родительский сорт горчицы «Донская-5». С целью изучения роли пластома в формировании растений, устойчивых к засолению почв, мы изучили в них ряд морфометрических, а также важнейших биохимических показателей, характеризующих общее содержание активных форм кислорода (АФК), как показатель степени окисленности растительных клеток в условиях стресса, способность растений к синтезу ключевого предшественника хлорофилла и гема, регулятора роста растений и антистрессора – 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК), а также универсального антистрессора пролина, содержание которых характеризует состояние защитной системы растений в условиях засоления, создаваемого разными концентрациями NaCl. По сравнению с родительским сортом «Донская-5», пластомная мутация улучшила всхожесть семян мутанта, а также его ростовые характеристики как в условиях пресного фона, так и при использовании NaCl. При низких и средних концентрациях соли (20, 50 и 100 мМ) отмечена стимуляция ростовых процессов у обеих форм горчицы, более выраженная у растений мутанта, выявлено падение содержания пролина по сравнению с растениями, выращиваемыми на воде, а также меньшее содержание АФК у мутанта. Отмечено отрицательное действие более высоких концентраций соли (150, 200 и 250 мМ) на ростовые показатели обеих форм горчицы с меньшим негативным эффектом 150 мМ NaCl на рост растений линии SR3. Увеличение концентрации соли до 150, 200 и 250 мМ NaCl вызвало также постепенное возрастание содержания пролина, происходящее с большей скоростью у формы «SR3», что в конечном итоге привело к максимальному содержанию пролина в этом варианте – 718 мкг/г свежего веса и 404 мкг/г свежего веса в растениях сорта «Донская-5» при 250 мМ NaCl. В условиях засоления при 100 и 250 мМ соли способность растений горчицы линии SR3 накапливать АЛК была существенно выше, чем у растений сорта «Донская-5» – в 2,6 и 1,5 раз соответственно. Отмечена высокая способность растений солеустойчивого мутанта накапливать АЛК и при выращивании в нормальных условиях на воде (в 3,8 раза выше, чем в случае сорта «Донская-5»). Полученные результаты подкрепляют высказанное ранее предположение [2], что высокая способность растений производить АЛК в нормальных условиях может служить важным биохимическим показателем их большей стрессоустойчивости.

Библиографические ссылки

1. Productivity enhancement of salt-affected environment through crop diversification \ M. Qadir et al. // Land degrad. Develop. 2008. Vol. 19. P. 420–453.
2. Аверина Н.Г., Яронская Е.Б. Биосинтез тетрапирролов в растениях. Минск.: Беларуская навука, 2012. – 413 с.

ВЛИЯНИЕ КРАСНОГО СВЕТА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ И ТОМАТА

Азизов И.В., Гасимова Ф.И., Ибрагимова У.Ф., Тагиева К.Р., Абдуллаева А.Б.

*Институт молекулярной биологии и биотехнологий НАН Азербайджана,
Баку, Азербайджан*

Общеизвестно, что одним из важных факторов, необходимых для роста, развития и продуктивности растений является интенсивность и спектральный состав света. В условиях недостаточного обеспечения солнечным светом нарушается процесс фотосинтеза, снижается рост, развитие, урожайность и устойчивость растений. Овощные и злаковые культуры по реакции на недостаток солнечного света относятся к тем культурам, отрицательная реакция которых в дальнейшем сопровождается уменьшением показателей продуктивности. Известно, что в числе рецепторов растений, воспринимающих внешние световые сигналы, важнейшую роль играет система фитохромов [1]. Сейчас известно три класса фоторецепторов, входящих в эту систему: фитохромы, криптохромы и фототропины. Фитохромы воспринимают и трансдуцируют световой сигнал в красной области спектра (660–730 нм). Растения содержат, по крайней мере, пять фитохромов – А, В, С, D и Е, которые различаются по физиологической роли [2]. В работе использованы пять сортов томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.) Растения выращивали на экспериментальном участке на делянках с площадью 1 м². Опытные растения покрывали прозрачной пленкой, пропускающей свет при длине волн 640–680 нм. Фотосинтетические пигменты определяли методом гомогенизации листьев в 96% этаноле с применением коэффициентов Winternans, De Mots [3]. Содержание растворимых сахаров определяли ускоренным бихроматным методом при длине волн 630–570 нм [4]. Содержание белков определяли на спектрофотометре SP 2000 при длине волн 230 и 260 нм по методу Kalb, Bernlohr [5].

По некоторым литературным данным активация фитохромов приводит к повышению интенсивности обмена углеводов и активности ферментов углеводного обмена. В наших опытах выявлено увеличение содержания хлорофиллов и каротиноидов, что сопровождалась активацией работы фотосистемы 2, небольшим снижением содержания белков и увеличением содержания углеводов в листьях растений.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что в листьях всех исследованных растений отмечается увеличение содержания углеводов на красном свете.

Работа выполнена при поддержке Национальной академии наук Азербайджана в рамках совместного проекта Азербайджан-Беларусь «Фитохромная регуляция фотохимических процессов как фактор повышения стрессоустойчивости культурных растений».

Библиографические ссылки

1. Parks B.M. The red side of photomorphogenesis // Plant Physiology. 2003. Vol.133. P. 1437–1444.
2. Halliday K.J., Whitelam G.C. Changes in photoperiod or temperature alter the functional relationships between phytochromes and reveal roles for phyD and phyE // Plant Physiology. 2003. Vol.131. P. 1913–1920.
3. Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Большой практикум по фотосинтезу. "М.ACADEMIA". 2003. 254
4. Большой практикум «Биохимия». Пермь, 2012. 148 с.
5. Kalb V.F., Bernlohr R.W. A new spectro-photometric assay for protein in cell extracts. //Analyt. Biochem. 1977. Vol. 82. P. 362-371.

ДИАГНОСТИКА АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА РАСТЕНИЙ ПО СОДЕРЖАНИЮ ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЬЯХ

Боме Н.А.¹, Королев К.П.¹, Тетяников Н.В.², Колоколова Н.Н.¹

¹Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

²Всероссийский селекционно-технический институт садоводства и питомниководства, Москва, Россия

Рост и развитие сельскохозяйственных растений можно рассматривать как динамические процессы, постоянно меняющиеся под влиянием условий окружающей среды. К числу перспективных относят неинвазивные методы, позволяющие относительно быстро оценить реакции растений на воздействие различных факторов. Показано, что определение содержания хлорофилла в листьях с помощью оптического счетчика SPAD 502 может быть хорошим инструментом для отслеживания фотосинтетических изменений растений в ответ на стресс [1]. Такой подход в отличие от традиционных методов является менее трудоемким и более удобным для масштабных скрининговых исследований.

По нашим данным, показания SPAD 502 дают ценную информацию об изменениях в фотосинтетической системе растений в условиях моделируемого солевого (NaCl) и водного (раствор сахарозы) стресса. В раннем онтогенезе при дефиците влаги у сорта льна Флиз отмечено более активное накопление хлорофилла, но при этом уменьшалось число листьев на растении. У сортов Бирюза, Ярок, Грант в опытных вариантах содержание хлорофилла уменьшалось на 29,6; 19,7; 16,7% соответственно. Высокий уровень стресса не оказал негативного влияния на облиственность растений сорта Ярок. В полевых условиях по водоудерживающей способности листьев и визуальной диагностике водного дефицита растения сорта Бирюза и Флиз испытывали более сильный стресс, чем Грант и Ярок. Деградация хлорофилла у засухоустойчивых сортов проходила медленнее.

Количественное определение хлорофилла с помощью SPAD 502 можно использовать для установления различий между генотипами по солеустойчивости. Реакция растений льна на высокие концентрации NaCl проявлялась в уменьшении содержания хлорофилла; преимущество имели сорта с менее выраженным ингибирующим эффектом. У сортов с низкой устойчивостью (Северный, Грант, Ottawa, Флиз) содержание хлорофилла в вариантах с NaCl было в 2 и более раз ниже контроля. Минимальную чувствительность к хлоридному засолению проявил сорт Костанайский янтарь, у которого содержание хлорофилла в контроле составило 42,8 spad, при 0,5; 1 и 1,5 Мпа NaCl – 38,0; 34,9; 34,2 соответственно.

Скрининг коллекции ячменя (146 образцов) выявил значительные различия по содержанию хлорофилла в листьях – от 26,3 (Comfort f8, к-24678, var. *breviaristatum*, США) до 54,8 ед. spad (С.І. 11086, к-30666, var. *pyramidatum*, Перу), при среднем значении по образцам – 38,9 ед. spad. При сопоставлении результатов по водоудерживающей способности листьев с данными, полученными в лабораторном эксперименте с использованием провокационного фона (16% раствор сахарозы), выделены образцы устойчивые к водному стрессу: Сонет (к-30448, Россия, Свердловская обл.), Wisconsin x 691-1 (к-23493, США), Носовский 9 (к-24740, Украина), Местный (к-14965, Таджикистан) Зерноградский 813 (к-30453, Россия, Ростовская обл.). Содержание хлорофилла в клетках флагового листа этих образцов составило 36,8–43,8 ед. spad, индекс хлорофилла (отношение spad к площади флаг-листа) изменялся от 5,1 до 8,6.

Библиографические ссылки

1. Castelli, Fabio & Contillo, Renato & Miceli, Fabiano. Non-destructive Determination of Leaf Chlorophyll Content in Four Crop Species // Journal of Agronomy and Crop Science. 2008. Vol. 177. P. 275 - 283.

ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ К ФОТОИНГИБИРОВАНИЮ

Будаговская О.Н.^{1,2}, Будаговский А.В.^{1,2}

*ФГБНУ «Федеральный научный центр имени И.В.Мичурина», Мичуринск, Россия
ФГБОУ ВО «Мичуринский аграрный университет», Мичуринск, Россия*

Устойчивость фотосинтетического аппарата (ФСА) к фотоингибированию является признанным универсальным критерием функционального состояния растений. Однако его практическое использование сдерживается высокой энергоемкостью и трудоемкостью стандартных подходов. Типовые методики заключаются, как правило, в оценке фотосинтетической активности или спектральных характеристик листьев до и после многочасовой засветки целых растений с помощью мощных ламп светом свыше порога насыщения фотосинтеза [1–3].

Разработан экспресс-метод для определения устойчивости растений к световому повреждению, не требующий специализированной аппаратуры. Он основан на использовании техники и технологии регистрации параметров медленной индукции флуоресценции хлорофилла, при этом измерения проводятся дважды в одной и той же зоне листа с фиксированной темновой паузой между ними [4]. В этом случае световой поток, возбуждающий флуоресценцию, используется также и как фотоингибирующий фактор. По результатам трехфакторных и двухфакторных экспериментов оптимизировали плотность мощности, длительность световых циклов и темновой паузы, позволяющие в течение 2–3 минут судить об устойчивости ФСА растений к избыточному свету. Предложена оригинальная конструкция прибора и алгоритмы обработки данных, реализующие новый подход. Апробация на примере тене- и светолюбивых растений, реакции ФСА растений на воздействие низких и высоких температур, УФ излучения и т.п., показала высокую чувствительность метода, особенно на ранних этапах инактивации ФС II, когда еще нет достоверных различий по типовым критериям и параметрам флуоресценции.

Рассмотрены следующие аспекты практического применения – отбор устойчивых к фотоповреждению видов и сортов, что особенно актуально для растений второго яруса; сравнительная оценка адаптационных и репарационных способностей ФСА; экспресс-анализ смещения уровня окислительно-восстановительного баланса фотосинтезирующих тканей под действием неблагоприятных факторов среды; оптимизация доз внесения гербицидов, оценка эффективности новых агрономических приемов и т.д.

Библиографические ссылки

1. Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения /под. Ред. А.Б.Рубина. М.: «Наука», 1988. 232 с.
2. Kumar S.P. // Everyman's Sci. 2002. Vol. 36. P. 237-252.
3. Guidi L., Degl'Innocenti E. Ozone effects on high light-induced photoinhibition in *Phaseolus vulgaris* // Plant Science. 2008. Vol. 174. P. 590–596.
4. Патент РФ на изобретение №2569241 / Будаговская О.Н., Будаговский А.В., Будаговский И.А., Гончаров С.А. Оpubл. 10.01.2015, Бюл. № 1.

ПРОБЛЕМА КОГЕРЕНТНОСТИ СВЕТА В МЕХАНИЗМЕ ФОТОРЕГУЛЯТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРО- И ЭУКОРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Будаговский А.В.^{1,2}, Будаговская О.Н.^{1,2}, Будаговский И.А.³, Маслова М.В.¹,
Грошева Е.В.¹, Соловых Н.И.², Янковская М.Б.²

¹ФГБОУ ВО «Мичуринский государственный аграрный университет», Мичуринск,
Россия

²ФГБНУ «Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина», Мичуринск, Россия

³ФГБНУ «Физический институт имени П.Н. Лебедева РАН», Москва, Россия

В шестидесятые годы прошлого века было обнаружено явление лазерной стимуляции биологических организмов. Сам факт существования эффекта и его возможный механизм подвергались сомнению. Наиболее дискуссионным оказался вопрос о специфичности действия низкоинтенсивного лазерного излучения, т.е. о влиянии когерентности света на фоторегуляторные процессы. Многие исследователи полагают, что такого влияния нет. В доказательство приводят результаты экспериментов, в которых одинаковый стимуляционный эффект был получен от лазерных и не лазерных (тепловых, газоразрядных и т.п.) источников света. Лазерное излучение называли когерентным, а иных источников – некогерентным [1, 2]. Однако такой подход нельзя считать корректным, т.к. для выравнивания спектральных характеристик нелазерных источников проводили пространственно-временную фильтрацию (монокроматоры, апертурные диафрагмы) их излучения. В результате полученный квазимонохроматический пучок обладал относительно высокой пространственно-временной когерентностью. Аналогичная ситуация имела место при сравнении лазерного и светодиодного излучения, которое считали некогерентным [3]. Таким образом, необходим переход от интуитивных качественных оценок «когерентный - некогерентный» к количественным.

Исследования, проведенные на бактериях, грибах и растениях позволили установить, что активность фоторегуляторных процессов зависит от статистической упорядоченности действующего излучения. Наибольшая биологическая реакция имеет место, когда клетки полностью помещаются в объёме когерентности поля, т.е. выполняется условие $L_{\text{coh}}, r_{\text{cor}} \geq D$, где L_{coh} – длина когерентности, r_{cor} – радиус корреляции, D – эффективный размер клеток. В опытах с изменяемой временной и пространственной когерентностями показано, что обе эти статистические характеристики поля биологически значимы [4]. Последнее особенно важно, т.к. перестройка пространственной когерентности не влияет на ширину спектральной линии квазимонохроматического потока. Установленные закономерности проявляются не только в красной, но и в зеленой областях спектра, а также при обратной фотоконверсии фитохрома Б под действием дальне красного света.

Полученные результаты не вскрывают проблему в целом, но могут служить переходным звеном от классических представлений фотобиологии, не затрагивающих корреляцию фотонов, к процессам квантовой когерентности в биологических системах.

Библиографические ссылки

1. Кару Т.Й., Календо Г.С., Летохов В.С. и др. Зависимость биологического действия низкоинтенсивного видимого света на клетки *HeLa* от когерентности, дозы, длины волны и режима облучения. II // Квантовая электроника. 1983. Т. 10. С. 1771-1776.
2. Лобко В.В., Кару Т.Й., Летохов В.С. Существенна ли когерентность низкоинтенсивного лазерного света на биологические объекты // Биофизика. 1985. Т. 30, Вып. 2. С. 366-371.3.
3. Клебанов Г.И., Шураева Н.Ю., Чичук Т.В. и др. Сравнительное исследование влияния излучения лазера и светодиодов на перекисное окисление липидов раневого экссудата крыс // Биофизика. 2006. Т. 51, Вып. 2. С. 332-339.
4. Budagovsky A.V., Solovykh N.V., Yankovskaya M.B. et al. Effect of spatial coherence of light on the photoregulation processes in cells // Phys. Rev. E. 2016. Vol. 94. P. 012411.

СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА 21-ТИА- И 21,23-ДИТИА-5,10,15,20-ТЕТРАФЕНИЛПОРФИРИНА В РАСТВОРАХ

Вершиловская И.В.¹, Люлькович Е.С.^{1,2}, Пуховская С.Г.³, Иванова Ю.Б.⁴,
Плотникова А.О.³, Крук Н.Н.¹

¹ Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь

² РУП «Белмедпрепараты», Минск, Беларусь

³ Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия

⁴ Институт химии растворов имени Г.А. Крестова РАН, Иваново, Россия

В настоящей работе изучены спектрально-люминесцентные характеристики 21-тиа-5,10,15,20-тетрафенилпорфирина (SN₃-ТФП) и 21,23-дитиа-5,10,15,20-тетрафенилпорфирина (S₂N₂-ТФП) в дихлорметане при температуре 293 К с использованием методов абсорбционной и люминесцентной спектроскопии. Исследуемые вещества SN₃-ТФП и S₂N₂-ТФП были синтезированы по предложенной ранее методике [1] и представляют собой соединения порфиринового ряда, в которых соответственно одно (SN₃-) и два (S₂N₂-) пиррольных кольца заменены на пятичленные циклические фрагменты, содержащие в качестве гетероатома серу. В качестве эталонного соединения использовали свободное основание 5,10,15,20-тетрафенилпорфирина (N₄-ТФП).

Анализ электронных спектров поглощения показал значительный bathochromный сдвиг длинноволновой Q_x(0,0) полосы поглощения на 700 см⁻¹ и 1112 см⁻¹ для тиа- и дитиа-замещенных порфиринов соответственно по сравнению с N₄-ТФП. Несколько меньшие bathochromные сдвиги величиной 586 и 908 см⁻¹ испытывает полоса Core. В то же время для Q_y(0,0) полосы наблюдается небольшой гипсохромный сдвиг. Следует отметить, что сдвиги полос поглощения сопровождались изменением их относительных интенсивностей. Рассмотрение полученных качественных и количественных спектральных изменений с точки зрения четырехорбитальной модели Гоутермана [2] позволяет объяснить их не только различным конфигурационным составом электронных переходов, но и разным характером конфигурационного взаимодействия. Длинноволновой сдвиг полос в спектрах флуоресценции гетеропорфиринов отражает уменьшение энергии нижнего возбужденного синглетного S₁-состояния. При этом следует отметить прогрессивное увеличение сдвига Стокса (215 и 303 см⁻¹ для SN₃- и S₂N₂-ТФП соответственно), которое можно объяснить большей стабилизацией возбужденного S₁-состояния по сравнению с основным.

В гетеропроизводных порфиринов отмечено усиление тушения флуоресценции по сравнению с порфиринами с такой же архитектурой периферического замещения. Гетероатомы существенно различаются по величине константы спин-орбитальной связи λ . Поэтому нами была проанализирована зависимость квантового выхода флуоресценции $\Phi_{\text{фл}}$ исследуемых соединений от суммы квадратов констант спин-орбитальной связи гетероатомов в ядре макроцикла (т.е. N₄, SN₃, S₂N₂) λ^2 в двойных логарифмических координатах. Линейный характер полученной зависимости показывает, что тушение флуоресценции при переходе от N₄-ТФП к SN₃-ТФП и далее к S₂N₂-ТФП объясняется усилением спин-орбитального взаимодействия в макроцикле. Очень хорошая аппроксимация линейной функцией показывает, что этот канал тушения является доминирующим, а все другие возможные факторы следует считать второстепенными.

Библиографические ссылки

1. Gupta I., Ravikanth M. Recent developments in heteroporphyrins and their analogues // Coord. Chem. Rev. 2006. Vol. 250. P. 468-518.
2. Gouterman M. Optical spectra and electronic structure of porphyrins and related rings // The Porphyrins: Vol. 3. Ed. by D. Dolphin. New York. 1978. P. 1-165.

ОСОБЕННОСТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОРОСТКОВ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE* L.) РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ГРИБОМ *BIPOLARIS SOROKINIANA* SACC. (SHOEM.)

Викс Т.Н., Кабашникова Л.Ф.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Выяснение механизмов устойчивости фотосинтетического аппарата растений разного возраста при воздействии стрессовых факторов, а также причин угнетения процесса фотосинтеза являются актуальным направлением современной биологической науки [1]. Инфицирование растений патогенами приводит к изменению их метаболизма, что в значительной степени влияет на урожай и его качество. Одним из критериев оценки физиологического состояния растения является коэффициент фотосинтетической эффективности, который рассчитывают как отношение скорости выделения кислорода к скорости его поглощения в единицу времени с единицы листовой поверхности [2].

Целью данного исследования являлось изучение влияния патогенного гриба *Bipolaris sorokiniana* на фотосинтетическую эффективность проростков ячменя разного возраста.

В данном исследовании использовали зеленые проростки ярового ячменя сорта Магутны, выращенные на водопроводной воде при 22 °С в течение разного времени. Длина светового периода полихроматического белого света ($120 \text{ мкмоль квантов м}^{-2}\text{с}^{-1}$) составляла 16 ч. Часть растительного материала заражали грибом *Bipolaris sorokiniana* путем равномерного опрыскивания водным раствором, содержащим 10^6 спор в 1 мл. Анализ проводили через 24 ч после инокуляции. Интенсивность дыхания и фотосинтеза листовой пластинки оценивали по скорости поглощения и выделения O_2 ($\text{мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), соответственно, используя PlantVital 5030 (INNO-Concept, GmbH, Germany).

Инфицирование 3-х дневных проростков ячменя вызвало снижение по сравнению с контролем скорости поглощения и выделения O_2 листовой пластинкой на 24 и 34 % соответственно, в связи с чем коэффициент эффективности фотосинтеза (K_{phA}) был ниже контрольного ($3,29 \pm 0,3$) примерно на 14 % ($2,83 \pm 0,2$). Тенденция к снижению интенсивности дыхания и фотосинтеза прослеживалась и у зараженных на 5-й день проростков. Так, скорость поглощения O_2 у зараженных растений уменьшилась на 21 %, а скорость выделения O_2 – почти в 2 раза (на 48 %) относительно контроля. Таким образом, K_{phA} в этом случае был ниже контрольного ($3,16 \pm 0,2$) примерно на 36 % ($2,03 \pm 0,2$). При инфицировании 10-дневных проростков скорость поглощения O_2 листовой пластинкой превышала контроль на 19 %, при этом скорость выделения O_2 снизилась на 14 % от уровня контроля, в связи с чем коэффициент K_{phA} оказался ниже почти в 1,4 раза – $2,3 \pm 0,5$ (на 27 %) по сравнению с контрольным значением ($3,13 \pm 0,7$).

Таким образом, при грибном заражении отмечено снижение интенсивности дыхания и фотосинтеза в молодых и зрелых проростках ячменя, тогда как в стареющих 10-дневных наблюдалось усиление интенсивности дыхания на фоне небольшого снижения интенсивности фотосинтеза, в результате чего коэффициент эффективности фотосинтеза снижался с увеличением возраста проростков, причем наиболее существенно в стареющих листьях.

Библиографические ссылки

1. Кабашникова Л. Ф. Фотосинтетический аппарат и стресс у растений. Минск: «Беларус. навука», 2014. 276 с.
2. Акиншина Н.Г., Азизов А.А., Карасева Т.А. и др. Коэффициент фотосинтетической эффективности растений для оценки качества городской среды // Вестник МГУ. 2008. № 2. С. 17-24.

АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ АСТАКСАНТИНА ПРИ ФОТОИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛЕНИИ ХЛОРОФИЛЛА *a* В АЦЕТОНЕ

Вязов Е.В.¹, Гончарик Р.Г.¹, Куликов Е.А.², Алешин С.В.², Селищева А.А.^{2,3}

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,

²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Кетокаротиноид астаксантин является эффективным природным антиоксидантом. На данный момент слабо изучены различия в антиоксидантной активности цис- и транс-изоформ астаксантина и его эфиров и практически не изучено их влияние на окисление хлорофилла светом или различными окислителями. Мы предполагаем, что функции астаксантина (и его эфиров) определяются как структурой самой молекулы, так и окружающей её средой, в первую очередь, её диэлектрической проницаемостью.

В данной работе изучено влияние астаксантина на фотоиндуцированное окисление хлорофилла *a* в 100%-ном ацетоне ($\epsilon = 21$). Хлорофилл *a* экстрагировали ацетоном из клеток *Spirulina platensis*. Эфиры астаксантина экстрагировали 100%-ным гексаном из клеток *Haematococcus pluvialis*, а затем разделяли с помощью колоночной хроматографии в силикагеле с размером частиц 60-200 мкм, используя в качестве подвижной фазы смесь гексан:ацетон (в соотношении по объёму 97:3, затем 95:5). Фракции моно- и диэфиров астаксантина определяли с помощью ВЭЖХ, упаривали и перерастворяли в 100%-ном ацетоне. Для приготовления раствора свободного астаксантина использовали коммерческий транс-астаксантин (Sigma). Часть раствора свободного транс-астаксантина освещали белым светом 2 ч и 4 ч (3000 лк), что приводило к частичной изомеризации (после 2 ч освещения появлялось 5%, а после 4 ч – 7% цис-изомеров астаксантина). В опытах использовали растворы астаксантина с одинаковой оптической плотностью при 470 нм. К 500 мкл экстракта хлорофилла *a* (концентрация – 26 мкг/мл) добавляли по 500 мкл растворов астаксантина (в положительном и отрицательном контролях добавляли 500 мкл ацетона) и освещали 2 ч 20 мин белым светом люминесцентной лампы (3000 лк) при 24°C. Положительный контроль не освещали.

Для всех форм астаксантина (свободный с разным соотношением транс/цис, моноэфиры, диэфиры) выявлено дозозависимое подавление фотоиндуцированного окисления хлорофилла *a* по сравнению с отсутствием астаксантина (отрицательный контроль). Так, при 5 мкг астаксантина в смеси (в пересчёте на свободный транс-астаксантин) подавление составляло 33-36%, при 10 мкг – 42-53%, при 20 мкг – 59-64%. Ранее в тех же условиях показано подавление фотоиндуцированного окисления хлорофилла *a* при использовании специфического ингибитора синглетного кислорода – азида натрия. Это означает, снижение концентрации хлорофилла в данной системе обусловлено именно окислением под действием генерируемого на свету синглетного кислорода. Также показано, что при использовании красного света (от 610 нм и более) эффект астаксантина не исчезает, что исключает действие по механизму экранирования.

Таким образом, показано, что все изученные формы астаксантина проявляют антиоксидантное действие в системе фотоиндуцированного окисления хлорофилла *a* в ацетоне. Дальнейшие опыты с использованием растворителей с другой диэлектрической проницаемостью позволят изучить влияние этого параметра на антиоксидантные свойства форм астаксантина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант №Б19РМ-010) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант №19-54-04003).

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ОТХОДОВ АЛКОГОЛЬНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В ФОТОВЫДЕЛЕНИИ ВОДОРОДА ПУРПУРНОЙ БАКТЕРИЕЙ *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

Габриелян Л.С.

Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

За последнее время достигнут значительный прогресс в области исследования фотоферментативного выделения водорода (H_2), как перспективного вида биотоплива, фотосинтезирующими пурпурными бактериями, и разработаны подходы, позволяющие повысить выход H_2 [1–3].

В настоящее время рассматриваются возможности использования различных промышленных отходов для получения биотоплива, что обеспечит не только новые, эффективные и дешевые источники H_2 , но и поможет решить проблему утилизации отходов. Отходы алкогольной промышленности, такие как пивная дробина (основной отход пивоварения) и зерновая барда (отход производства этанола), являются практически неограниченными источниками белков, углеводов, органических кислот, жирных кислот, аминокислот, а также витаминов и микроэлементов [4, 5]. Отходы пивоваренного и спиртового производства в Армении составляют около 1,5 млн. тонн в год, из которых по разным данным перерабатывается около 10–15 %. Использование этих отходов для получения биоводорода может хотя бы частично решить вопрос утилизации отходов алкогольной промышленности.

В данной работе исследованы перспективы применения пивной дробины и зерновой барды для получения H_2 из пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* MDC6522, выделенной из минеральных источников Джермук в Армении. Пивная дробина была предоставлена пивоваренным заводом «Киликия» (Армения); а послеспиртовая зерновая барда – спиртовым заводом «Алекс Григ» (Армения).

Полученные данные показали возможность использования пивной дробины и зерновой барды в качестве эффективных источников углерода для получения биомассы и H_2 из *R. sphaeroides*. Скорость роста и фотовыделение H_2 при использовании 5 % пивной дробины превышали в 2 раза рост и выход H_2 в культуре, выращенной на стандартной среде Ормерода. Тогда как скорость роста и выход H_2 при выращивании бактерий на разбавленной в 2 раза барде возрастали в 2 и 4 раза, соответственно, по сравнению с контрольным образцом. Также показано, что предварительная обработка отходов, их разведение и нейтрализация необходимы для обеспечения эффективного роста и выделения H_2 *R. sphaeroides*.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что использованные отходы алкогольной промышленности могут служить перспективными субстратами для получения биоводорода.

Библиографические ссылки

1. Цыганков А.А., Хуснутдинова А.Н. Участие H_2 в метаболизме пурпурных бактерий и перспективы практического использования // Микробиол. 2015. Т. 84. С. 3–26.
2. Gabrielyan L., Sargsyan H., Trchounian A. The distillers grains with solubles as a perspective substrate for obtaining biomass // Microb. Cell Fact. 2015. V. 14. P. 131–141.
3. Hakobyan L., Gabrielyan L., Trchounian A. Biohydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* during photo-fermentation // Int. J. Hydrogen Energy 2019. V. 44. P. 674–679.
4. Poladyan A., Trchounian K., Vassilian A., Trchounian A. Hydrogen production by *Escherichia coli* using brewery waste // Ren. Energy 2018. V. 115. P. 931–936.
5. Кайшев А.Ш., Кайшева Н.Ш. Биологически активные вещества отходов спиртового завода // Фармация и фармакол. 2014. Т. 4. С. 3–22.

ПРОДУКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В БИОМАССЕ *SPIRULINA PLATENSIS* ПРИ ИНТЕНСИВНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Горбачевская Е.В., Мананкина Е.Е., Самович Т.В.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАНБ, Минск, Республика Беларусь

Биомасса цианобактерии спирулины (*Spirulina platensis*) обладает полезными свойствами и широко используется как биологически активная добавка для людей и животных, получения лекарственных и биохимических препаратов. В частности, спирулину используют в качестве сырья для получения лекарственного препарата Фотолон®, –применяемого в терапии онкологических заболеваний. В данном случае к биомассе спирулины существуют определенные требования по качеству, в числе прочих – максимально возможное содержание хлорофилла *a*, минимально возможное содержание металлов. Целью работы стало изучение продуктивности спирулины и содержания фотосинтетических пигментов в биомассе при ее культивировании в разных условиях освещения на среде с дефицитом железа. Культуру цианобактерии в течении 14 суток культивирования освещали светодиодными лампами, режимы освещения 14 ч света / 10 ч темноты (интенсивность освещения 5000 лк и 10000 лк), 17 ч света / 7 ч темноты (интенсивность освещения 10000 лк). Для выращивания спирулины использовали стандартную среду Заррука и среду Заррука, с уменьшенным на 50% содержанием железа.

Установлено, что содержание сухого веса в суспензии спирулины к 14 суткам во всех вариантах опыта превышало контроль, за который приняли культуру, выращенную на полной среде Заррука при режиме освещения 14 ч света / 10 ч темноты и интенсивности 5000 лк (стандартные условия выращивания культуры в лаборатории). При этом, наибольшее количество сухого вещества было зарегистрировано в варианте на полной среде Заррука с режимом освещения 17 ч света / 7 ч темноты и интенсивностью 10000 лк и составляло 6,55 г/л суспензии (178% к контролю). На среде Заррука дефицитной по железу в тех же условиях освещения продуктивность составила 5,85 г сухого веса/л суспензии (159% к контролю).

С увеличением времени освещения и его интенсивности регистрировали повышение содержания хлорофилла *a* и каротиноидов в культуре спирулины. Так, через 14 суток выращивания культуры в разных опытах при режиме освещения 14 ч света / 10 ч темноты и интенсивности 10000 лк содержание хлорофилла *a* составило 130-140% к контролю, при 17 ч света / 7 ч темноты и интенсивности 10000 лк – 170-185% к контролю, а содержание каротиноидов увеличивалось до 200% и до 300% соответственно. Значительной разницы в содержании хлорофилла и каротиноидов между вариантами на полной среде и среде с дефицитом железа не наблюдали. Однако увеличение интенсивности освещения и времени светового периода на полной среде Заррука к 14 суткам приводило к росту содержания в биомассе спирулины другого фотосинтетического пигмента фикоцианина при режиме освещения 14 ч света/10 ч темноты и интенсивности 10000 лк на 28%, при режиме 17 ч света / 7 ч темноты и интенсивности 10000 лк – на 60%. Варианты с дефицитом железа в тех же условиях содержали практически на 40% меньше фикоцианина.

Таким образом, культивирование спирулины на среде с дефицитом железа оправдано только с целью снижения возможного накопления в биомассе металла, однако на полной среде наблюдается больший прирост биомассы, и, соответственно, пигментов, в том числе хлорофилла *a*.

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФОТОСИСТЕМ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРТЕРМИИ И ДЕЙСТВИЯ КРАСНОГО СВЕТА, АДРЕСОВАННОГО ФИТОХРОМУ, В ЗЕЛЕННЫХ ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ

Доманская И.Н., Цеханович И.А.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Исследована роль ключевых фитохромов (ФХ) в регуляции состояния фотосистемы (ФС)1 и ФС2 в зеленых проростках ячменя в нормальных физиологических условиях и при стрессовом воздействии в виде теплового шока (ТШ). Использовали проростки ячменя (*Hordeum vulgare* L.), выращенные 5-6 дней в условиях 14-часового фотопериода ($120 \text{ мкмоль квантов м}^{-2}\text{с}^{-1}$) при температуре 22°C. Тепловую обработку интактных проростков проводили в термостате ТС-80М-2 в течение 2 ч при 40°C. Для перевода ФХ в активную и неактивную формы зеленые проростки ячменя облучали красным светом (КС) с помощью светодиодных ламп с $\lambda=660 \text{ нм}$ или дальним красным светом (ДКС) с $\lambda=732 \text{ нм}$, либо последовательным сочетанием этих двух освещений, после чего выдерживали растения в темноте 40 мин. Для КС интенсивность света была 1 Вт/м^2 , а для ДКС – $2,5 \text{ Вт/м}^2$. Параметры, характеризующие фотохимическую активность ФС1 и ФС2, определяли путем прижизненной регистрации индукции флуоресценции хлорофилла в интактных листьях ячменя после тепловой и ФХ обработок и последующей адаптации листьев к темноте в течение 20 минут с помощью РАМ-флуориметра «Dual-РАМ-100» (Walz, Германия).

Адаптация фотосинтетического аппарата в качестве одного из быстрых механизмов реагирования включает нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла (НТФ). Три из четырех параметров НТФ в «шокированных» проростках показали более чем двукратное уменьшение по сравнению с контролем. Последующее освещение КС не изменяло эти параметры по сравнению с контролем. Облучение ДКС полностью нивелировало действие ТШ. После ТШ также зарегистрировано снижение максимального уровня флуоресценции (Fm) ФС2 на 15%, уменьшение потенциального (Fv/Fm) – на 8% и эффективного ($\phi(\text{ФС2})$) квантовых выходов ФС2. На 70% уменьшилась эффективность переноса электронов в пределах ФС2 по сравнению с контролем. Дальнейшее освещение КС приводило к восстановлению этого параметра ФС2. Параметры, характеризующие работу ФС1, в таких условиях показали активацию цикла Кальвина в «шокированных» проростках. Последующее облучение низкоинтенсивным КС восстанавливало первоначальные параметры ФС1, а освещение ДКС не изменяло их по сравнению с контролем. Спектральная характеристика использованного освещения такова, что наблюдаемые эффекты можно объяснить ФХ-В-активацией. Таким образом, экспериментально показано, что в условиях ТШ подавляется электронный транспорт как на донорной, так и на акцепторной стороне ФС2. В таких условиях ослабляется интенсивность фотохимических реакций в ФС2 и снижается активность ФС1. Освещение светом, адресованным разным спектральным формам ФХ, оказывает регулирующее действие в восстановлении нарушенного при ТШ НТФ хлорофилла ФС2 и активности ФС1. Такое влияние ФХ на поврежденные ТШ растения, по-видимому, вызывает адаптацию фотосинтетического аппарата и позволяет ослабить накопление активных форм кислорода в хлоропластах.

Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ Б18АЗГ-003 (Беларусь-Азербайджан).

ДИСТАНЦИОННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ПЕРЕМЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ РАСТЕНИЙ

Доманский В.П.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

В литературе описаны многочисленные примеры использования явления переменной флуоресценции фотосинтезирующих организмов для исследования фотосинтеза, в том числе – для оценки показателей его эффективности [1]. Для этой цели используют специально изготавливаемые для регистрации флуоресценции хлорофилла РАМ-флуориметры. Однако эти приборы не предполагают регистрацию фотосинтеза в реальных условиях их произрастания – с условиями их освещения и газообмена. Предлагается новый подход к решению задачи мониторинга фотохимической активности фотосистемы 2. В частности, сконструирован принципиально новый прибор для этих целей, позволяющий осуществлять дистанционную регистрацию параметров переменной флуоресценции растений. Концепция предлагаемого прибора и метода измерений основана на том, что прибор минимально влияет на условия освещения растения и не нарушает условия газообмена. Это достигается тем, что исследуемый объект находится вне прибора, который может экранировать его от света и газовых потоков.

Существенное отличие прибора от известных заключается в его оптической части, которая формирует луч измерительного света на объекте, находящемся на расстоянии до 0.6 м и собирает свет флуоресценции от него на фотоприемнике. Прибор управляется компьютерной программой, позволяющей включать и выключать источники света в произвольном порядке или работать по программе, реализующей заданный алгоритм измерений. Результаты измерений обсчитываются по известным в литературе формулам [2] и представляются в виде таблицы. Также на экран выводится график индукционной кривой флуоресценции.

Предлагаемый прибор может быть использован для определения параметров переменной флуоресценции, принятых в традиционной РАМ-флуориметрии, после темновой адаптации растения, так и на актиничном свете. При этом стационарный уровень флуоресценции формально принимается за F_0 , а вызванные вспышкой света изменения ее считают индукционной кривой, которая может быть обсчитана по тем же формулам. Как показал эксперимент, полученные результаты либо близки к традиционным, либо имеют вполне прогнозируемые отличия от них. Но при этом важно, что растение все время находится в адаптированном к свету состоянии и полученные таким образом данные могут иметь даже больше физиологического содержания, чем традиционные.

Библиографические ссылки

1. Dual-PAM-100 Measuring system for simultaneous assessment of p700 and chlorophyll fluorescence [Electronic resource] / Heinz Walz GmbH. – Germany, 2009. – Mode of access: http://www.walz.com/downloads/manuals/dual-pam-100/Dual-PAM_1e.pdf. – Date of access: 11.04.2020.
2. Корнеев, Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции / Д.Ю. Корнеев. – Киев : Альтерпрес, 2002. – 188 с.

ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ПРОТОПОРФИРИНА С ТЕТРАМЕРНЫМ ФЕРМЕНТОМ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗОЙ

Дудинова О.Н., Собчук А.Н., Плавский В.Ю.

Институт физики имени Б.И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Интерес к изучению комплексов свободных (безметалльных) порфиринов с биополимерами обусловлен выявленной в последние годы способностью указанных тетрапирролов выступать в качестве эндогенных фотосенсибилизаторов, определяющих гибель микробных клеток при воздействии излучения синей области спектра. Считается, что активные формы кислорода, и прежде всего синглетный кислород, являются обязательными интермедиатами данного процесса. При этом вопрос об молекулах-мишенях, фотоповреждение которых инициирует гибель патогенов, остается открытым. Не вызывает сомнения, что вследствие короткого времени жизни синглетного кислорода в первую очередь будут повреждаться те молекулы, возле которых сенсибилизатор локализован, т.е. находится с ним в комплексе.

В настоящей работе исследовались закономерности комплексообразования динатриевой соли протопорфирина (PrIX) с лиофилизированной алкогольдегидрогеназой (АДГ), выделенной из дрожжей. Фермент представляет собой тетрамер молекулярной массой 141 кДа, содержащий 4 одинаковые субъединицы. Растворы готовились в 0,001 М фосфатном буфере, рН 7,4, дистиллированной воде и в диметилсульфоксиде. Изучение образования комплексов молекул фермента с сенсибилизатором проводилось спектрофотометрическими, спектрально-люминесцентными, кинетическими и поляризационными методами.

Образование прочных равновесных комплексов АДГ-PrIX подтверждается следующими данными: длинноволновым смещением ($\Delta\lambda = 14$ нм) полосы Соре спектра поглощения протопорфирина при встраивании в белковую глобулу; тушением порфирином триптофановой флуоресценции фермента при практически неизменной ее длительности затухания (статическое тушение); появлением для растворов АДГ-PrIX полосы с максимумом в области 280 нм (соответствующей максимуму в спектре поглощения АДГ) в спектре возбуждения флуоресценции порфирина (индуктивно-резонансный перенос энергии электронного возбуждения с триптофанилов на PrIX); практически двукратным увеличением квантового выхода и батохромным смещением ($\Delta\lambda = 14$ нм) спектра флуоресценции PrIX при встраивании в структуру белка. Отмечается также некоторое увеличение степени поляризации флуоресценции красителя ($p = 0,11$) при встраивании в белковую глобулу. Вместе с тем такое увеличение p представляется не столь значительным при связывании красителя с достаточно большой белковой молекулой. По всей видимости, относительно низкое значение степени поляризации флуоресценции красителя при комплексообразовании с АДГ обусловлено достаточно большим значением длительности затухания флуоресценции тетрапиррола ($\langle\tau\rangle = 14,4$ нс), а также высокой сегментарной подвижностью локусов фермента, в которых локализован краситель.

Исследования показали, что каждая субъединица, входящая в состав тетрамерной молекулы АДГ, образует комплекс с одной молекулой протопорфирина; константа ассоциации $K_{ac} = 8,7 \cdot 10^4$ М⁻¹. Выраженных пигмент-пигментных взаимодействий между молекулами, связанными с различными субъединицами одной макромолекулы, не обнаружено. Используя водные растворы PrIX, в которых тетрапиррол находится в агрегированном состоянии из-за низкого значения рН, показано, что взаимодействие с ферментом сопровождается дезагрегацией красителя.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА НАКОПЛЕНИЕ АНТОЦИАНОВ В ПРОРОСТКАХ ОЗИМОГО РАПСА В ПРИСУТСТВИИ ГИСТИДИНА

Емельянова А.В., Савина С.М., Аверина Н.Г.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Антоцианы – основные водорастворимые пигменты, обеспечивающие различную окраску как генеративных, так и вегетативных частей растения. Наряду с этим, антоцианы обладают мощной антиоксидантной активностью, снижая окислительную нагрузку в растениях. Они выполняют функцию оптического фильтра, тем самым защищая фотосинтетический аппарат, снижая степень его фотоингибирования [1]. В настоящее время появляется множество сведений о действии специфического предшественника хлорофилла и гема – 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК), как индуктора накопления антоцианов в различных видах растений [2]. Однако индуцируемые действием АЛК механизмы, вызывающие накопление антоцианов, до сих пор остаются малоизученными. Ранее нами было показано, что в семядольных листьях и гипокотильях озимого рапса, выращенного на растворе экзогенной АЛК в концентрации 200 мг/л, происходит значительное накопление антоцианов, что сопровождается изменением зеленой окраски ткани на фиолетовую [3]. Накопление антоциановых пигментов в растениях, выращенных на высоких концентрациях АЛК, может служить одним из защитных механизмов, снижающих содержание АФК, генерируемых порфиринами-фотосенсибилизаторами, которые образуются из экзогенной АЛК. С целью проверки данного предположения, мы изучили влияние экзогенной АЛК (200 мг/л) на накопление антоцианов в проростках озимого рапса в присутствии гистидина, который используют в качестве ловушки для синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$), что приводит к снижению содержания АФК в растении. В качестве объекта исследования использовали 7-дневные проростки растений озимого рапса (*Brassica napus* L.) сорта «Зорны». Растения выращивали в лабораторных условиях на дистиллированной воде (контроль), растворе АЛК (вариант «АЛК») в концентрации 200 мг/л и на растворе АЛК 200 мг/л в присутствии 25 мМ гистидина («АЛК+гистидин»). Семена проращивали в пластиковых контейнерах на фильтровальной бумаге при температуре $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Освещение растений осуществляли с помощью белых люминесцентных ламп Philips TD-36/765 66,2 мкмоль фотонов/($\text{м}^2 \cdot \text{с}$) в режиме 14 ч света и 10 ч темноты. Для анализа использовали семядольные листья проростков. Содержание антоцианов определяли, как описано в работе [4] с некоторыми модификациями. Установлено, что семядольные листья проростков озимого рапса, выращенные на растворе экзогенной АЛК в концентрации 200 мг/л в присутствии 25 мМ гистидина, сохраняли зеленую окраску ткани, что было обусловлено снижением в них накопления антоцианов. Так, содержание антоцианов в семядольных листьях растений варианта «АЛК» составляло 195% от контроля, а в варианте «АЛК+гистидин» – лишь 68% от контроля. Полученные результаты указывают на то, что АЛК-индуцированное накопление антоцианов является одним из механизмов защиты растений от фотодинамических процессов, вызванных генерацией $^1\text{O}_2$.

Библиографические ссылки

1. Gould K. Nature's swiss army knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves // J Biomed Biotechnol. 2004. Vol. 5. P. 314-320.
2. Wu Y., Liao W., Dawuda M.M. et al. Spermidine-mediated hydrogen peroxide signaling enhances the antioxidant capacity of salt-stressed cucumber roots// Plant Growth Regulation. 2018. P. 1-18.
3. Аверина Н.Г., Щербаков Р.А., Емельянова А.В. и др. Влияние нитропирина на повышение солеустойчивости растений ячменя // Физиология растений. 2017. Т. 64, № 3. С. 173-182.

НАКОПЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЬЯХ РАПСА (BRASSICA NAPUS) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ АГРОЭКОЛОГИЧЕСКИХ ОПЫТОВ

Зубкова Т.В.¹, Мотылёва С.Ю.², Дубровина О.А.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Елецкий государственный университет имени И. А. Бунина», Елец, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства», Москва, Россия

Фотосинтез является важнейшим процессом, который обеспечивает получение высоких и стабильных урожаев сельскохозяйственных культур [1]. Известно, что фотосинтетические параметры значительно улучшаются за счет применения различных видов питания растений [2]. Наблюдения за фотосинтетической активностью проводились в условиях лесостепи ЦЧР. В качестве объекта исследований был яровой рапс сорта «Риф». Схема опытов включала в себя следующие варианты исследований: 1 Контроль; 2 N60P60K60; 3 Цеолит 3 т/га; 4 Цеолит 5 т/га; 5 Куриный помёт 2,5 т/га; 6 Куриный помёт 5 т/га; 7 Куриный помёт 10 т/га; 8. N60P60K60 +ЦЗт/га; 9 N60P60K60 +Ц5т/га; 10.Куриный помёт 2,5 т/га+Цеолит 3 т/га; 11.Куриный помёт 5 т/га+Цеолит 3 т/га; 12.Куриный помёт 10 т/га+Цеолит 3 т/га;13 Куриный помёт 2,5 т/га+Цеолит 5 т/га; 14.Куриный помёт 5 т/га+Цеолит 5 т/га; 15.Куриный помёт 10 т/га+Цеолит 5 т/га. Удобрения в виде куриного помёта и природного цеолита вносили вручную весной перед культивацией. Количество пигментов определяли спектрофотометрическим методом. Внесение органических удобрений способствовало увеличению хлорофилла *a*. При этом установлено, что внесение в чистом виде органики обеспечивало накопление данного хлорофилла больше, чем при добавлении цеолита, как в фазу розетки, так и в фазу цветения. Так, на контрольном варианте в растениях рапса в фазы розетки и цветения отмечалось содержание хлорофилла *a* - 0,443 и 1,057 мг/г, а в вариантах с использованием органики данный показатель в среднем по вариантам составил - 0,743 и 1,359 мг/г соответственно. Это объясняется тем, что в органических удобрениях содержатся гуматы, которые в свою очередь повышают активность метаболических процессов в клетках, а это приводит к интенсификации обмена веществ, фотосинтеза и дыхания растений, что является фактором накопления фотосинтетических пигментов в растениях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Липецкой области в рамках научного проекта № 19-44-480003

Библиографические ссылки

1. Каташов Д. А., Хрянин В. Н. Влияние фитогормонов и селената натрия на содержание пигментов и продуктивность растений рапса сорта Ратник (*Brassica napus*) // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. 2014. № 1 (5). С. 25–34.
2. El-Mogy M. M., Salama A. M., Mohamed H. F. Y., Abdelgavad K. F., Abdeldaym E. A. Responding of Long Green Pepper Plants to different Sources of Foliar Potassium Fertiliser // Agriculture (Poľnohospodárstvo). 2019. Vol. 65. P. 59–76. dOI: 10.2478/agri-2019-0007.

КОНФОРМАЦИОННАЯ ДИНАМИКА В ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЯХ И ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕЗО-НИТРО-ПРОИЗВОДНЫХ ОКТАЭТИЛПОРФИРИНА И ИХ Zn-КОМПЛЕКСОВ

Ивашин Н.В.

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

Тетрапиррольные соединения широко используются в различных медико-биологических и аналитических приложениях. На их основе создаются различные устройства преобразования солнечной энергии. Исследование конформационной динамики в возбужденных состояниях такого рода молекул позволяет глубже понять механизмы фотофизических процессов с их участием и предложить новые подходы для создания флуоресцентных сенсоров, сенситизаторов и ингибиторов фоторазрушения. Конформационная динамика в возбужденных состояниях порфиринов и их синтетических димеров может сопровождаться существенными структурными перестройками. Так, например, наличие фенильного заместителя в мезо-положении макроцикла для стерически-затрудненных порфиринов и их синтетических димеров способствует образованию в триплетном состоянии его общей сопряженной системы связей с макроциклом, что существенно сказывается на времени жизни триплетного состояния и квантовом выходе образования синглетного кислорода [1]. Целью данной работы было теоретическое исследование конформационных превращений в возбужденных состояниях для ряда стерически затрудненных порфиринов, содержащих нитро-группу.

Методами теории функционала плотности проведены квантово-химические расчеты возбужденных состояний моно- и ди-мезо-нитро-производных октаэтилпорфирина (OEP) и их Zn-комплексов. Полученные данные свидетельствуют о том, что состояния с переносом заряда расположены существенно выше локально возбужденных состояний и не играют заметной роли в тушении флуоресценции данных соединений, как это предполагалось ранее. Показано, что для всех исследованных соединений в триплетном состоянии имеет место конформационная динамика, способствующая образованию структур с общей сопряженной системой связей между порфириновым макроциклом и нитро-группой. Ее особенностью является малая величина активационного барьера ($15\text{--}180\text{ см}^{-1}$) структурной перестройки и заметное уменьшение величины энергетического интервала $\Delta(T_1-S_0)$ между основным и нижним триплетным состояниями. Полученные данные указывают на то, что для $H_2\text{-}\alpha\text{-NO}_2\text{-OEP}$, $H_2\text{-}\alpha,\gamma\text{-(NO}_2)_2\text{-OEP}$ и $Zn\text{-}\alpha,\gamma\text{-(NO}_2)_2\text{-OEP}$ в триплетном состоянии в растворе в толуоле присутствуют конформации, для которых величина энергетического зазора $\Delta(T_1-S_0)$ заметно меньше 7800 см^{-1} . Это позволяет объяснить уменьшение квантового выхода интерконверсии для данных соединений в случае его оценки методом измерения свечения синглетного кислорода. Неравенство единице суммы квантовых выходов интерконверсии и флуоресценции для исследуемых соединений связано с конформационными превращениями в возбужденных состояниях, которые могут оказывать влияние на вероятность внутренней конверсии в синглетном состоянии и точность определения квантового выхода интерконверсии различными методами.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Фотоника, опто- и микроэлектроника 1.4.01». Автор благодарит за предоставленную возможность проведения расчётов Вычислительный центр НАН Беларуси.

Библиографические ссылки

1. Ивашин Н. В., Щупак Е. Е., Сагун Е. И. Влияние структур и конформационной динамики на тушение триплетных состояний порфиринов и их химических димеров // Опт. и спектр. 2015. Т. 118. С. 87-97.

МЕХАНИЗМЫ ДЕЗАКТИВАЦИИ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ Co(II) - И $\text{Cu-5,10,15,20-ТЕТРАКИС[4-(N-МЕТИЛПИРИДИЛ)]ПОРФИРИНА}$ В РАСТВОРЕ И КОМПЛЕКСАХ С ДНК

Ивашин Н.В., Терехов С.Н.

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

Фотодинамическая активность и перспективы использования катионных порфиринов в качестве антираковых препаратов послужили причиной исследования их возбужденных состояний, механизмов и типов связывания с нуклеиновыми кислотами. Исследование спектров резонансного комбинационного рассеяния (РКР) с наносекундным импульсным возбуждением $\text{Cu-5,10,15,20-тетракис[4-(N-метилпиридил)]порфирина}$ (Cu-TMPyP4), связанного с ДНК, позволило предположить, что при больших мощностях возбуждения создаются благоприятные условия для регистрации колебательных частот данного порфирина в возбужденном dd -состоянии, соответствующем, предположительно, переходу $d(z^2) \rightarrow d(x^2-y^2)$ [1]. Подобные результаты были получены также для $\text{Co}^{\text{II}}\text{TMPyP4}$ при связывании не только с ДНК, но и с АТ-содержащими полинуклеотидами [2]. Целью данной работы являлось установление природы возбужденного состояния Co(II) - и Cu-TMPyP4 ответственного за появление дополнительных линий в спектрах РКР, полученных при интенсивной импульсной накачке, а также выяснение механизмов влияния на его время жизни различных факторов.

В работе проведено исследование спектров РКР $\text{Co}^{\text{II}}\text{TMPyP4}$ и CuTMPyP4 в различных растворителях и в комплексе с ДНК. В спектрах РКР $\text{Co}^{\text{II}}\text{TMPyP4}$ в растворе неочищенного диметилформамида (ДМФ), предположительно содержащем в качестве примеси муравьиную кислоту, а также для его комплекса с ДНК при наносекундном лазерном возбуждении обнаружены дополнительные линии. В то же время при тех же условиях возбуждения такие линии отсутствуют в спектрах $\text{Co}^{\text{II}}\text{TMPyP4}$ в чистом ДМФ, диметилсульфоксиде, воде, и спиртах. Для интерпретации экспериментальных данных проведены расчеты структуры и колебаний для сольватных комплексов Co^{II} - и CuTMPyP4 с водой, метанолом и муравьиной кислотой в основном и в различных возбужденных состояниях. На основе полученных данных дополнительные линии в спектрах РКР отнесены к возбужденному dd -состоянию, соответствующему переходу $d(z^2) \rightarrow d(x^2-y^2)$, время жизни которого увеличивается при образовании комплексов $\text{Co}^{\text{II}}\text{TMPyP4}$ с муравьиной кислотой. В соответствии с результатами расчетов, это коррелирует с уменьшением константы скорости внутренней конверсии k_{ic} вследствие увеличения энергетического зазора ΔE между основным и dd -состоянием $\text{Co}^{\text{II}}\text{TMPyP4}$. В случае связывания Co^{II} и CuTMPyP4 с ДНК уменьшение k_{ic} обусловлено взаимодействием иона металла с одной из молекул иммобилизованной на поверхности ДНК воды, молекулы которой жестко связаны с нуклеиновыми основаниями и, следовательно, менее подвижны. Это затрудняет конформационную перестройку молекулы воды в dd -состоянии, что способствует увеличению ΔE и соответственно времени жизни dd -состояния (на несколько порядков по сравнению с раствором в воде).

Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Фотоника, опто- и микроэлектроника 1.4.01».

Библиографические ссылки

1. Turpin P.-Y., Chinsky L., Laigle A., Tsuboi M., Kincaid J.R., Nakamoto K. A porphyrin-DNA exciplex // Photochemistry and Photobiology. 1990. Vol. 51. P. 519–525.
2. Terekhov S.N., Chirvony V.S., Galievsky V.A. et al. Photoinduced Species of Cationic Co^{II} Porphyrin in Complexes with AT-Containing Nucleic Acids Characterized by Resonance Raman and Transient Absorption Spectroscopies // Macroheterocycles. 2011. Vol. 4, P. 89-92.

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК *CHLORELLA VULGARIS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АЗОТНО-ФОСФАТНОГО РЕЖИМА

Ильчук И.А., Никандров В.Н.

Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь

Интенсификация биотехнологии хлореллы предусматривает углубленное изучение ее биологии. Оптимизация состава питательных сред, предназначенных для получения целевых продуктов жизнедеятельности микроводоросли, требует выяснения оптимальных концентраций и источников макроэлементов фосфора и азота. Их концентрации в питательной среде заметно влияют на рост и метаболизм водорослей [1, 2]. Культивирование хлореллы на среде Тамия оригинального состава сопровождалось ростом биомассы в 4,7 раза, концентрации внутриклеточного белка в 3,9 раз с максимумом на 11-е сутки, хлорофилла *a* в 1,3 раза с максимумом на 11–15-е сутки, хлорофилла *b* в 2,2–4,3 раза с максимумом на 13–17-е сутки в сравнении с началом культивирования [3, 4]. Неожиданным явилось то, что удаление из питательной среды источника азота – KNO_3 хотя и замедляло рост биомассы, но к концу эксперимента ее уровень существенно не уступал максимальному значению контрольного варианта. Складывается впечатление, что в инокуляте (причем клеток, отмытых от среды роста) осталось достаточно резервов для замедленного, но полного по биомассе развития культуры на протяжении трех недель. Рост на безазотной среде сопряжен с постепенным снижением уровня внутриклеточного белка, хотя содержание хлорофилла *a* мало отличалось от контрольного варианта питательной среды. Снижалась концентрация хлорофилла *b* и каротиноидов. Замещение же нитрата калия карбонатом аммония, судя по полученным результатам, отрицательно сказывалось на культуре указанного штамма хлореллы. Ни в одном из вариантов питательной среды, содержащей соль аммония, в клетках культуры не был достигнут уровень биомассы контрольного варианта и даже безазотного. Эти результаты существенно отличаются от ранее известных из литературы. Уровень неорганического ортофосфата в питательной среде существенно влиял на урожай биомассы *Ch. vulgaris* и содержание внутриклеточного белка. Получена сложная и неоднозначная картина, на первый взгляд, свидетельствующая о том, что увеличение концентрации HPO_4^- чревато угнетением роста культуры *Ch. vulgaris* и снижением уровня внутриклеточного белка. Попытка увеличения концентрации азота только ухудшила ситуацию. Однако, полученные сдвиги изученных показателей в отдельные периоды роста культуры позволяют думать, что дальнейшая проработка рассмотренного в статье вопроса может значительно улучшить результаты. Сдвиги содержания хлорофиллов однотипны изменениям при таких воздействиях урожая биомассы и внутриклеточного белка. Однако они не были столь резкими и в конце культивирования уровень пигментов мало отличался от контроля (за исключением вариантов, не содержащего ортофосфат и обогащенного источником азота). Возможно, это свидетельствует о компенсаторном сдвиге метаболических систем водоросли.

Библиографические ссылки

1. Minhas A.K. [et al.] A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids // *Frontiers Microbiology*. 2016. Vol. 7. P. 546.
2. Мансурова И.М. Влияние различных источников азота на рост динофитовых водорослей Черного моря // *Вопросы современной альгологии*. 2014. № 2. С.6.
3. Ильчук И.А., Кандыба Е.М., Никандров В.Н. Физиолого–биохимическое состояние клеток культуры *Chlorella vulgaris* штамма IBCE C-19 // *Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук*. 2019. № 2. С. 40–50.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЛАСТИД И КОМПОНЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE* L.) ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ГРИБОМ *BIPOLARIS SOROKINIANA* В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ЗЕЛЕНЕНИЯ

Кабашникова Л.Ф., Савченко Г.Е., Абрамчик Л.М., Доманская И.Н.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Недавние исследования транскриптома при патогенезе показали, что образование в хлоропластах активных форм кислорода (АФК) происходит в результате рецепции патоген-ассоциированных молекулярных структур (pathogen-associated molecular pattern), приводящей к быстрому подавлению связанных с хлоропластами генов, кодируемых в ядре (NECGs). Предполагают, что один из механизмов, провоцирующих накопление в хлоропласте возбужденных электронов и АФК, связан со снижением нефотохимического тушения поглощенной световой энергии (NPQ), характеризующего ее тепловую диссипацию. Для проверки этой гипотезы было исследовано влияние заражения грибом *Bipolaris sorokiniana* Sacc. (Shoem.) на уровень NPQ и общее содержание АФК на разных стадиях формирования хлоропластов в развивающихся на свету и деэтиолированных проростках ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Магутны. Кроме того, был оценен ряд параметров антиоксидантной защиты: активность аскорбатпероксидазы (АПР) – основного фермента в цикле реакций, направленных на удаление АФК в хлоропластах, перекисное окисление липидов (ПОЛ) и общее содержание полифенолов.

В результате проведенных исследований обнаружены различия в реакции растений на грибное заражение в условиях нормального светопериода (развивающиеся хлоропласты) и в зараженных на стадии этиоляции зеленеющих на свету проростках (формирующиеся этиохлоропласты). В процессе развития зеленых проростков после достижения максимального содержания пигментов (сниженного при заражении) и их дальнейшего катаболизма (от 6 до 12 сут) величина NPQ снижалась, а при инфицировании увеличивалась. Ни продолжительность освещения, вызывающего накопление разного количества пигментов, ни грибное заражение достоверно не влияли на NPQ при деэтиоляции. Общее количество АФК увеличивалось по мере роста здоровых зеленых проростков и при грибном заражении сохранялось на более высоком по сравнению с соответствующим контролем уровне, несмотря на то, что инфицирование оказывало стимулирующее действие на активность АПР, которая в зараженных листьях была выше, чем в здоровых, особенно в стареющих проростках. При этом активность ПОЛ в зеленых растениях снижалась при заражении. В здоровых деэтиолированных проростках наблюдалось повышенное по сравнению с зелеными того же возраста содержание АФК, которое снижалось в результате грибного заражения, а уровень ПОЛ был ниже, чем в зеленых и слабо изменялся при инфицировании. Выявлена тесная положительная корреляция ($r=0,83$) между содержанием малонового диальдегида, характеризующим активность ПОЛ, и содержанием хлорофиллов ($a+b$) в расчете на единицу сырой массы листа развивающихся зеленых проростков, которая отсутствовала в деэтиолированных. В последних обнаружено более высокое содержание полифенолов по сравнению с зелеными того же возраста, хотя при инфицировании степень изменения этого показателя практически не зависела от условий зеленения.

Таким образом, ответные реакции на грибное заражение в тканях листа, содержащих хлоропласты или этиохлоропласты, различались по характеру изменения параметров NPQ, общего содержания АФК, полифенолов и активности ПОЛ. Это можно объяснить сложным взаимодействием пластидных (связанных с фотосинтетической функцией), фотопериодических и гормональных сигналов в разных условиях зеленения, обеспечивающих итоговый иммунный ответ.

ВЛИЯНИЕ ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХИ НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ЯЧМЕНЯ СОРТА БРОВАР

Каляга Т.Г., Козел Н.В.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Среди множества стрессовых воздействий в последние годы засуха является одним из наиболее серьезных абиотических факторов, значительно снижающих урожайность. Недостаток воды вызывает серьезные изменения большинства физиологических процессов у растения: задержку роста и развития, потерю тургора, снижение скорости фотосинтеза и усвоения углерода, нарушение минерального питания и газообмена листьев и многое другое, что в значительной степени влияет на продуктивность сельскохозяйственных культур. Целью данной работы являлось изучение действия почвенной засухи на содержание фотосинтетических пигментов в 7-дневных проростках ячменя сорта Бровар. В качестве объекта исследования использовали зеленые проростки ячменя (*Hordeum vulgare* L.) засухоустойчивого сорта Бровар, выращенные в лабораторных условиях в режиме 14 ч света и 10 ч темноты при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха 30%. Исследование влияния засухи на проростки ячменя проводили в культуре, выращенной в почве без полива. Состав и содержание хлорофиллов (Хл) *a* и *b*, феофитинов (Фео) *a* и *b* и каротиноидов в листьях ячменя определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Анализ пигментных экстрактов методом ВЭЖХ позволил выявить во всех исследуемых вариантах наличие каротиноидов: неоксантина, виолаксантина, антраксантина, лютеина и β -каротина, а также Хл *a* и *b*, Фео *a* и следовые количества Фео *b*. Было показано, что в условиях засухи достоверно снижается общее количество Хл (*a* + *b*) на 13,3 % относительно контрольного варианта. Такая же тенденция наблюдается относительно Хл *a* и Хл *b*: анализ содержания этих пигментов в зеленых листьях ячменя показал, что при недостатке влаги данные показатели снижаются на 15,0 и 9,0 %, соответственно. Также следует отметить, что отношение Хл (*a/b*) в контрольных растениях превышает таковой показатель в растениях, выращенных при дефиците влаги, на 6,5 %. Установлено, что растения, выращенные в условиях почвенной засухи, отличаются от контроля пониженным содержанием каротиноидов на 37,6 % в пересчете на сухой вес. При этом наблюдается существенное снижение как ксантофилловых каротиноидов неоксантина, виолаксантина, антраксантина и лютеина на 45,1; 46,8; 39,0 и 24,0 % соответственно, так и β -каротина (на 41,7 %). Однако, обращает на себя внимание меньшее снижение количества лютеина, выполняющего преимущественно функцию нейтрализации окислителей и свободных радикалов в клетке, по сравнению с неоксантином, виолаксантином и β -каротином, активно участвующими в светосборе.

В целом, приведенные выше данные указывают на то, что недостаток влаги в почве отрицательно влияет на накопление пигментов и каротиноидов. Однако мы предполагаем, что снижение количества пигментов связано в основном не с деструкцией в результате стресса, а снижением их синтеза, что может быть адаптационной реакцией растений, позволяющей минимизировать вероятность образования активных форм кислорода в фотосинтетических мембранах в условиях недостатка влаги, а также оптимизировать в таких условиях использование энергии света для фотосинтетических процессов, на что указывает преимущественное снижение таких каротиноидов, как неоксантин, виолаксантин и β -каротин, активно участвующих в светосборе. Стоит отметить, что выбранный для исследования сорт ячменя Бровар является засухоустойчивым. Обнаруженная нами тонкая подстройка компонентов фотосинтетического аппарата к действию засухи может быть одним из ключевых факторов, определяющих устойчивость этого сорта к данному виду абиотического стресса.

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ МАКРОЦИКЛА В ФОРМИРОВАНИИ ОСНОВНОСТИ АЛКИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ СВОБОДНОГО ОСНОВАНИЯ КОРРОЛА

Кленицкий Д.В.¹, Маес В.², Крук Н.Н.¹

¹ Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь

² Хассельтский университет, Дипенбек, Бельгия

В настоящей работе методами квантовой химии рассчитана молекулярная структура макроцикла длинноволновых NH таутомеров семейства метилзамещенных производных свободного основания коррола с различной архитектурой периферического замещения. Исследуемые соединения различаются архитектурой периферического замещения, которая определяет локализацию стерических взаимодействий на периферии тетрапиррольного макроцикла. Усиление стерических взаимодействий и их распространение на весь макроцикл приводит к существенному росту величины степени неплоскостных искажений макроцикла Δ_{23} . Однако, для определения основности макроцикла имеет значение не только величина степени неплоскостных искажений макроцикла в целом, но и локальные конформационные характеристики, определяющие положение пирроленинового фрагмента, который протонируется [1]. Атом азота пирроленинового кольца может либо экспонироваться в растворитель, либо экранироваться близлежащими фрагментами макроцикла от межмолекулярных взаимодействий. В первом случае основность молекулы будет возрастать, а во втором уменьшаться.

Анализ полученных значений двугранных углов Φ_D между плоскостью пирроленинового кольца D и средней плоскостью макроцикла 7C указывает на отсутствие однозначной корреляции величины угла Φ_D и величины Δ_{23} для всего массива данных. В то же время обнаружено, что величина двугранного угла Φ_D между протонирующимся пирролениновым кольцом и средней плоскостью макроцикла 7C зависит от длины связи C_1C_{19} , которая, в свою очередь, определяется архитектурой периферического замещения. Установление корреляции позволяет предложить молекулярные структуры, которые будут существенно различаться основностью макроцикла. Показано, что производные свободных оснований корролов с заместителями в квадрантах, не включающих дипиррольный фрагмент, должны иметь высокую основность в результате формирования конформера с большим углом наклона пирроленинового кольца относительно средней плоскости макроцикла. Напротив, если заместители размещены в C_b -положениях пиррольных колец дипиррольного фрагмента и соседних с ним C_m -положениях макроцикла, то соединения должны иметь низкую основность из-за того, что неподеленная электронная пара азота пирроленинового кольца лежит практически в плоскости тетрапиррольного макроцикла и экранируется от межмолекулярных взаимодействий в растворе. Замещенные в трех C_m -положениях макроцикла производные обладают большей основностью по сравнению с C_b -замещенными производными. При этом основность C_m -замещенных производных будет существенно зависеть от типа заместителя, поскольку степень стерических взаимодействий с макроциклом (например, из-за наличия или отсутствия объемных групп в *орто*-положениях арильных заместителей) способна влиять на длину связи C_1C_{19} в дипиррольном фрагменте.

Библиографические ссылки

1. Presselt M., Dehaen W., Maes W. et al. Quantum chemical insights into the dependence of porphyrin basicity on the *meso*-aryl substituents: thermodynamics, buckling, reaction sites and molecular flexibility // Phys. Chem. Chem. Phys. 2015. Vol. 17. P. 14096–14106.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ СОСТАВ МЕТАБОЛИТОВ С3 И С4 РАСТЕНИЙ (НА ПРИМЕРЕ *ACTINIDIA* И *AMARANTHUS*)

Мотылева С.М.¹, Гинс М.С.², Козак Н.В.¹, Кабашникова Л.Ф.³

¹ Федеральное Государственное научное учреждение «Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства», Москва, Россия

² Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства», Москва, Россия

³ Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Фотосинтез является фундаментальной основой жизни растений, и его регуляция напрямую зависит от процессов, на которые может влиять водный стресс, таких как диффузия CO₂ в листе, транспорт углерода в нефотосинтезирующие органы, синтез осмопротекторов и других метаболитов листа [1]. Методом газовой хромато-масс-спектрометрии проведено сравнение состава водорастворимых метаболитов листьев С3 и С4 растений *Actinidia arguta* и *Amaranthus tricolor* L., в условиях отсутствия стресса. В водном экстракте актинидии зарегистрировано 46 метаболитов, из которых 10 органических кислот – янтарная, лимонная, фумаровая, малеиновая, муравьиная, малоновая, хризантемовая, эритро-пентановая, этилкарбоновая и глюконовая; 5 фенольных соединений – коричная, фталевая, фенилуксусная, бензойная кислоты и тирозол (природный антиоксидант фенольной природы); жирные кислоты – лауриновая, миристиновая и пальмитиновая; 13 веществ углеводной природы – фруктоза, рибоза, галактоза, талоза, тагатоза, аллопираноза, левоглюкасан, глюकोпираноза, рибоновая кислота, сорбитол, глицерол и аминсахар – меглумин; также обнаружены фенилаланин, аланин, дециловый спирт, тетрадекан, триметил (индол) и мио-инозитол. В листьях амаранта обнаружено 51 соединение, среди которых 5 трикарбоновых кислот – янтарная, лимонная, фумаровая, яблочная и ацетопирувиновая; 6 фенолкарбоновых кислот – ванилиновая, бензойная, кофейная, феруловая и карболовая; 28 индивидуальных вещества, относящихся к моно- и дисахаридам и их производным – глюкоза, галактоза, манноза, фруктоза, треоза, тураноза, аллопираноза, сорбоза, гексапираноза, глюкофуранозид, арабинопираноза, эритрофураноза, эритрит, рибофураноза, талофураноза, ликсопираноза, глюкопираноза, галакопираноза, маннопираноза, фруктопираноза, сорбофураноза, тагатофураноза, лактоза, лактулоза, маннобиоза, сахароза, целлобиоза, глицеральдегид; 17 производных моносахаридов: метилированные спирты – метил гликозид и метилгалактозид; альдоновые кислоты – глюконовой кислоты лактон, глюконовая, ксилоновая, рибоновая, кетоглюконовая и гулоновая кислоты; уроновые кислоты – глюкуроновая, галактоуроновая; глюкаровая и галактаровая кислоты; сахароспирты – глицерин, рибит, пентатриол, бутантриол, инозит, а также мио-инозитол, пролин, валин, миристиновая кислота и фенилаланин. Таким образом, установлены различия компонентного состава водорастворимых метаболитов в листьях амаранта и актинидии. В листьях амаранта формируется состав моносахаридов с различной биологической активностью, это подтверждает данные, что С4 растения синтезирует значительно большее количество прежде всего углеводов и аминокислоту пролин, которые играют большую роль в стрессовых условиях засухи [2].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-516-00012.

Библиографические ссылки

1. Chaves M. M., Maroco J. P. and Pereira J.S. Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant // Functional Plant Biology. 2003. Vol. 30. P. 239–264.
2. Николаева М.К., Маевская С.Н., Воронин П.Ю. Реакция антиоксидантной и осмопротекторной систем проростков пшеницы на засуху // Физиол. раст. 2015. Т. 62. С. 314–321.

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ПЕРФТОРУГЛЕРОДОВ И ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА

Неверов К.В.¹, Прусов А.Н.², Киреев И.И.²

¹ *Институт биохимии им А.Н.Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия*

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

Фотодинамическая терапия (ФДТ), являясь перспективным способом лечения раковых опухолей, имеет существенное ограничение, т.к. содержание кислорода в строме опухоли снижено на два порядка величины. В процессе облучения опухоли после накопления фотосенсибилизатора (ФС) кислород быстро истощается, что замедляет генерацию активных форм кислорода и снижает эффективность ФДТ. Эта трудность может быть преодолена введением ФС в организм в составе искусственной газотранспортной системы, способной улучшить доступ кислорода к клеткам опухоли.

Нами была предложена композиция на базе ПерфторанаTM – «искусственной крови» – стабилизированной мелкодисперсной эмульсии перфторуглеродов в физрастворе. Этот препарат снижает уровень гипоксии в тканях при повреждении капиллярного русла, отеках и подобных случаях. В перфторановую эмульсию вводили ФС бактериохлоринового типа в конечной концентрации 0,03–0,1 мкМ. Было установлено, что в полученной композиции «Перфторан-фотосенсибилизатор» (ПФ-ФС) пигмент находится в мономерной, неагрегированной форме, что сохраняет его способность к фотогенерации активного синглетного кислорода с высоким квантовым выходом.

Фотодинамическая активность препарата ПФ-ФС была протестирована на клеточных культурах HeLa. Композиция добавлялась в чашки Петри с клеточным монослоем (соотношение ПФ-ФС со средой культивирования – 1:1), клетки инкубировались в течение 1 часа, затем облучались красным светом ($\lambda > 640$ нм, $I = 130$ мВт/см²), который хорошо поглощается ФС. Суммарная доза облучения составляла 80–500 Дж/см². Клетки фиксировались либо сразу после окончания облучения, либо через 16 ч постинкубации при 37⁰С. После этого клеточные монослои окрашивались DAPI с целью подсчета соотношения митозов, апоптозов и интерфазных состояний клеток в культуре.

После немедленной фиксации облученных клеток, инкубированных с ПФ-ФС, мы наблюдали увеличение доли апоптозных клеток и предапоптозных состояний. При фиксации клеток через 16 ч постинкубации в культурах, облученных большими дозами света, регистрировалось 20–30% апоптозов от общего числа клеток. Инкубация клеток с ПФ-ФС вызывала быстрое падение митотического индекса, пропорциональное суммарным дозам облучения. При быстрой фиксации клеток митотический индекс падал в 4–5 раз (60 мин облучения), после отдаленной фиксации митозов практически не наблюдалось, что говорит о полном подавлении клеточного деления в культуре.

ДНК-электрофорез образцов облученных культур, инкубированных с ПФ-ФС, подтвердил, что деградация ДНК происходит путем апоптоза, и эффект значительно усиливается для клеток, фиксированных через 16 ч постинкубации. Кроме того, нами было показано повреждение плазмалеммы и митохондриальных мембран у облученных клеток, что указывает на то, что ФС локализуется не только на внешней клеточной мембране, но и транспортируется в митохондрии.

Полученные данные свидетельствуют о высокой фотодинамической активности созданного нами препарата ПФ-ФС и демонстрируют отсутствие у него темнового токсического действия на клеточные культуры. Это делает возможным дальнейшее исследование ПФ-ФС на более сложных моделях с целью применения его в ФДТ.

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ХЛОРОФИЛЛ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ WSCP КЛАССА II: АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО РОДСТВА

Обухов Ю.Н.¹, Малеева Ю.В.², Неверов К.В.¹, Крицкий М.С.¹

¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
РАН, Москва, Россия,

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Водорастворимые хлорофилл (Хл)-связывающие белки (WSCP, water soluble chlorophyll-binding proteins) высших растений уникальны среди других хлорофилл-содержащих белков, поскольку формируют водорастворимые пигмент-белковые комплексы, связывающие до 4 молекул Хл *a* или Хл *b* [1]. Они не участвуют в фотосинтезе, но являются стресс-индуцируемыми. Белки WSCP класса II обладают КТI-мотивом и потенциально могут ингибировать некоторые протеазы [1, 2]. Подобно укладке Хл в реакционных центрах (РЦ) фотосинтеза, молекулы Хл в нативных тетрамерных комплексах WSCP организованы в виде димеров. При этом для Хл-белковых комплексов BoWSCP и LvWSCP установлена способность фотосенсибилизировать редокс-реакции *in vitro* как с участием молекулярного кислорода, так и без него [2]. Поэтому белки WSCP заманчивы для моделирования фотохимических событий в РЦ, в том числе, в контексте процессов ранней эволюции. При этом происхождение и разнообразие данного семейства изучено слабо.

С целью анализа разнообразия и филогенетического родства известных белков WSCP мы провели поиск гомологов белков WSCP подкласса IIa из *Brassica oleracea* (BoWSCP) и WSCP подкласса IIb из *Lepidium virginicum* (LvWSCP) в базе данных Uniprot (алгоритмом BLAST). По результатам поиска выбрали 23 наиболее сходных последовательности, которые затем сравнили методом множественного выравнивания (сервис EMBL-EBI Clustal Omega) и использовали для построения филогенетического дерева методом Maximum likelihood с помощью программы MEGA7.

Было установлено, что на филогенетическом дереве белки WSCP класса II формируют две обособленные друг от друга группы. В первой обнаруживаются белки WSCP подкласса IIb из *L. virginicum*, *B. rapa*, *B. juncea* и *Sinapis arvensis*, а во второй – белки WSCP подкласса IIa, выделенные из различных подвидов *B. oleracea*, *B. napus*, *B. nigra*, *Raphanus sativus* и *Arabidopsis thaliana*, ингибиторы протеаз (эндогенный ингибитор альфа-амилазы/субтилизина и белок 1, подобный ингибитору трипсина типа Кунитца из *Noccaea caerulea*) и индуцируемые при засухе белки (белок 22kDa из *R. sativus* и белок BnD22 из *B. napus*). Ветвь WSCP подкласса IIa выглядит более многочисленной и гетерогенной, чем ветвь подкласса IIb. Четкое разделение данных подклассов, выведенных в прошлом на основе различий их физических свойств, указывает на существование у них определенной структурной и функциональной дифференциации, а разная консервативность отражает уровень специализации. Белки подкласса IIb менее специфичны, например, LvWSCP связывает как Хл *a*, так и Хл *b*, а BoWSCP — только Хл *a*. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что белки подкласса IIa дивергировали активнее, чем подкласса IIb. Возможно, этим можно объяснить более высокую фотокаталитическую активность белка BoWSCP по сравнению с LvWSCP.

Библиографические ссылки

1. Horigome D., Satoh H., Itoh N. et al. Structural Mechanism and Photoprotective Function of Water-soluble Chlorophyll-binding Protein // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282. P. 6525–6531.
2. Малеева Ю.В., Неверов К.В., Обухов Ю.Н., Крицкий М.С. Водорастворимые хлорофиллсвязывающие белки растений // Молек. биол. 2019. Т. 53. С. 998-1011.

АКТИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ГРИБОМ *BIPOLARIS SOROKINIANA*, В УСЛОВИЯХ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ГИПЕРТЕРМИИ

Пашкевич Л.В., Абрамчик Л.М., Кабашникова Л.Ф.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Известно, что активность аппарата фотосинтеза, а также его структурные характеристики могут быть использованы в качестве индикатора структурно-функционального состояния растений в неблагоприятных условиях [1].

Тепловую обработку (тепловой шок, ТШ) растений ячменя сорта Магутны проводили в 5-дневном возрасте в течение 3 ч при 40°C. Затем проводили инокуляцию 5-дневных зеленых проростков ячменя спорами гриба *B. sorokiniana* путем опрыскивания (10^6 спор/мл). Оценку структурно-функциональных параметров фотосинтетического аппарата осуществляли на 3 сутки после действия кратковременной гипертермии и инфицирования спорами. Содержание фотосинтетических пигментов определяли спектрофотометрически [2]. Состояние фотосистем (ФС) фотосинтеза оценивали по спектрам флуоресценции хлорофилла (Хл) в проростках ячменя при комнатной температуре на флуориметре «Solar CM2203» (Беларусь) [3]. Флуоресцентные параметры ФС2 измеряли на РАМ-флуориметре «Teaching-РАМ» («Walz», Германия) по [4].

Установлено, что содержание фотосинтетических пигментов в результате грибного заражения и после ТШ не снижалось по сравнению с контролем. При этом прослеживалась небольшая тенденция к увеличению содержания Хл ($a+b$) и каротиноидов (на 7 и 9 %, соответственно) в зеленых проростках через 3 суток после действия ТШ, что, по-видимому, связано с развитием адаптивных процессов в растениях ячменя под действием повышенной температуры. Анализ спектров флуоресценции Хл в листьях ячменя выявил негативное действие патогена *B. sorokiniana*, ТШ и их сочетания на структурное состояние двух ФС фотосинтеза, о чем свидетельствует снижение уровня интенсивности флуоресценции Хл, как в коротковолновой, обусловленной свечением светособирающего хлорофилл-белкового комплекса антенны ФС2, так и в длинноволновой области спектра (ФС 1) по сравнению с контролем. При изучении кратковременного действия на проростки ТШ методом РАМ-флуориметрии не обнаружено негативное влияние этого стресс-фактора на функциональное состояние ФС2. Заражение проростков грибом *B. sorokiniana* негативно сказалось на функционировании светособирающей антенны ФС2, о чем свидетельствует снижение на 18% уровня базовой флуоресценции Хл a (F_0) и на 9% – максимальной флуоресценции (F_m). При этом 3-дневный инфекционный процесс в растительных тканях не приводил к снижению потенциального квантового выхода фотохимических реакций ФС2 (F_v/F_m), отражающего эффективность разделения зарядов в реакционном центре ФС2, что согласуется с данными по содержанию пластидных пигментов в зараженных растениях и характеризует стратегию патогена, направленную на более длительное сохранение биотрофных взаимоотношений с растением-хозяином. После термообработки через 3-е суток инфицирования параметры индукции флуоресценции Хл a в листьях ячменя оставались на уровне контроля, что может косвенно отражать протекание кросс-адаптационных процессов в зараженных растениях после кратковременного ТШ.

Библиографические ссылки

1. Кабашникова Л. Ф. Фотосинтетический аппарат и стресс у растений. Минск: «Бел. наука», 2014. 276 с.
2. Шлык А.А. Биохимические методы в физиологии растений. Москва: «Наука», 1971. С. 154-170.
3. Ладыгин В.Г. Влияние корневой гипоксии // Физиология растений. 2004. Т. 1. С. 65-76.
4. Krause H., Weis W. Chlorophyll Fluorescence // Ann. Rev. of Plant Physiology. 1991. Vol. 42. P. 313-349.

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE* L.) ПРИ ЗАРАЖЕНИИ *BIPOLARIS SOROKINIANA* НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ БИОГЕНЕЗА ХЛОРОПЛАСТОВ

Пашкевич Л.В., Довбнюк Ю.Н., Мартысюк А.В., Шпилевский С.Н., Савченко Г.Е.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

При изучении молекулярных механизмов иммунного ответа растений на инфицирование особый интерес вызывает проблема взаимодействия хлоропластов с про- и антиоксидантными системами и, в частности, роль в этом процессе структурно-функционального состояния пластид. В настоящей работе исследовали изменение содержания фотосинтетических пигментов и уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), измеренного по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, в первом листе развивающихся в течение 12 сут при нормальном светопериоде проростков ярового ячменя сорта Магутны, а также в зеленеющих 6 и 24 ч этиолированных растениях (6- и 7-дневные в момент анализа). Зеленые растения разного возраста заражали спорами гриба *Bipolaris sorokiniana* Sacc. (Shoem.) на свету, а 5-дневные этиолированные – в темноте в течение суток, после чего их освещали.

Обнаружены различия в кинетике накопления хлорофилловых (Хл) пигментов в здоровых и инфицированных проростках: снижение скорости накопления пигментов и их предельного уровня при заражении. На всех исследованных стадиях развития зеленых проростков уровень активности ПОЛ при грибном заражении был несколько ниже, чем в контроле. Наибольшие различия между контрольным и опытным вариантами обнаружены в молодых проростках (более 30%).

В деэтиолированных проростках обнаружена тенденция к увеличению содержания Хл ($a+b$) после заражения при непродолжительном освещении (6 ч) в основном за счет Хл a , что может указывать на разную скорость формирования светособирающей антенны, отразившуюся на величине отношения Хл a / Хл b (3,99 и 4,64 в контрольном и опытном варианте, соответственно). При дальнейшем зеленении (24 ч освещения) содержание Хл ($a+b$) в листьях контрольных и зараженных растений увеличивалось, соответственно, в 4 и 3 раза по сравнению с зеленевшими более короткое время. В деэтиолированных проростках уровень активности ПОЛ был достоверно ниже наблюдавшегося в зеленых проростках аналогичного возраста, как в контрольном варианте, так и после заражения (снижение в 1,59 и 1,98 раза в 6- и 7-дневных проростках, соответственно). При этом в листьях деэтиолированных проростков обнаружено более высокое содержание полифенолов по сравнению с зелеными.

Исследование корреляционных связей между изменением содержания Хл ($a+b$) в развивающихся на свету хлоропластах и содержания малонового диальдегида, характеризующего активность ПОЛ, позволило выявить тесную положительную корреляцию ($r=0,83$) между обоими параметрами. Такой высокий коэффициент корреляции означает, что более низкому содержанию пигментов в определенных условиях должен соответствовать более низкий уровень активности ПОЛ (и наоборот). Аналогичную направленность изменений обоих параметров наблюдали ранее и в листьях некоторых древесных растений при осенней деградации пигментов. Это может указывать на достаточно строгий контроль интенсивности окислительных свободно-радикальных процессов в ходе развития хлоропластов (вне зависимости от заражения в наших экспериментах) и в ходе их естественного старения.

ВЛИЯНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО НА ПРОДУКТИВНОСТЬ И ПИГМЕНТНЫЙ СОСТАВ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

Печенкина Е.И., Самович Т.В., Козел Н.В.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Микроводоросль *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) является одним из наиболее перспективных натуральных источников каротиноида астаксантина – пигмента, широко используемого в пищевой, фармакологической промышленности, сельском хозяйстве, а также в косметологии благодаря его чрезвычайно высокой антиоксидантной активности, которая превышает таковую β -каротина и витамина Е. В клетках *H. pluvialis* содержание астаксантина достигает 3–5 % от сухой массы водоросли. Химически синтезированный астаксантин, представляющий смесь из трех стереоизомеров, обладает меньшей биоактивностью, чем натуральный пигмент. Значительно возросший в последние годы интерес к *H. pluvialis* связан с его промышленным производством, поиском способов увеличения общей продуктивности и выхода астаксантина, а также с желанием познать природу механизмов, контролирующих эти процессы. Способность красителей-фотосенсибилизаторов, в частности, ксантенового красителя бенгальского розового (БР), генерировать на свету активные формы кислорода была нами использована для создания условий накопления в клетках *H. pluvialis* астаксантина.

Объектом исследований служила альгологически чистая культура одноклеточной зеленой жгутиковой водоросли *H. pluvialis*, штамм IBCE Н-17 из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Культуру выращивали в чашках Петри с твердой питательной средой ВВМ и подрачивали в среде Рудика. Клетки *H. pluvialis* подсчитывали при помощи камеры Горяева. Продуктивность *H. pluvialis* определяли по изменению биомассы, которую оценивали по поглощению и светорассеянию суспензий водоросли в красной и инфракрасной областях спектра при 680 и 750 нм на спектрофотометре Solar PB-2201 (Беларусь). Количество фотосинтетических пигментов и астаксантина в клетках *H. pluvialis* определяли методом ВЭЖХ с помощью хроматографа высокого давления Shimadzu Prominence LC 20 (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (Германия) и спектрофотометрического детектора с диодной матрицей Shimadzu SPD-M20A (Япония).

При использовании фотосенсибилизатора БР в малых концентрациях – 0,25–0,5 мкМ в среде инкубации, в качестве дополнительного индуктора каротиногенеза на свету высокой интенсивности выявлено увеличение сухого веса гематококка, а также количества клеток в суспензии по сравнению с действием на клетки водоросли только света высокой интенсивности. Наблюдаемые приросты сухого веса и количества клеток существенны и достигают 41 и 56 % превышения над контролем соответственно. Использование малых концентраций фотосенсибилизатора на фоне действия света высокой интенсивности также приводит в таких условиях к увеличению более чем на 20% продукции клетками *H. pluvialis* астаксантина на фоне снижения количества фотосинтетических пигментов хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов неоксантина, виолаксантина, лютеина и β -каротина по сравнению с действием только света высокой интенсивности.

Мы предполагаем, что увеличение сухого веса, количества клеток гематококка, а также выхода астаксантина при добавлении в среду инкубации *H. pluvialis* фотосенсибилизатора БР на фоне действия света высокой интенсивности связано с сигнальными свойствами синглетного кислорода, который может являться первичным агентом в трансдукции сигнала, запускающего повышенный синтез в клетках *H. pluvialis* астаксантина.

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ОБРАБОТКИ НА ПОТОКИ ЭЛЕКТРОНОВ И ПЕРЕХОДНЫЕ СОСТОЯНИЯ В ХЛОРОПЛАСТАХ ЯЧМЕНЯ

Пшибытко Н.Л.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

В фотосинтетическом аппарате существует сложная система регуляции протекания фотосинтетических реакции, препятствующая развитию свободно-радикальных процессов и повреждению тилакоидных мембран. Наиболее ярко данные механизмы проявляются при переходе фотосинтетического аппарата от состояния полной адаптации к темноте (состояние 1) к состоянию адаптации к свету (состояние 2). При освещении адаптированных к темноте хлоропластов, в которых реакционные центры фотосистем (ФС) «открыты», энергия электронного возбуждения поглотивших кванты света молекул пигментов-светосборщиков передается в реакционный центр ФС2, где происходит разделение заряда и поглотивший два электрона пластохинон присоединяет два протона, отделяется от пигмент-белкового комплекса ФС2 и может диффундировать в липидном бислое к цитохром b_6/f комплексу. Параллельно в ФС1 происходит фотоиндуцированное разделение зарядов в реакционном центре, окисление пластоцианина, восстановление ферредоксина. Координация работы двух фотосистем осуществляется через фосфорилирование светособающего комплекса ФС2, приводящее к перераспределению энергии электронного возбуждения между фотосистемами, что может играть ключевую роль в адаптации фотосинтетического аппарата к стрессовым условиям.

Целью данной работы являлось исследование потоков электронов в хлоропластах и механизмов их регуляции при умеренном тепловом воздействии (3 часа, 40°C).

С использованием метода РАМ-флуориметрии оценена эффективность функционирования переносчиков электронов в тилакоидных мембранах необработанных и подвергшимся тепловому воздействию 7-дневных проростков ячменя. Продemonстрировано отсутствие нарушений протекания первичных фотохимических реакции в реакционном центре ФС 2 в результате высокотемпературной обработки. Исследованы переходные состояния темнота-свет в хлоропластах после теплового воздействия. Выявлены термоиндуцированные изменения протекания линейного и циклического транспорта электронов в хлоропластах. При сравнении кинетик флуоресценции хлорофилла a контрольных и прогретых проростков ячменя обнаружен более интенсивный отток электронов на акцепторной стороне ФС1 в прогретых проростках по сравнению с контрольными растениями. Анализ световых кривых тушения флуоресценции хлорофилла a показал ускорение светоиндуцированного перехода фотосинтетического аппарата из неактивного состояния в активное, процесса ацидофикации люмена в первые секунды освещения актиничным светом и более быструю активацию темновой стадии фотосинтеза в термообработанных растениях по сравнению с контрольными. Показана активация НАД(Ф)Н-зависимого электронного потока после воздействия повышенных температур.

Полученные данные указывают на регуляторную роль ΔpH тилакоидных мембран в распределении потоков электронов и адаптации фотосинтетического аппарата к стрессовым воздействиям через активацию циклического транспорта электронов, что происходит, как известно, для поддержания корректного отношения НАД(Ф)Н/АТФ и предотвращения перевосстановления стромальных носителей.

НАДМОЛЕКУЛЯРНЫЙ КОМПЛЕКС ХЛОРОФИЛЛ-СИНТЕТАЗА : НАДФН-ПРОТОХЛОРОФИЛЛИД-ОКСИДОРЕДУКТАЗА В ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ И СЕМЯДОЛЯХ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Рассадина В.В.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Анализ кинетики этерификации хлорофиллида (Хд) в кратковременно освещенных этиолированных листьях ячменя позволил предположить наличие в проламеллярных телах этиопластов надмолекулярных комплексов, образованных предзагруженной геранилгераниолом хлорофилл-синтеазой и связанной с протохлорофиллидом (Пд) НАДФН-Пд-оксидоредуктазой (ПОР) в соотношении 1 : 7 [1]. Было показано также, что стехиометрический состав мультиферментного комплекса практически не зависит от степени дифференцировки этиопластов. Так, кинетика этерификации Хд в нижней слабопигментированной части этиолированного листа – «меристеме», содержащей пропластиды со слабо развитой системой внутренних мембран и низким содержанием Пд (в 50 раз ниже, чем в этиопластах верхней части листа), была такой же, как и в средней и верхней частях листа, в которых присутствуют «зрелые» этиопласты с высоким содержанием Пд и развитой системой проламеллярных тел и протилакоидов.

Для выяснения, насколько универсально обнаруженное для этиолированных листьев ячменя соотношение между Пд – НАДФН – ПОР и хлорофилл-синтеазой изучали кинетику этерификации Хд в этиолированных листьях пшеницы, а также семядолях подсолнечника, используя растения дикого типа и мутантные растения, характеризующиеся хлорофилл-дефицитностью – АНК-32А и АНК-32В, (*Triticum aestivum* L.), маркированные аллелями *cn-A1* и *cn-D1*; *en-chlorina-5* (*Helianthus annuus* L.), соответственно.

Фотопревращение Пд в этиолированных образцах осуществляли с помощью электронной фотовспышки (120 Дж, длительностью 2 мс), далее растения оставляли в темноте на различные периоды времени для протекания реакции этерификации образованного Хд. Количество пигментов определяли *in vitro* спектрофотометрическим способом (Uviscon, Германия).

Было обнаружено, что во всех изученных объектах кинетические кривые этерификации Хд напоминают кинетику этого процесса в кратковременно освещенных этиолированных листьях ячменя [1]. Во всех линиях пшеницы в быстрой фазе (30–60 с после вспышки) этерифицируется около 12% Хд от общего содержания пигмента, образованного при фотовосстановлении Пд. Длительность лаг-фазы, разделяющей быструю и медленную фазы процесса, составляет около 1,5–2 мин, а этерификация оставшейся части Хд осуществляется в течение последующих 25–35 мин.

В семядолях подсолнечника кинетика этерификации Хд имеет такой же вид, как и в листьях ячменя и пшеницы, с той разницей, что лаг-фаза, разделяющая быструю и медленную части кинетической кривой длиннее (5–6 мин), а скорость этерификации в основной фазе ниже по сравнению с этим показателем в листьях.

Мутации *cn-A1* и *cn-D1*, *en-chlorina-5*, приводящие к фенотипу *chlorina* растений пшеницы и подсолнечника, не оказали влияния на кинетику образования хлорофилла в освещенных вспышкой этиолированных листьях и семядолях, соответственно.

Библиографические ссылки

1. Domanskii V, Rassadina V, Gus-Mayer S, Wanner G, Schoch S, Ruediger W. Characterization of two phases of chlorophyll formation during greening of etiolated barley leaves // *Planta*. 2003. Vol. 216. P. 475–483.

НАКОПЛЕНИЕ АСТАКСАНТИНА В КЛЕТКАХ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*, ИНДУЦИРОВАННОЕ ДЕФИЦИТОМ АЗОТА И СВЕТОМ ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

**Самович Т.В., Гончарик Р.Г., Печенкина Е.И., Вязов Е.В., Мананкина Е.Е.,
Козел Н.В.**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Зеленая одноклеточная микроводоросль *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) является одним из наиболее перспективных источников кетакаротиноида астаксантина, накопление которого в клетках водоросли происходит при попадании их в неблагоприятные для роста условия: свет высокой интенсивности, дефицит элементов минерального питания, высокая температура и др. [1]. В ряде работ показано, что свет высокой интенсивности в сочетании с азотным голоданием вызывают существенное увеличение содержания астаксантина в клетках *H. pluvialis* [1–2]. Однако во всех подобных исследованиях азотное голодание инициировали на стадии активного роста культуры [1–2]. Более эффективной является индукция каротиногенеза светом высокой интенсивности в клетках водоросли, переходящих в неподвижное состояние (стадия покоя). В дополнение к действию света высокой интенсивности мы инициировали азотную недостаточность. В работе использовали культуру одноклеточной зеленой жгутиковой водоросли *H. pluvialis*, штамм IBCE Н-17, из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [3]. Клетки гематококка выращивали на среде Рудика в накопительном режиме при освещении 1500 лк. Через 7 сут выращивания суспензию гематококка, содержащую около 80 % неподвижных клеток, использовали в экспериментах. При этом часть клеток переводили на свежую среду Рудика, другую – на среду Рудика без азота и культивировали оба варианта при нормальном освещении (1500 лк) и освещении высокой интенсивности (10000 лк).

Установлено, что через 21 сутки эксперимента количество клеток в суспензии снижалось во всех вариантах. Более значительное снижение отмечено в вариантах на полной среде Рудика вне зависимости от интенсивности освещения. В этих же вариантах наблюдали увеличение диаметра клеток, что является признаком стрессового состояния клеток водоросли. В вариантах на среде Рудика без азота количество клеток несколько снижалось, но диаметр не изменялся, по сравнению с начальным значением. В исходной культуре (начало эксперимента) были зарегистрированы следовые количества астаксантина. Однако после 21 суток культивирования в вариантах на полной среде Рудика как на ярком свете (10 000 лк), так и при нормальном освещении (1500 лк) выявлено значительное накопление астаксантина в клетках *H. pluvialis*. В вариантах опыта, полностью лишенных азота, содержание астаксантина было существенно ниже (более чем в 5 раз) по сравнению с вариантами на полной среде Рудика независимо от интенсивности освещения.

Таким образом, инициированная на стадии покоя *H. pluvialis* азотная недостаточность в сочетании со светом высокой интенсивности, не является эффективным стрессовым фактором для индукции накопления астаксантина в клетках водоросли.

Библиографические ссылки

1. Dong Q. et. al. Concomitant NH_4^+ Secretion during astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis* under high irradiance and nitrogen deficient conditions // Chinese Journal of Chemical Engineering. 2007. Vol. 15. P. 162–166.
2. Scibilia L. et. al. Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis* // Algal Research. 2015. Vol. 12. P. 170–181.
3. Мельников С.С. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / С.С. Мельников [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2011. 101 с.

АДАПТОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ РАЦЕТАМОВ НА РОСТ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

Степанов С.С., Полищук А.В.

Институт ботаники им. М. Холодного НАН Украины, Киев, Украина

Рацематы – группа синтетических препаратов, способных повышать неспецифическую сопротивляемость организма к широкому спектру вредных воздействий. Основным представителем этой группы является пирацетам – производное гамма-аминомасляной кислоты. К настоящему времени синтезирован целый ряд его непосредственных аналогов и гомологов (оксирацетам, аниацетам и др.), подобных ему по действию, однако пирацетам продолжает оставаться основным препаратом этой группы [1]. При введении в организм проникает в различные органы и ткани, где практически не метаболизируется. Механизм действия препарата окончательно не ясен. Вероятно, пирацетам оказывает положительное влияние на обменные процессы и стимулирует окислительно-восстановительные реакции, усиливает утилизацию глюкозы. Препарат увеличивает энергетический потенциал организма за счет ускорения оборота АТФ, повышения активности аденилатциклазы и угнетение нуклеотидфосфатазы. Улучшение энергетических процессов под влиянием пирацетама приводит к повышению устойчивости тканей при гипоксии и токсических воздействиях. С целью поиска эффективных биостимуляторов растительных организмов в работе исследовалось действие пирацетама на рост накопительной культуры *Chlamydomonas reinhardtii* при миксотрофном культивировании в присутствии ацетата в качестве дополнительного источника углерода, а также влияние пирацетама на способность клеток микроводорослей адаптироваться к стрессам.

Показано, что при концентрации 0,2 мг / мл пирацетама в среде культивирования скорость экспоненциального роста культуры не отличается от контроля без добавления пирацетама. Но в контроле экспоненциальный рост заканчивается раньше на сутки. В концентрации 0,4 мг / мл пирацетам приводил к увеличению скорости экспоненциального роста культуры на 14%, в связи с чем на 10 сутки культивирования концентрация клеток возрастала на 65% в сравнении с контролем. Увеличение содержания пирацетама в среде культивирования до 0,8 мг / мл не сопровождалось дальнейшим стимулированием роста *C. reinhardtii*.

Функциональное состояние фотосинтетического аппарата определяли по параметрам кривой индукции флуоресценции хлорофилла на флуориметре ХЕ-РАМ (Walz, Германия). Пирацетам улучшал эффективность фотосинтеза, о чем свидетельствует повышение скорости выделения O_2 при освещении и стимуляция роста *C. reinhardtii*. При наличии пирацетама в среде культивирования увеличивался qP и уменьшался NPQ на 6% и на 54% соответственно, тогда как F_v/F_m не менялся по сравнению с контролем.

В условиях стресса, индуцированного токсичными концентрациями тяжелых металлов (меди и цинка), пирацетам стимулировал рост и улучшал физиологическое состояние миксотрофных культур *C. reinhardtii*. Результаты работы позволяют рекомендовать пирацетам в концентрации 0,4 мг/мл в качестве стимулятора роста и адаптогена для *Chlamydomonas reinhardtii*.

Библиографические ссылки

1. Malykh, A. G., & Sadaie, M. R. Piracetam and piracetam-like drugs // Drugs. 2010. Vol. 70. P. 287-312.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ СТРОМАЛЬНЫХ КАРБОАНГИДРАЗ ХЛОРОПЛАСТОВ ШПИНАТА

Топчий Н.Н.¹, Полищук А.В.¹, Сытник С.К.²

¹Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев, Украина

²Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев, Украина

Карбоангидраза (КА, карбонатгидролиаза КФ 4.2.1.1) – один из самых распространенных металлоферментов, катализирующий обратимую гидратацию CO_2 в живых организмах от прокариот до человека. У высших растений КА представлена тремя семействами (α -КА, β -КА, γ -КА), каждое из которых включает множественные изоформы [1], что свидетельствует об их независимом эволюционном происхождении.

У *Arabidopsis* идентифицировано не менее 17 генов, кодирующих α -, β - и γ - КА, однако клеточная локализация некоторых изоформ остается неизвестной [1]. В хлоропластах, кроме большого количества β -карбоангидразы 1 (β -КА1) и значительно меньшем содержании α -КА1 в стромальном компартменте, выявлено β -КА5 и α -КА4 в тилакоидных мембранах. Показано присутствие КА в пигмент-белковом комплексе ФСII, вблизи комплекса ФСI и в люменальном пространстве тилакоидов. β -КА1 обычно представляют собой олигомеры, состоящие из 2–8 мономеров по 25–30 кДа. Кроме того, сообщалось [2] о формировании крупных гетероолигомеров КА и ферментов цикла Кальвина, включающих РБФ-карбоксилазу.

В разных биологических объектах активность КА эффективно подавляется ионами тяжелых металлов (ТМ) [3], однако их влияние на растительные КА до настоящего времени мало изучено. Целью настоящей работы было исследование влияния ионов тяжелых металлов (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+) на активность различных форм стромальных КА. Для достижения этой цели были получены целые хлоропласты, после осмотического разрушения которых фракция стромы отделялась от фракции тилакоидных мембран.

Целостность хлоропластов оценивали по уровню КА активности водных фракций, полученных после осаждения хлоропластов и их последовательных промывок. КА активность определяли методом инфракрасного газового анализа (ИКГА) по скорости выделения CO_2 до и после разрушения хлоропластов. Фракции растворимых белков разделяли с помощью нативного электрофореза в камере Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-RAD). Визуализацию КА в гелях осуществляли по методу Эдвардса и Петтона [4].

На ПААГ изолированной стромальной фракции хлоропластов проявлялись 4 зоны КА активности, которые отвечали высоко- и низкомолекулярным белкам и меняли окраску в растворе бромтимолового синего в условиях насыщения CO_2 . Эти зоны имели разную энзиматическую активность, о чем свидетельствовала неодновременность визуализации полос: последней окрашивалась наиболее высокомолекулярная фракция. КА активность белковых зон в геле по-разному изменялась после обработки препаратов стромы растворами солей ТМ. По данным ИКГА все изученные ТМ подавляли КА активность стромальной фракции, но очень различались по эффективности ингибирования. Для 50% ингибирования КА было достаточно 200–300 нМ Ag^+ , тогда как I_{50} для Cu^{2+} составляла 3 мкМ, для Cd^{2+} – 35 мкМ, а для Zn^{2+} – более 80 мкМ.

Библиографические ссылки

1. DiMario R.J., Clayton H., Mukherjee A., Ludwig M. Moroney Plant Carbonic Anhydrases: Structures, Locations and Physiological Roles // Mol. Plant. 2017. Vol. 10. P. 30–46.
2. Jebanathirajah J.A. et al. Association of Carbonic Anhydrase // Planta. 1998. Vol. 204. P. 177–182.
3. Lionetto M.G., Caricato R., Giordano M.E., Schettino T. The complex relationship between metals and carbonic anhydrase // Int. J. Mol. Sci. 2016. Vol. 17. P. 1–14.
4. Edwards L.J., Patton R.L. Visualization of carbonic anhydrase activity in polyacrylamide gels // Stain Technol. 1966. Vol. 41. P. 333–334.

ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ЭКОТИПОВ *A. thaliana* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ КАДМИЯ

Топчий Н.Н., Шевченко Г.В.

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев, Украина

Зона отчуждения Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС) остается одним из самых загрязненных регионов в мире, где на разнообразную флору, от водорослей до деревьев, хронически воздействует радиация и тяжелые металлы в почве. В то же время, снижение антропогенной нагрузки в зоне способствовало развитию и распространению многих видов, включая редкие, что свидетельствует о широком адаптационном потенциале [1]. Таким образом, сегодня зона ЧАЭС является одним из естественных полигонов, который предоставляет широкие возможности для исследования адаптации растений к различным поллютантам.

Целью настоящей работы было изучение влияния ионов кадмия, Cd^{2+} , как одного из основных и опасных загрязнителей окружающей среды, на фотосинтетические характеристики листьев *A. thaliana* разных экотипов, а именно, собранных в зоне (Chernobyl-07), лабораторного контроля (Columbia-0) и контроля дикого типа (Oasis), собранного вне зоны. Также исследовали восстановление функционирования фотосинтетического аппарата (ФСА) после устранения негативного воздействия ионов Cd^{2+} . Экотип *A. thaliana* (Chernobyl-07) из зоны представлял собой линию, характеризующуюся стойкостью роста корней к воздействию ионов Cd^{2+} (50-100 мкМ) [2]. Функциональное состояние ФСА экотипов *A. thaliana* оценивали методом индукции флуоресценции хлорофилла на ХЕ-РАМ флуориметре ("Walz" Германия), используя общепринятые параметры флуоресценции [3]. Величины максимального (F_v/F_m) и реального (F'_v/F'_m) квантовых выходов фотохимических реакций в фотосистеме II (ФСII), фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (qP) и квантового выхода электронного транспорта ($\phi\text{ФСII}$) в разной степени снижались у всех экотипов при действии 100 мкМ Cd^{2+} в питательной среде. Самые низкие уровни параметров F_v/F_m , F'_v/F'_m , $\phi\text{ФСII}$ и qP , а также высокие значения нефотохимического тушения (qN), характеризующего степень диссипации избыточной световой энергии, отмечались у чувствительного к ионам Cd^{2+} экотипа Oasis. После устранения негативного воздействия кадмия фотохимические параметры (F'_v/F'_m , $\phi\text{ФСII}$, qP) экотипов Columbia-0 и Chernobyl-07 восстанавливались почти до контрольных уровней, тогда как у растений экотипа Oasis восстановления фотосинтетической активности не происходило.

Таким образом, ФСА трех исследуемых экотипов *A. thaliana* в разной степени реагировал на токсическое действие ионов Cd^{2+} и восстанавливал функциональные параметры после стресса. Сравнение показало, что растения, которые росли в зоне радиационного загрязнения (Chernobyl-07), оказались наиболее устойчивыми среди всех исследованных экологических линий. Более высокая толерантность экотипа Chernobyl-07 к ионам Cd^{2+} может быть следствием адаптации растений к хроническому действию ионизирующего излучения и формирования в их клетках неспецифических механизмов защиты от оксидативного стресса.

Библиографические ссылки

1. Kovalchuk I., Abramov V., Pogribny I., Kovalchuk O. Molecular Aspects of Plant Adaptation to Life in the Chernobyl Zone // Plant Physiol. 2004. Vol. 135. P. 357–363.
2. Шевченко Г.В., Талалаев А.С., Дудан Дж. Синтез полифункциональных сульфопроизводных полиэдральных силсесквиоксенов // Доповіді НАН України. 2012. Vol. 12. С. 156–161.
3. van Kooten O., Snel J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology // Photosynthesis Research. 1990. Vol. 25. P. 147–150.

КОМПЛЕКСНОЕ ВЛИЯНИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

Тюлькова Е.Г.

УО «Белорусский торгово-экономический университет потребительской кооперации»,
Гомель, Беларусь

Выбросы промышленных предприятий характеризуются наличием не одного техногенного элемента или соединения, а целого их спектра, иногда довольно значительного. Вследствие этого загрязнители могут оказывать воздействие на растения в виде различных смесей, действие которых изучено недостаточно в отличие от одиночного влияния загрязнителей, в том числе летучих органических [1–2]. Целью работы явилась оценка комплексного влияния бутилацетата и о-ксилола на изменение содержания хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в листьях наиболее распространенных древесных растений городской среды.

Объектом исследований явились саженцы березы повислой *Betula pendula* Roth., клена остролистного *Acer platanoides* L., тополя пирамидального *Populus pyramidalis* Roz., липы мелколистной *Tilia cordata* Mill. Для выявления эффектов совместного воздействия использовали смесь следующих концентраций: 0,01 мкг/мл бутилацетата + 0,02 мкг/мл о-ксилола; 0,02 мкг/мл бутилацетата + 0,04 мкг/мл о-ксилола. Содержание пигментов фотосинтеза определяли через одни и три суток после обработки по общеизвестным формулам с учетом использования 99,5%-ного ацетона для экстракции пигментов.

В результате получено, что клен остролистный и липа мелколистная характеризовались как виды, у которых происходило усиление токсического эффекта воздействия бутилацетата и о-ксилола на содержание пигментов при их совместном использовании. Исключением в случае липы мелколистной явился вариант снижения действия бутилацетата в присутствии о-ксилола через три суток и ослабление влияния о-ксилола при наличии бутилацетата на раннем сроке при минимальной дозе смеси.

При обработке листовых пластинок саженцев березы повислой наблюдалось повышение токсического эффекта бутилацетата в присутствии о-ксилола при их совместном использовании, за исключением содержания хлорофилла *a* и каротиноидов через одни сутки при минимальной концентрации смеси, и снижение токсичности о-ксилола при наличии бутилацетата. У тополя пирамидального, как у березы повислой, наблюдалось уменьшение токсичности о-ксилола при совместной обработке с бутилацетатом, тогда как растворы о-ксилола в зависимости от дозы и периода эксперимента явились причиной различных изменений в степени токсичности бутилацетата. Это выражалось в росте негативного воздействия на содержание хлорофилла *b* на всех этапах, а также хлорофилла *a* и каротиноидов при максимальной концентрации смеси через одни сутки; в остальных вариантах о-ксилол снижал отрицательное влияние бутилацетата.

Библиографические ссылки

1. Singh, R. Photomodified fluoranthene exerts more harmful effects as compared to intact fluoranthene by inhibiting growth and photosynthetic processes in wheat / R. Singh, T.A. Jajoo // *Ecotoxicology and Environ. Safety*. 2015. Vol. 122. P. 31–36.
2. Uptake and phytotoxicity of anthracene and benzo[k]fluoranthene applied to the leaves of celery plants (*Apium graveolens* var. *secalinum* L.) / J. Wiczorek [et al.] // *Ecotoxicology and Environ. Safety*. 2015. Vol. 115. P. 19–25.

ВЛИЯНИЕ СВЕТА ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* ДИКОГО ТИПА, *PHYA* И *PHYB* МУТАНТОВ

**Худякова А.Ю., Строкина В.В., Ширшикова Г.Н., Кособрюхов А.А.,
Креславский В.Д.**

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Россия

Дефицит фитохромов оказывает значительное влияние на фотосинтетические параметры в стрессовых условиях [1]. Однако роль дефицита отдельных фитохромов (Фх), в частности ключевых ФхА и ФхВ, при действии стрессовых факторов на фотосинтез недостаточно изучена.

Исследовано влияние света высокой интенсивности (СВИ, 4 ч, 1000 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) на скорость фотосинтеза, активность фотосистемы 2 (ФС2) и содержание фотосинтетических пигментов в листьях растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа (ДТ) (экотип Landsberg erecta), мутантов *phyB* и *phyA*, дефицитных по фитохромам А и В, соответственно. Растения выращивали 25 дней при 12 ч фотопериоде под белыми флуоресцентными лампами ($I = 130$ мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) (БС) или под красными светодиодами (КС), чтобы создать условия, когда криптохромы неактивны.

Облучение СВИ приводило к снижению скорости фотосинтеза (P_n), наибольшему у *phyB* мутанта – более чем в два раза как на КС, так и на БС, тогда как у ДТ и *phyA* мутанта при этих же условиях снижение составляло 20–45%.

Показано, что СВИ заметно увеличивал содержание фотосинтетических пигментов. У растений, выращенных на БС, повышение было примерно одинаково во всех вариантах. У растений КС исходное содержание Хл *a*, Хл *b* и каротиноидов было ниже у *phyB* мутанта, чем у ДТ (65–70% от ДТ). Однако увеличение содержания пигментов под действием СВИ было больше у *phyB* мутанта (более 70%), чем у ДТ (около 40%). Показатели *phyA* мутанта были близки к ДТ.

Обработка СВИ снижала максимальный квантовый выход ФС2 (F_v/F_m), индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}) и отношение F_v/F_0 . Однако не было обнаружено заметной разницы в величине снижения между ДТ и мутантами как на БС, так и на КС. PI_{ABS} у КС растений снижался в 4 раза у ДТ и мутантов. При этом разница в активности ФС2 проявлялась в исходных образцах растений КС только между ДТ и *phyB* мутантом. Так, величина F_v/F_m у ДТ была $0,76 \pm 0,01$, у *phyB* – $0,70 \pm 0,015$, что может быть отчасти обусловлено низким уровнем каротиноидов у мутанта до облучения.

Скорость фотосинтеза определяется как поступлением в цикл Кальвина-Бенсона восстановительных эквивалентов и АТФ за счет первичных световых процессов фотосинтеза, так и степенью открытости устьиц, скоростью поступления CO_2 к местам ассимиляции. Дефицит фитохромов может снижать проводимость и плотность устьиц [2], что, вероятно, обуславливает разницу в величине P_n между ДТ и мутантом с дефицитом ФхВ, который по нашим данным является определяющим в устойчивости ФА к СВИ.

Работа была поддержана грантом РФФИ №20-04-00512.

Библиографические ссылки

1. Kreslavski V.D., Los D.A., Schmitt F.J. et al. The impact of the phytochromes on photosynthetic processes // BBA – Bioenergetics. 2018. V. 1859. P. 400–408.
2. Boccalandro H.E., Rugnone M.L., Moreno J.E. et al. Phytochrome B Enhances Photosynthesis at the Expense of Water-Use Efficiency // Plant Physiol. 2009. V. 150. P. 1083–1092.

ВОЗБУЖДЁННЫЕ ЭЛЕКТРОННЫЕ СОСТОЯНИЯ И РЕЛАКСАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ГЕМОГЛОБИНЕ ЧЕЛОВЕКА

Чайковский А.Ф., Лепешкевич С.В., Джагаров Б.М.

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

Гемоглобин Hb – нелинейная кооперативная аллостерическая система, которая в процессе реакции с молекулярным кислородом меняет конформацию и, как следствие, кислород-связывающие свойства. Для биофизики и биохимии гемоглобин является основной моделью для понимания связей строения белка с его функциями и динамикой процессов. Фотовозбуждение оксигемоглобина приводит к разрыву связи гемового железа с молекулярным кислородом, и мы получаем свободный O₂, который движется из белка наружу или вновь рекомбинирует с Fe.

В докладе будут представлены результаты применения нано-, пико- и фемтосекундной спектроскопии к изучению механизма и динамики фотодиссоциации гемоглобина человека. По сути, лазерная спектроскопия временного разрешения едва ли не единственный способ изучения кинетических параметров реакции Hb с O₂ в реальном масштабе времени.

В докладе основное внимание будет уделено детальному и критическому анализу двух основных известных в литературе подходов к описанию механизма и динамики фотоиндуцированных внутригемовых процессов в первые 20 пикосекунд после разрыва связи Fe–O₂ в гемоглобине человека.

Первый подход [1] предполагает, что фотодиссоциация происходит «мгновенно» (~десяток фемтосекунд), и все последующие спектральные изменения длительностью ~300 фс и 2-3 пс соответствуют сверхбыстрым стадиям геминальной рекомбинации образовавшегося дезоксигемоглобина с O₂. Спектральных проявлений короткоживущих электронных состояний HbO₂ авторы не предполагают.

Второй подход [2], развитый и обоснованный результатами многолетних исследований в нашей лаборатории, связывает наблюдаемые короткоживущие формы с возбужденными состояниями оксигемоглобина. 300-фемтосекундная форма есть поглощение HbO₂ в триплетном $\pi\pi^*$ -состоянии, а 2-3 пс – поглощение оксигемоглобина в «нагретом» основном состоянии. Собственно, фотодиссоциация оксигемоглобина происходит в триплетном $\pi\pi^*$ -состоянии, и, соответственно, дезоксиформа Hb появляется за ~300 фс.

В заключении доклада будет дан критический анализ двух предложенных механизмов и схем фотодиссоциации HbO₂.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (№ Ф19МС-009).

Библиографические ссылки

1. Petrich J. W., Poyart C., Martin J. L. Photophysics and reactivity of heme proteins: a femtosecond absorption study of hemoglobin, myoglobin, and protoheme // *Biochemistry*. 1988. Vol. 27. P. 4049–4060.
2. Джагаров Б.М., Лепешкевич С.В., Панарин А.Ю. и др. Фотоиндуцированный разрыв связи Fe–O₂ в гемоглобине: квантовый выход диссоциации, возбужденные электронные состояния и релаксационные безызлучательные процессы // *Оптика и спектроскопия*. 2018. Т. 125. Вып. 7. С. 121–127.

ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФОТОСИСТЕМ КЛЕТОК *DUNALIELLA SALINA* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ СРЕДАХ

Чепелева Е.В., Самович Т.В., Козел Н.В.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Зеленая микроводоросль *Dunaliella salina* обладает способностью к накоплению значительного количества β -каротина при действии стрессоров разной природы. Благодаря этой особенности *Dunaliella salina* является важнейшим источником натурального β -каротина и используется в качестве пищевой и кормовой добавки, для лечения и профилактики заболеваний, а также в косметологии. В природе, как правило, каротиноиды находятся в *транс*-форме. Однако при накоплении каротиноидов, индуцированном стрессорами разной природы, клетки *Dunaliella salina* могут синтезировать *цис*-изомеры, обладающие повышенным фармакологическим эффектом. Исследования дуналиеллы носят как фундаментальный, так и прикладной характер и сосредоточены чаще всего на организации эффективного производства β -каротина. В Республике Беларусь также имеется коллекция водорослей, в которой присутствует дуналиелла (*Dunaliella salina* штамм IBCE D-1). Этот штамм как продуцент β -каротина изучен недостаточно. В данной работе исследовали влияние модификации состава питательной среды, в частности, удаления из стандартной среды Артари азота, а также калия и фосфора, на фотохимическую активность фотосистем (ФС) клеток *Dunaliella salina* штамма IBCE D-1 и продукцию ими β -каротина на свету низкой и высокой интенсивности. Для анализа активности фотосистем использовали метод индукции флуоресценции хлорофилла (РАМ-флуориметрию).

Анализ результатов РАМ-флуориметрии показал достоверное снижение потенциального и эффективного квантовых выходов фотохимии ФС 2, а также снижение эффективности переноса электронов в пределах ФС 2 (показатели Fv/Fm, Y(II) и ETR(II) соответственно) в вариантах с отсутствием азота при разной освещенности по сравнению с контрольными, в то время как дефицит калия и фосфора не приводил к таким нарушениям фотохимической активности ФС 2 независимо от интенсивности освещения. Более того, в варианте с дефицитом калия и фосфора мы наблюдали увеличение на свету высокой интенсивности константы фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла qP на фоне существенного снижения показателей регулируемого нефотохимического тушения (Y(NPQ), NPQ), что указывает на относительно нормальное функционирование ФС 2 при дефиците калия и фосфора в отличие от дефицита азота. Достоверное снижение фотохимической активности ФС 1 наблюдали только при дефиците калия и фосфора.

Анализ пигментного состава клеток *Dunaliella salina* с помощью ВЭЖХ показал, что наиболее эффективным фактором запуска повышенного синтеза β -каротина является дефицит азота в сочетании со светом высокой интенсивности – наблюдалось 3-х кратное увеличение продукции β -каротина (при низкой освещенности прирост β -каротина составлял 1,6 раза). Дефицит калия и фосфора приводил к незначительному (в 1,3 раза) увеличению накопления β -каротина только на свету высокой интенсивности.

Таким образом, установлено преимущественное подавление активности ФС 2 в клетках *Dunaliella salina*, культивируемых на среде, дефицитной по азоту, что может быть ключевым фактором запуска повышенного синтеза в клетках водоросли β -каротина, как антиоксиданта, предотвращающего избыточное накопление в хлоропластах активных форм кислорода, в частности, синглетного молекулярного кислорода, генерация которого увеличивается при повреждении компонентов или нарушении функционирования комплексов ФС 2.

ВЛИЯНИЕ ЗАСОЛЕНИЯ НА СИНТЕЗ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В ПРОРОСТКАХ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР, ВЫРОСШИХ ИЗ ГАММА-ОБЛУЧЕННЫХ СЕМЯН

Шамаль Н.В.

Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Беларусь

Гамма-облучение семян в небольших дозах ведет к ускорению темпов развития растений, активации процессов био- и фотосинтеза, что приводит к повышению урожайности растений. Эффект стимуляции бывает нестабильным вследствие влияния на растения иных факторов. Целью представленной работы было изучение влияния засоления среды прорастания на скорость синтеза фотосинтетических пигментов в проростках ржи и ячменя, выросших из гамма-облученных семян.

Семена озимой ржи (*Secale cereale* L.) сорта «Паулинка» и ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта «Бровар» облучали на γ -установке «Игур» (источник – ^{137}Cs). Доза облучения составила 2,5 и 5,0 Гр (мощность дозы 12,3 сГр/мин). Семена проращивали на дистиллированной воде или 1,0 % р-ре NaCl. Прорастающие в условиях этиоляции семена на 3-и и 7-е сутки переносили на свет для оценки эффективности образования фотосинтетических пигментов (ФСП: хлорофилл *a*, и каротиноиды).

Процесс прорастания семян заканчивается фазой развития ростка. После появления coleoptilia на поверхности почвы (момент перехода растений с темнового пути развития на световой) начинается активный рост листа, сопровождающийся накоплением хлорофилла и зеленением. Определение концентрации фотосинтетических пигментов при переносе растений с темноты на свет показало, что предпосевное гамма-облучение способствует активации синтеза каротиноидов и предшественника хлорофилла в проростках. На 3-и сутки концентрация ФСП у растений облученных вариантов, прораставших на воде, была выше чем у контрольных. Для растений ржи увеличение суммы хлорофиллов составило 10,0 и 26,2 %, каротиноидов – 12,4 и 18,2 %, соответственно при облучении в дозе 2,5 и 5,0 Гр. Аналогичная картина сохранилась у проростков, перенесенных на свет на 7-е сутки. Увеличение суммы хлорофиллов составило 7,7 и 17,2 %, каротиноидов – 2,1 и 20,1 %, соответственно при облучении в дозе 2,5 и 5,0 Гр.

Для растений ячменя картина была схожей. На 3-и сутки увеличение суммы хлорофиллов составило 7,1 и 51,4 %, соответственно при облучении семян в дозе 2,5 и 5,0 Гр. Содержание каротиноидов увеличилось на 8,7 % в варианте с облучением семян в дозе 5,0 Гр. На 7-ые сутки содержание хлорофиллов была выше в варианте облучения 5,0 Гр на 33,3 %. При этом содержание каротиноидов в облученных проростках было ниже почти в 2 раза.

В связи с торможением прорастания растений при засолении среды эффективность синтеза пигментов оценивалась только на 7-ые сутки. При сравнении с растениями, прораставшими на дистиллированной воде, у растений ржи отмечено снижение ФСП во всех вариантах, а у растений ячменя повышение, что предположительно связано с ростом и дифференциацией клеток проростков. При этом в условиях засоления отмечено сохранение более высокого количества пигментов в проростках облученных вариантов по сравнению с необлученными вариантами. В проростках ржи содержание хлорофиллов вариантов 2,5 и 5,0 Гр было выше на 18,6 и 54,4%, каротиноидов – на 5,4 и 13,3% соответственно. В проростках ячменя содержание хлорофиллов вариантов 2,5 и 5,0 Гр было выше на 7,7 и 65,0 %, каротиноидов – на 8,3 и 79,9 % соответственно.

Таким образом, предпосевное облучение семян в дозах 2,5 и 5,0 Гр активизирует процесс синтеза фотосинтетических пигментов и их предшественников в проростках злаковых культур. При этом условия прорастания не влияют на этот процесс.

ВЛИЯНИЕ β -1,3-ГЛЮКАНА НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) ПРИ ФУЗАРИОЗНОМ УВЯДАНИИ

Шпилевский С.Н., Доманская И.Н.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Проведены исследования эффективности действия β -1,3-глюкана на качественное и количественное содержание пигментов в листьях томата при фузариозном увядании. В исследовании использовались листья верхнего яруса двухмесячных растений томата (*Lycopersicon esculentum* L.) сорта Тамара. Растения выращивали в климатической камере на почве марки «Овощное изобилие» при температуре 22-24 °С, относительной влажности 60% и освещении белым светом 110 мкмоль квантов / м²с при 14-часовом фотопериоде в течение 2 месяцев. Затем корни промывали и растения переносили на водопроводную воду. После акклиматизации в течение 2 сут в водной среде растения опрыскивали раствором β -1,3-глюкана (0,01%) из *Euglena gracilis* (Sigma-Aldrich) (5 мл / растение). В качестве контроля использовали растения, обработанные дистиллированной водой. Растения томата инокулировали через корневую систему суспензией микроспор гриба *Fusarium oxysporum* (10⁶ спор / мл воды) в количестве 50 мл / растение через 48 ч после обработки иммуномодулятором. Анализ листьев верхнего яруса проводили через 72 ч после грибкового заражения. Количество пигментов определяли методом высокоскоростной жидкостной хроматографии [1].

Обнаружено, что у зараженных листьев содержание хлорофилловых пигментов уменьшалось по сравнению со здоровыми. При этом снижение содержания хлорофилла (Хл) *a* оказалось выше, чем Хл *b*, что привело к снижению соотношения Хл *a*/Хл *b* на 24% по сравнению с контролем. β -1,3-глюкан оказал защитное действие на уровень Хл при патогенезе, что выражалось в увеличении содержания Хл *a* на 15%, Хл *b* на 12%, Хл (*a* + *b*) на 14% и соотношения Хл *a* / Хл *b* на 3%.

Определение содержания каротиноидов показало, что их уровень также снизился в инфицированных листьях томата. Наиболее значительное снижение наблюдалось по содержанию таких пигментов, как неоксантин, лютеин и β -каротин. Снижение содержания пигментов ксантофиллового цикла (виолаксантин, антераксантин) было минимальным. Следует отметить, что в нашем эксперименте в листьях томата зеаксантин не был обнаружен. Предварительная обработка растений томата β -1,3-глюканом способствовала увеличению содержания неоксантина на 14%, лютеина на 9% и β -каротина на 14% в зараженных листьях, причем их уровень превысил контрольные значения. В то же время уровень пигментов ксантофиллового цикла снизился по сравнению с контролем на 8%. В целом, полученные данные свидетельствуют о защитном действии β -1,3-глюкана на пигментный аппарат растений томата при фузариозном увядании, что открывает перспективы его использования в качестве иммуномодулирующего агента.

Библиографические ссылки

1. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis // Handbook for Carotenoid Analysis. In «Harvest Plus». 2004. Vol. 63. P. 45–51.

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

IMMUNOSENSING PLATFORM BASED ON ZnO-POLYACRYLONITRILE NANOFIBERS FOR CANCER BIOMARKER DETECTION

Tamashevski A.V.¹, Harmaza Y.M.¹, Iatsunskyi I.², Bechelany M.³

¹ *Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

² *NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University in Poznan, Poznan, Poland*

³ *European Institute Des Membranes, Montpellier, France*

Early detection of cancer in patients is an on-going challenge, which can provide a suitable starting point for developing new strategies of tumors treatment. Low-cost, rapid, and label-free detection, as well as portability, are some of the hurdles that need to be overcome. In this regard, it is important to develop novel nanostructures that could be applied for the design of effective biosensing platforms. One-dimensional (1D) ZnO nanostructures have attracted attention due to their potential use as the building blocks in fabricating nanoscale devices.

Cancer biomarkers are molecular indicators of a biological status of the cell. Many types of important antigens on cell surfaces (clusters of differentiation – CD) indicate the presence of a wide variety of disease states. For instance, the accumulation of CD19⁺CD5⁺ lymphocytes indicates the chronic lymphocytic leukemia. Therefore, the development of sensitive, rapid, and simple methods for CD-biomarker detection has a great diagnostic value.

Optical immunosensors, which are portable, compact and compatible with computerized devices and are characterized by low limit of detection, could be a best solution among the others. In recent works, our project partners and we have demonstrated the possibility of application of nanostructured photoluminescence (PL) immunosensors based on ZnO nanorods for the toxins and cancer cells determination [1-3].

In the present research, we have applied ZnO-polyacrylonitrile (ZnO-PAN) nanofibers as a PL platform for development of immunosensor toward CD-biomarkers detection. As model objects, two types of commercially available proteins (CD5, CD19), and consequently their antibodies (anti-CD5, anti-CD19), were used in biosensing experiments. The formation of antigen-antibody complex was investigated by the determination of changes in ZnO PL. It was developed and established optimal antibodies immobilization methods on the surface of ZnO using three different approaches (with and without protein A/G linking). Some aspects of the mechanism of interaction between antigens and functionalized ZnO-based immunosensors have been also proposed.

This research was funded by MSCA-RISE - Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Staff Exchange (RISE) through the “Novel 1D photonic metal oxide nanostructures for early stage cancer detection” project, grant number 778157.

References

1. R. Viter et al., Analytical, thermodynamical and kinetic characteristics of photoluminescence immunosensor for the determination of Ochratoxin A // *Biosensors and Bioelectronics* V. 99. 2018. P. 237-243.
2. R. Viter et al., Photoluminescence Immunosensor Based on Bovine Leukemia Virus Proteins Immobilized on the ZnO Nanorods, *Sensors and Actuators B: // Chemical* 285 (2019) 601-606.
3. A. Tamashevski et al., Zinc oxide nanorod based immunosensing platform for the determination of human leukemic cells // *Talanta* V. 200. 2019. P. 378-386.

CYCLODEXTRIN POLYMERS AS A TEMOPORFIN NANOCARRIER

Yakavets I.V.^{1,2}, Guereschi C.^{1,2}, Kravchenko I.E.³, Borisov K.N.³, Lassalle H.-P.^{1,2},
Bolotina L.N.^{1,2}

¹ Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

² CRAN, CNRS, Université de Lorraine, Nancy, France

³ Belarussian State University, Minsk, Belarus

Supramolecular delivery systems are considered as one of the most versatile strategies in pharmaceuticals. Cyclodextrins (CDs) represents an excellent example of a supramolecular system. Owing to a toroidal structure with an inner hydrophobic cavity and outer hydrophilic surface, CDs can improve the chemical and physical stability of drugs through the formation of drug/CD complexes, as well as modulate drug biodistribution when binding is strong enough [1]. Recently, our group reported on the extremely strong binding of β -CD derivatives to temoporfin (mTHPC, medicinal product name: Foscan[®]) [2]. It worth noting that mTHPC is one of the most potent clinically approved photosensitizers (PSs) for photodynamic therapy (PDT) of head and neck cancer. A high affinity of β -CD derivatives to mTHPC allows altering mTHPC distribution *in vitro* in 2D monolayer cells and 3D tumor spheroids as well as xenografted mice *in vivo* [3,4]. Also, CDs provide a unique opportunity for deep PS penetration in 3D multicellular tumor spheroids [3]. However, parental administration of CD/mTHPC complexes is hindered by the rapid CD excretion from the circulating system and quick drug release upon the dilution of complexes. Meanwhile, hyper-crosslinking of CD monomers *via* epichlorohydrin results in the formation of solid porous nanoparticles within a three-dimensional network. Such CD polymers could encapsulate drugs forming both inclusion and noninclusion complexes with drug molecules. To date, CD polymers have been intensively studied in pharmaceuticals, including the delivery of anti-cancer drugs [5], and demonstrated controlled drug release, limited toxicity, and a good pharmacokinetic profile leading to prolonged exposure to the drug. Thus, we suppose that this hybrid cyclodextrin-polymer technology could be considered as an advanced smart system for drug delivery of temoporfin. In the present work, we demonstrated efficient encapsulation of mTHPC in epichlorohydrin-crosslinked CD polymers based on β -CD (β CDp) and carboxymethyl- β -CD (CM β CDp) monomers. The estimated binding constants were $K = 2.5 \times 10^6 \pm 4.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $K = 7.1 \times 10^5 \pm 3.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for β CDp and CM β CDp, respectively. We showed slower drug release from CD polymers compared to monomeric CD upon the dilution in PBS. *In vitro* experiments demonstrated strong dependence on cellular uptake of mTHPC in human pharynx squamous cell carcinoma (FaDu) *in vitro* models (2D monolayer cells and 3D multicellular spheroids) on the CD polymer concentration. Despite their size (50 nm), CD polymers provide a unique opportunity to increase the penetration of mTHPC into the 3D spheroids at the cost of cellular uptake. We confirm the critical role of affinity constants in the CD-mediated delivery of mTHPC in 3D tumor spheroids. This study suggests that CD nanosponge is a strong candidate for *in vivo* study in preclinical models due to its nontoxicity, potentially prolong the mTHPC in plasma and perhaps improved biodistribution profile compared to CD monomers.

References

1. Stella V.J., He Q. Cyclodextrins // Toxicol. Pathol. 2008. Vol. 36, P. 30–42.
2. Yakavets I., Lassalle H.-P., Yankovsky I., et al. Evaluation of temoporfin affinity to β -cyclodextrins // J. Photochem. Photobiol. A. 2018. Vol. 367. P. 13–21.
3. Yakavets I. et al. The alteration of temoporfin distribution // Int. J. Pharm. 2017. Vol. 529, P. 568–575.
4. Yankovsky I., Bastien E., Yakavets I., et al. Inclusion complexation with β -cyclodextrin derivatives alters biodistribution // Eur. J. Pharm. Sci. 2016. Vol. 91. P. 172–182.
5. Swaminathan S. et al. Cyclodextrin-based nanosponges // WIREs Nanomed. 2016. Vol. 8, P. 579–601.

ВЛИЯНИЕ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА ФОРМЕННЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ КРОВИ

**Абашкин В.М.¹, Педзивиатр-Вербицка Э.², де ла Мата Ф.Х.³, Гомез Р.³, Щербин Д.Г.¹,
Брышевска М.²**

¹*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Кафедра общей биофизики, Лодзинский университет, Лодзь, Польша*

³*Факультет координационной химии, Университет Алькалы, Алькала, Испания*

Использование систем доставки лекарств предполагает, в частности, их внутривенное введение и взаимодействие с клетками крови (например, эритроцитами, лимфоцитами). При этом, важно отметить, что катионные заряды таких систем, которые отвечают за стабилизацию комплексов между катионными макромолекулами и нуклеиновыми кислотами, также могут привести к токсичности этих систем для организма. Ранее мы исследовали золотые наночастицы (AuNP), функционализированные катионными дендронами [1], однако токсичность таких частиц при модификации дендронами высоких генераций препятствовала использованию данных систем, а эффективность их трансфекции была низкой. Нами была разработана стратегия по снижению токсичности, включающая не только функционализацию наночастиц золота карбосилановыми дендронами, но и декорирование поверхности частицы молекулами ПЭГ. Было выбрано несколько соотношений дендрон/ПЭГ с целью определения их влияния на биологические свойства. Была изучена гемолитическая активность, влияние на лимфоциты, агрегацию тромбоцитов и распознавание антителами PEG [2].

В процессе анализа было выяснено, что наличие молекул ПЭГ на дендронизированных AuNP значительно снижает гемолиз и агрегацию тромбоцитов. Данные гемолиза показали, что эритроциты были невосприимчивы к воздействию AuNP, покрытым дендронами PEG и дендронами 1G и 2G во всех концентрациях, измеренных через 2 часа и 24 часа. В частности, пегилированные AuNP 2G вызывали гемолиз ниже 5% даже при 100 мкг/мл, тогда как непегилированные с дендронами той же генерации достигали 70% гемолиза уже при 30 мкг/мл. Результаты также показали, что степень ПЭГилирования, по-видимому, играет существенную роль в лимфоцитарной активности, вероятно, за счет уменьшения взаимодействия с катионными группами дендронов. Генерация дендрона и отношение дендрон/ПЭГ оказывают существенное влияние на взаимодействие AuNP с анти-ПЭГ антителами. Более высокое распознавание антителами наблюдалось для наночастиц с дендронами 2-й генерации. Данные указывают на то, что в этих AuNP терминальная группа PEG, которая распознается антителами, более подвержена воздействию из-за размера дендронов. В наночастицах, покрытых дендронами 3-й генерации, цепь ПЭГ скрывается за ветвями дендронов, в то время как в модификации дендронами первой, меньший размер способствует фолдингу PEG, что делает метоксигруппу менее доступной для взаимодействия с антителами. Таким образом отношение дендрон/ПЭГ и генерация (размер) дендронов заметно изменяют свойства AuNP. Этот факт может стать ключом к выбору подходящей системы для трансфекции.

Результаты исследований поддержаны Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований, грант Б19АРМГ-002, Б20СЛКГ -002 и NAWA IAP, грант EUROPARTNER, No. PPI/APM/2018/1/00007/U/001.

Библиографические ссылки

1. Peña-González C. E. et al Current advances in the chemistry of silicon: not exactly a carbon copy // Dalton Transactions. 2017. V. 46, №. 27. P. 8736-8745.
2. Barrios-Gumiel A. et al. Effect of PEGylation on the biological properties of cationic carbosilane dendronized gold nanoparticles // International Journal of Pharmaceutics. 2020. V. 573. P. 118867.

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВЕКТОРЫ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Абашкин В.М.¹, Педзивиатр-Вербицка Э.², Миловска К.², де ла Мата Ф.Х.³, Гомез Р.³, Щербин Д.Г.¹, Брышевска М.²

¹*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Кафедра общей биофизики, Лодзинский университет, Лодзь, Польша*

³*Факультет координационной химии, Университет Алькалы, Алькала, Испания*

За последние десятилетия наметился существенный прогресс в синтезе, методам функционализации и поиском оптимальных форм и размеров наночастиц. В настоящее время наночастицы золота и серебра привлекают все больший интерес к биомедицинским исследованиям. Их особые свойства позволяют создавать на их основе многоцелевые конъюгаты и системы.

Функционализация наночастиц является важным аспектом для снижения их токсических эффектов, повышения эффективности доставки (например, накопления в определенных тканях) и повышения стабильности. Одним из способов функционализации является модификация поверхности наночастиц дендронами (дендронизация). Дендроны – это особые сильноветвящиеся полимеры, образующие структуры, похожие на ветви деревьев. Дендронизация наночастиц позволяет им эффективно связывать генетический материал и доставлять его в клетки-мишени. Кроме того, было показано, что дендронизация снижает гемотоксичность и цитотоксичность по сравнению с токсичностью наночастиц или самих дендронов.

В наших исследованиях мы покрыли наночастицы золота и серебра катионными карбосилановыми дендронами с целью оценки биосовместимости полученных наночастиц. Катионные карбосилановые дендроны, содержащие тиоловый фрагмент в фокальной точке, представляют собой хорошие якорные лиганды, способствующие стабилизации наночастиц, а также упрощающие пути синтеза. Биологическое влияние дендронов и наночастиц золота и серебра определялось посредством изучения гемолиза эритроцитов, агрегации тромбоцитов и пролиферации лимфоцитов. Для дендронов гемолиз и агрегация тромбоцитов зависели от генерации дендронов, в то время как для наночастиц изменения были связаны в первую очередь с большим размером последних.

Также методами гель-электрофореза и дзета-потенциала было показано, что дендронизированные наночастицы золота и серебра образуют стабильные комплексы с различными терапевтическими олигонуклеотидами (миРНК, миРНК). Исследования интернализации показали, что наночастицы золота, тем не менее, проникают в клетки довольно слабо, в то время как модифицированные наночастицы серебра интернализуются в опухолевые клетки *in vitro* на высоком уровне в случае 2-й и 3-й генерации поверхностных дендронов и высвобождают генетический материал в целевых клетках.

Результаты исследований поддержаны Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований, грант Б19АРМГ-002, Б20СЛКГ -002 и NAWA IAP, грант EUROPARTNER, No. PPI/APM/2018/1/00007/U/001.

Библиографические ссылки

1. Peña-González C. E. et al Current advances in the chemistry of silicon: not exactly a carbon copy // Dalton Transactions. 2017. V. 46, №. 27. P. 8736-8745.
2. Shcharbin, D., et al. Role of cationic carbosilane dendrons and metallic core of functionalized gold nanoparticles in their interaction with human serum albumin // International journal of biological macromolecules. 2018. V. 118. P. 1773-1780.

БИОЗОНДЫ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ С НАНОРАЗМЕРНЫМ АЛМАЗОМ

Белько Н.В.^{1,2}, Самцов М.П.², Гусаков Г.А.², Тарасов Д.С.², Луговский А.А.²

¹*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

²*Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь*

Комплексы ультрадисперсных алмазов (УДА) с органическими красителями могут применяться для создания эффективных флуоресцентных биологических зондов. В таких системах УДА обеспечивают химическую инертность и селективность доставки, а оптические свойства определяются молекулами красителя. В данной работе исследуются спектрально-люминесцентные свойства комплексов индотрикарбоцианинового красителя с УДА детонационного синтеза и потенциал их применения для флуоресцентной диагностики.

В водном растворе мономерной форме красителя соответствует полоса электронного поглощения при 706 нм и полоса флуоресценции при 738 нм [1]. При добавлении УДА в раствор красителя образуются комплексы краситель-УДА, которые характеризуются максимумом поглощения при 718 нм и слабой флуоресценцией в области 800 – 850 нм.

Добавление сыворотки крови человека в водную суспензию комплексов краситель-УДА вызывает существенные изменения в спектрах поглощения и флуоресценции. При повышении концентрации сыворотки крови от 0 до 3 об.% в спектре поглощения образца наблюдается повышение величины оптической плотности в ~2 раза и сдвиг максимума поглощения до 730 нм. При этом максимум спектра флуоресценции смещается до 756 нм, интенсивность испускания возрастает в ~20 раз.

Изменение спектрально-люминесцентных свойств красителя при введении сыворотки крови свидетельствует о распаде комплексов красителя-УДА в присутствии биомолекул. По всей видимости, после этого молекулы красителя образуют комплексы с белками сыворотки крови, преимущественно с сывороточным альбумином человека, к которому краситель имеет родство [2].

Таким образом, в водной среде индотрикарбоцианиновый краситель образует комплексы с УДА детонационного синтеза, которые характеризуются максимумом поглощения, bathochromно смещенным относительно спектра мономеров красителя, и слабой флуоресценцией. В присутствии сыворотки крови спектр поглощения красителя претерпевает bathochromный сдвиг с одновременным усилением его флуоресценции, происходит увеличение степени поляризации и времени затухания флуоресценции. Наблюдаемые изменения свидетельствуют о том, что молекулы красителя десобрируются с поверхности УДА и происходит образование комплексов с белками сыворотки крови. Комплексы краситель-УДА перспективны в качестве эффективных биозондов, флуоресценция которых включается при связывании красителя с белками сыворотки крови и расположена в спектральной области прозрачности биологических тканей.

Библиографические ссылки

1. Белько Н.В., Самцов М.П., Гусаков Г.А. и др. Спектрально-люминесцентные свойства и морфология самоорганизованных наноструктур индотрикарбоцианинового красителя // Журн. прикл. спектр. 2018. Т. 85. С. 868–878.
2. Белько Н.В., Хлудеев И.И., Зорин В.П. и др. Влияние комплексообразования с белками плазмы крови на спектральные характеристики трикарбоцианиновых красителей // Вести БГПУ. 2018. Серия 3, № 1. С. 14–20.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И МЕМБРАНОТРОПНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИХ ДЕЙСТВИЯ

Габриелян Л.С., Трчунян А.А.

*Российско-Армянский университет, Ереван, Армения
Ереванский государственный университет, Ереван, Армения*

В настоящее время поиск эффективных антибактериальных препаратов является актуальной проблемой биомедицины и биотехнологии в связи с ростом резистентности патогенных микроорганизмов к антибиотикам. Наночастицы (НЧ) многих переходных металлов обладают выраженным антибактериальным действием, вследствие чего могут рассматриваться в качестве альтернативных агентов для преодоления антибиотикоустойчивости [1-3]. Антибактериальное действие НЧ может быть результатом их взаимодействия с бактериальной мембраной, приводящим к повреждению мембраны и гибели бактерии [1,2]. Механизмы, лежащие в основе антибактериальных свойств НЧ, не исследованы полностью, и различаются в зависимости от вида НЧ и бактерий.

В данной работе исследовано влияние НЧ серебра на Грамположительные (*Enterococcus hirae* ATCC9790, *Staphylococcus aureus* MDC5233) и Грамотрицательные бактерии (*Escherichia coli* K-12, *Salmonella typhimurium* MDC1759). Как известно, среди представителей перечисленных видов встречаются патогенные формы, вызывающие различные инфекционные заболевания человека и проявляющие устойчивость ко многим известным антибиотикам [4,5]. НЧ серебра (“Сильвертон”, “Тонус-Лес”, Армения) добавляли непосредственно в ростовую среду. Средний размер НЧ составлял 30 нм. НЧ серебра демонстрировали антибактериальную активность в отношении использованных бактерий, выражающуюся в подавлении удельной скорости роста, росте продолжительности лаг фазы роста и уменьшении количества жизнеспособных бактериальных колоний. При этом бактерицидное действие НЧ серебра на *E. hirae* и *S. aureus* было более выраженным, чем на *E. coli* и *S. typhimurium*. Предполагается, что Грамположительные бактерии более чувствительны к действию НЧ, чем Грамотрицательные, благодаря наличию в клеточной стенке тейхоевых кислот и крупных пор, через которые происходит транспорт частиц. Обнаружена концентрационная зависимость антибактериального действия НЧ серебра. Для выявления механизмов влияния НЧ также исследовали перенос протонов через бактериальную мембрану. При добавлении НЧ наблюдалось изменение энергозависимого переноса протонов через F_0F_1 -АТФазу, что свидетельствует о влиянии НЧ серебра на активность мембраносвязанных ферментов. Полученные данные указывают на то, что НЧ серебра обладают выраженным антибактериальным действием в отношении исследованных бактерий и могут применяться в биомедицине при лечении инфекционных заболеваний, вызываемых ими, а также для подавления роста бактерий в биотехнологии, пищевой индустрии и др. областях. Предполагается, что действие НЧ серебра определяется их адсорбцией на поверхности бактериальных клеток, взаимодействием с мембраносвязанными белками и проникновением в клетку. Бактерицидное действие НЧ серебра связано с изменением проницаемости бактериальных мембран и активности мембраносвязанных ферментов.

Библиографические ссылки

1. Raghunath A. et al. Metal oxide nanoparticles // Int. J. Antimicrob. Agents. 2017. V. 49. P. 137-152.
2. Gabrielyan L., Trchounian A. Antibacterial activities of transient metals nanoparticles and membranous mechanisms of action // World J. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 35. N. 162.
3. Lee SH., Jun B-H. Silver Nanoparticles // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. N. 865.
4. Clements A. et al. Infection Strategies // Gut Microbes 2012. V. 3. P. 71–87.
5. Akbar A., Sadiq M., Ali I., et al. Synthesis and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles // Biocatalysis Agr. Biotechnol. 2019. V. 17. P. 36-42.

ГИДРОЛИЗ ФОСФАТИДИЛБРИВУДИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ФЛА₂

Герловский Д.О.¹, Ремеева Е.А.¹, Артемьева Ю.Н.¹, Василевская Е.Д.², Биричевская Л.Л.³, Винтер М.А.³, Зинченко А.И.³, Михайлопуло И.А.¹, Литвинко Н.М.¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

³Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Исходя из складывающейся ситуации в мире, COVID-19, исследования аналогов природных компонентов нуклеиновых кислот, в частности нуклеозидов, как противовирусных лекарственных препаратов, в настоящее время имеет первостепенное значение [1,2]. Для преодоления наиболее проблемных стадий прохождения барьеров между лекарственным препаратом и его мишенью в организме, были предложены различные стратегии, показавшие высокую терапевтическую эффективность, в том числе стратегия про-лекарств (в частности *pro-tides*), обеспечивающая проникновение молекул через клеточную мембрану [2,3]. Синтез конъюгатов нуклеозидов с другими биомолекулами, среди которых значительный интерес представляют фосфолипиды, может рассматриваться как альтернатива стратегии *pro-tides* при проникновении биологически активного нуклеозида через клеточную мембрану [3]. Первая стадия превращений данных соединений в организме человека заключается в гидролизе молекулы под действием панкреатической фосфолипазы А₂ (ФЛА₂, КФ 3.1.1.4) при пищеварении, либо при активации вблизи опухолевой клетки, где также функционирует упомянутый фермент. Цель настоящей работы – энзиматический синтез и изучение устойчивости фосфатидильного производного противовирусного нуклеозида бривудина (фосфатидилбривудина) к действию пищеварительной ФЛА₂, субстратные свойства которого по отношению к данному ферменту не были ранее описаны. Фосфатидилбривудин был синтезирован энзиматическим методом в лаборатории молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси. Установлено, что фосфатидилбривудин в составе мицеллярной фазы, образованной дезоксихолатом, под действием панкреатической ФЛА₂ гидролизует по второму положению глицеринового скелета на 100% за 30 мин. Максимальная скорость гидролиза фосфатидилбривудина (90,8 мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹) выше, чем у исходного природного ФХ сои (90,0 мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹), т.е. липоконъюгат оказался для панкреатической ФЛА₂ более предпочтительным субстратом в составе мицеллярной фазы, сформированной дезоксихолатом натрия. Неферментативный гидролиз фосфатидилбривудина не наблюдался. Полученные результаты обсуждаются в свете существования различных путей преобразования данного конъюгата *in vivo* и требуют дальнейшего изучения других надмолекулярных форм организации синтетических конъюгатов фосфатидной кислоты, в том числе в составе мицеллярной фазы с различным зарядом поверхности раздела фаз липид-вода и в составе ламеллярной фазы, а также в форме препаратов для перорального введения. Работа выполнена при финансовой поддержке Национальной Академии Наук Беларуси (проект #116-12-03-2019).

Библиографические ссылки

1. Mikhailopulo, I.A. New trends in nucleoside biotechnology / I.A. Mikhailopulo, A.I. Miroshnikov // Acta Naturae. 2010. № 2. P. 39–56.
2. Opitz, P. Modified Nucleosides – Molecular markers suitable for small-volume cancer / P. Opitz, O. Herbarth, A. Seidel // Anticancer Res. 2018. № 38. P. 613–619.
3. Synthesis of phospholipid_ribavirin conjugates / I.A. Oleynikova [et al.] // Helv. Chim. Acta. 2013. T. 96, № 3. P. 463–472.

ПРИМЕНЕНИЕ СТИМУЛЗАВИСИМЫХ СОПОЛИМЕРОВ ДЕКСТРАН-ПНИПАМ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

Зорин В.П.¹, Зорина Т.Е.¹, Кравченко И.Е.¹, Коблов И.В.¹, Кузив Ю.², Куцевол Н.²

¹*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

²*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина*

Повышение результативности фотодинамической терапии, в значительной степени, связано с увеличением избирательности доставки фотосенсибилизатора к клеточным и тканевым мишеням. Решение этой задачи возможно путём отбора фотосенсибилизаторов, обладающих повышенным сродством к этим мишеням, либо использованием специальных систем введения фотосенсибилизатора, обеспечивающих селективность их доставки. Примерами подобного подхода в фотодинамической терапии могут служить работы по использованию в качестве drug delivery systems различных наноструктурных и супрамолекулярных комплексов порфиринов с наночастицами, полимерами, циклодекстринами и др. [1]. Большим потенциалом для контролируемых изменений процессов биораспределения фотосенсибилизаторов обладают чувствительные к действию внешних стимулов полимеры на основе конъюгатов декстрана и поли-N-изопропилакриламида.

Целью данной работы явилось изучение процессов комплексообразования фотосенсибилизатора Темопорфина (mTHPC) с сополимерами на основе декстран70-поли(N-изопропилакриламида) (Д70-ПНИПАМ), процессов выхода его из комплексов при изменении температуры среды.

На основании измерений светопропускания и светорассеяния растворов сополимера показано, что в интервале температур 34-35°C происходит фазовый переход в структуре полимера. Согласно данным динамического светорассеяния данный переход связан со значительным уменьшением средних размеров полимерных молекул. Анализ спектральных и поляризационных характеристик флуоресценции Темопорфина в растворе полимера позволяет заключить, что при температурах выше 34-35 °C mTHPC образует устойчивые комплексы с полимером. При охлаждении комплексов mTHPC с Д70-ПНИПАМ до температур ниже критической наблюдаются значительные изменения спектральных и поляризационных характеристик флуоресценции сенсбилизатора — резко снижается интенсивность флуоресценции, падает степень поляризации. Можно предположить, что в области низких температур наблюдается быстрая диссоциация комплексов с последующим образованием агрегатов молекул mTHPC.

Определены физические параметры, позволяющие непрерывно контролировать динамику выхода и распределения Темопорфина из комплексов с Д70-ПНИПАМ в биологических системах.

На основании полученных данных, сделан вывод о том, что сополимеры на основе декстран70-поли(N-изопропилакриламида) могут быть перспективными носителями для целей фотодинамической терапии.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант №. M19UKRG-002; совместного ГКНТ РБ и МОН Украины, грант № M110-2019.

Библиографические ссылки

1. Yakavets I, Millard M, Zorin V et al. Current state of the nanoscale delivery systems for temoporfin-based photodynamic therapy // J. Control Release. 2019. Vol. 304. P. 268-287.

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК, ПОКРЫТЫХ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ, НА КЛЕТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Коваленко Е.И., Свечко А.Д., Соболевская Е.М., Кулагова Т.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Углеродные нанотрубки (УНТ) имеют ряд перспективных свойств, что обуславливает повышенный интерес к их использованию в различных областях науки, промышленности и биомедицинских технологий [1–3]. Во многих случаях УНТ подвергаются ковалентной или нековалентной модификации, в частности, для улучшения их диспергируемости и повышения биосовместимости. Следует отметить, что использование УНТ в медицине и биотехнологиях зависит от цитотоксического действия выбранной формы УНТ [3–7]. В данном исследовании была поставлена цель оценить цитотоксичность многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ), нековалентно модифицированных полиэтиленгликолем (ПЭГ), в отношении клеток крови человека в экспериментах *in vitro*.

В работе использованы карбоксилированные МУНТ длиной около 1 мкм и диаметром 10–30 нм, синтезированные методом CVD. Для модификации МУНТ смешивали с ПЭГ 400/4000 (4 мг/мл) и обрабатывали ультразвуком с частотой 44 кГц в течение 30 минут. Полученные образцы МУНТ добавляли в суспензии изолированных нейтрофилов или эритроцитов в концентрациях от 1 до 100 мкг/мл и инкубировали в течение 0,5, 1, 1,5, 3, 20 часов. Важным показателем функциональной активности нейтрофилов является способность ферментативно генерировать активные формы кислорода (АФК) с участием ферментов НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы. Кислородтранспортная функция эритроцитов в организме в значительной степени определяется гемоглобином, содержащимся в них, а также их механическими свойствами и формой. Указанные характеристики клеток изучены в работе с применением методов хемилюминесценции, спектрофотометрии, нефелометрии и световой микроскопии.

Было обнаружено, что способность нейтрофилов к генерации АФК подавляется при воздействии МУНТ (в концентрации > 5 мкг/мл) при длительности инкубирования клеток с МУНТ 1,5 ч и более. Деформация эритроцитов и их повреждение, сопровождающееся ростом высвобождения гемоглобина во внеклеточную среду, выявлены в случае инкубирования эритроцитов с МУНТ (в концентрации > 5 мкг/мл) в течение 20 часов и более. Величина этих эффектов значительно возрастала с увеличением дозы МУНТ.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что модифицированные полиэтиленгликолем МУНТ являются цитотоксичными для нейтрофилов и эритроцитов при концентрациях выше 5 мкг/мл и длительном времени воздействия.

Библиографические ссылки

1. Simon J., et al. Overview of Carbon Nanotubes for Biomedical Applications // *Materials*. 2019. Vol. 12, №4. P. 624.
2. Liu Z., et al. Carbon materials for drug delivery // *Materials today*. 2011. Vol. 14. P. 316–323.
3. Orecchioni M., et al. Impact of carbon nanotubes and graphene // *J. Transl Med*. 2014. Vol. 12. P. 138.
4. Kumar V., et al. Formulation and Evaluation of Nanostructured Lipid Carrier // *Der Pharmacia Lettre*. 2016. Vol. 8, №4. P. 299–303.
5. Yuvaraj V., et al. Toxicity assessment of carbon nanotubes // *Asian J. Pharm. Clin. Res*. 2016. Vol. 9. P. 278–280.
6. Heo Y., et al. Rheological alteration of erythrocytes exposed to carbon nanotubes // *Clin. Hemorheology Microcirculation*. 2017. Vol. 65, №1. P. 49–56.
7. Sachar S., et al. Cytotoxic Effect // *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6, № 7. P. e22032.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ НА УВЕЛИЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА НА ОСНОВЕ ПЛАЗМОННЫХ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Мельникова Я.И.¹, Коктыш И.В.¹, Кулакович О.С.², Романенко А.А.², Маскевич С.А.¹

¹*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ*

²*Институт физики им. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Описаны непростатические источники простатического специфического антигена (ПСА) как у мужчин, так и у женщин. Для исследования возможности использования ПСА в качестве биомаркера непростатических раков требуется увеличение чувствительности существующих иммунохимических тестов. Цель: разработка подхода, позволяющего интегрировать наночастицы серебра, способные усиливать флуоресценцию аналита, в стандартную процедуру иммунофлуоресцентного анализа ПСА.

Материалы и методы исследований. Для создания пленок из наночастиц серебра использовали полиэлектролиты: полидиаллилдиметиламмоний хлорид (ПДАДМАХ, 1 г/л в 0,5 моль/л хлорида натрия) и поли-L-лизин гидробромид (20 мкг/мл, Sigma, США). Серебряные наночастицы осаждали в лунки планшета как описано ранее [1-2]. Использован двуцентровый иммунофлуоресцентный анализ связывания ПСА с моноклональными антителами: иммобилизованными на твердой фазе (№10184, Abcam, США) и мечеными флуоресцеином изотиоцианатом (ФИТЦ, №178776, Abcam, США). Регистрация флуоресценции: 460 нм (возбуждение), 518 нм (эмиссия).

Результаты исследований. Поверхность пленок «наночастицы серебра-ПДАДМАХ-полистирол», организована как слой сферических наночастиц размером 30–80 нм. [1-2]. Поверхность полистирольный планшета покрывали разными способами: поли-L-лизин, ПДАДМАХ, «ПДАДМАХ – наночастицы серебра – поли-L-лизин», «ПДАДМАХ – наночастицы серебра-ПДАДМАХ». В качестве контроля – интактная поверхность полистирола. Установлено, что по сравнению с контролем использование поли-L-лизина, приводит к увеличению интенсивности флуоресценции на 10-17%, при покрытии ПДАДМАХ – на 30-45%, в присутствии комплекса «ПДАДМАХ-наночастицы серебра-поли-L-лизин» – в 1,6-1,9 раза. Комплекс «ПДАДМАХ-наночастицы серебра-ПДАДМАХ» показал усиление флуоресценции в 2,3-2,7 раза по сравнению с контролем и в 1,8-1,9 раз по сравнению при использовании только ПДАДМАХ. Это отражает большой вклад феномена плазмонного резонанса серебряной нанопленки со спектром поглощения антиПСА-ФИТЦ.

При создании иммунофлуоресцентных тест-систем различных конструкций на серебряных нанопленках, существенным является выбор полиэлектролита для покрытия слоя серебра, так как физико-химические свойства полиэлектролита оказывают серьезное влияние как на сорбционную емкость поверхности так и на конформационное состояние и функциональную активность биологических макромолекул. Эти параметры в значительной степени определяют как чувствительность, так и специфичность иммунохимической тест-системы, а, следовательно, и эффективность всего анализа.

Библиографические ссылки

1. Kulakovich, O. Improved method for fluorophore deposition atop a polyelectrolyte spacer for quantitative study of distance-dependent plasmon-assisted luminescence / O. Kulakovich [et al.] // Nanotechnology. 2006. Vol. 17, № 20. P. 5201–5206.
2. Романенко, А. А. Плазмонное усиление люминесценции конъюгатов изотиоцианата флуоресцеина и иммуноглобулина человека / А. А. Романенко [и др.] // ЖПС.– 2014.– Т. 81, № 2.– С. 228–232.

ВЛИЯНИЕ МЕТАЛЛ-СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ «ЗЕЛЕННОГО» НАНОСИНТЕЗА, НА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ МИКРОКЛОНОВ *BETULA PENDULA* L. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Пржевальская Д.А.¹, Черныш М.А.¹, Костень А.А.¹, Колбанов Д.В.², Демидчик В.В.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Республиканское учебно-опытное унитарное предприятие БГУ «Щемяслица», Минск, Беларусь

e-mail: daryaprzhevalskaya@gmail.com

Наночастицы, полученные при помощи «зеленого» наносинтеза и с использованием биосовместимых реагентов, обладают рядом свойств, имеющих значительный интерес как с точки зрения фундаментальной науки, так и для прикладных разработок. Одним из направлений использования наночастиц, полученных с применением таких технологий является разработка новых регуляторов роста растений. Наши предварительные результаты (Sosan *et al.*, 2016, Plant Journal) и некоторые литературные данные указывают на росто- и иммуностимулирующую активность металл-содержащих наночастиц, введенных в среду выращивания в низких концентрациях.

Целью настоящей работы являлось установить характер влияния наночастиц и ионов серебра, меди и железа, а также медного балка на морфофизиологические параметры древесных растений в условиях *in vitro*. Объектом исследования являлась культура *in vitro Betula pendula* L., культивируемая на 100% среде Woody Plant Medium (WPM; Duchefa) с добавлением 0,3-300 мг/л наночастиц серебра; 0,3-300 мг/л ионов серебра; 0,1-3 мг/л наночастиц меди; 0,1-3 мг/л медного балка; 0,3-300 мг/л наночастиц железа. Для синтеза наночастиц использовались методы «зеленого» наносинтеза. В протоколе приготовления серебряных наночастиц в качестве восстановителя использовались L-аскорбиновая кислота и экстракт ели. Поливинилпирролидон (ПВП), полимер, отличающийся высокой биосовместимостью, был применен в качестве стабилизатора наночастиц. Для синтеза медных наночастиц стабилизатором выступал ПЭГ (полиэтиленгликоль), восстановителем также была L-аскорбиновая кислота. В случае с железными наночастицами, восстановителем и стабилизатором одновременно выступал экстракт кожуры арбуза.

Было испытано несколько протоколов наносинтеза, отобраны наиболее эффективные. На средах с введенными наночастицами в различных концентрациях анализировалось изменение длины корней и побегов (на 21 сут). Было продемонстрировано, что наночастицы серебра, приготовленные на основе L-аскорбиновой кислоты, в концентрации 30-300 мг/л стимулируют рост побегов *Betula pendula* L. и индуцируют корневое ветвление. Для ионов серебра наблюдались схожие результаты. Наночастицы серебра, синтезированные с помощью экстракта ели, оказывали максимальный стимулирующий эффект на ростовые параметры корней и побегов в концентрации 300 мг/л. Выраженное ингибирование роста микроклонов березы вызывало наличие в среде медных наночастиц либо балка в концентрации более 0,3 мг/л. Добавление в среду железных наночастиц от 30 до 300 мг/л способствовало развитию разветвленной корневой системы и побегов с широкими листовыми пластинами. Таким образом, в ходе проведенных исследований можно сделать следующие выводы: серебряные и железные наночастицы (30-300 мг/л), полученные с использованием методов «зеленого» синтеза, оказывают стимулирующее действие на рост побегов древесных растений в условиях *in vitro*, в то время как наличие в среде медных наночастиц и балка ингибирует рост и развитие растений.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АМФИФИЛЬНЫХ ДЕНДРОНОВ В ТЕРАПИИ ЛЕЙКОЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Терехова М.М.¹, Магiera Я.², Ионов М.², Цю Дж.³, Мажораль Ж.-П.³, Брышевска М.², Щербин Д.Г.¹

¹Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь, ²Кафедра общей биофизики, Факультет биологии и охраны окружающей среды, Лодзинский Университет, Лодзь, Польша, ³Лаборатория координационной химии, Национальный центр научных исследований, Тулуза, Франция

Амфифильные дендроны представляют собой разветвленные синтетические наночастицы, сочетающие в себе свойства мицеллярных структур и дендримеров. В зависимости от химической структуры, амфифильные дендроны способны связывать и доставлять в клетки определенные молекулы, например, миРНК для генетической терапии, что в перспективе дает возможность применять их в качестве векторов для таргетной доставки терапевтических препаратов в опухолевые клетки для лечения злокачественных новообразований. В данной работе исследованы некоторые свойства амфифильных дендронов с целью их возможного применения в терапии лейкозных заболеваний.

Амфифильные дендроны первой и второй генерации, различающиеся по фокальным и терминальным группам, были синтезированы в лаборатории координационной химии Национального центра научных исследований (г. Тулуза, Франция). В качестве модели лейкозного заболевания была взята клеточная культура промиелоцитарной лейкемии человека (линия HL-60). На ней была исследована цитотоксичность дендронов и их способность доставлять генетический материал в клетки. В результате было установлено, что на цитотоксичность сильнее всего влияет строение терминальных групп дендронов, немного менее – их генерация, тогда как строение фокальных групп практически не влияло на цитотоксичность. Наиболее токсичными оказались дендроны с пиперидиновыми терминальными группами, наименее токсичными – дендроны первой генерации с пирролидиновыми терминальными группами. Исследование способности амфифильных дендронов доставлять генетический материал на примере миРНК в клетки промиелоцитарной лейкемии показало, что с увеличением генерации возрастала степень интернализации. Так дендроны второй генерации доставляли меченую флуоресцеином миРНК в более чем 90% клеток, тогда как для дендронов первой генерации интернализация не превышала 30%.

Полученные в работе с клеточной культурой результаты были дополнены исследованиями влияния амфифильных дендронов на вторичную и третичную структуру таких белков плазмы крови, как альбумин и тромбин, а также исследованием гемотоксичности дендронов. Данные исследования показали, что дендроны первой генерации значительно меньше изменяют как третичную, так и вторичную структуры представленных белков, а также вызывают гемолиз при больших концентрациях, чем дендроны второй генерации. Эти результаты показывают, что, несмотря на большую эффективность интернализации, применение дендронов второй генерации ограничено их негативным влиянием на компоненты крови, поэтому наиболее перспективными для терапии лейкозных заболеваний представляются амфифильные дендроны первой генерации с пирролидиновыми терминальными группами.

Данная работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований и Госкомитетом РБ по науке и технологиям, грант Б20СЛКГ-002; Польским агентством NAWA, грант EUROPARTNER, No. PPI/ARPM/2018/1/00007/U/001.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ВТОРИЧНУЮ И ТРЕТИЧНУЮ СТРУКТУРУ ФОСФОЛИПАЗЫ A2

Терехова М.М.¹, Брышевская М.², Цю Дж.³, Мажораль Ж.-П.³, де ла Мата Ф.Х.⁴, Гомез Р.⁴, Щербин Д.Г.¹

¹Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь, ²Кафедра общей биофизики, Факультет биологии и охраны окружающей среды, Лодзинский Университет, Лодзь, Польша, ³Лаборатория координационной химии, Национальный центр научных исследований, Тулуза, Франция, ⁴Факультет координационной химии, Университет Алькалы, Алькала, Испания

Фосфолипаза A2 – один из ферментов группы фосфолипаз, относящейся к классу гидролаз. Фосфолипаза A2 катализирует отщепление ацильной цепи по sn2 положению в молекуле фосфолипида. В связи с тем, что фосфолипиды чрезвычайно широко представлены в живой природе, входят в состав всех клеточных мембран и играют критически значимую роль в жизнедеятельности организмов, роль фосфолипаз также охватывает огромную область, начиная от участия в сигнальных путях в клетке и заканчивая процессами пищеварения. В данной работе исследовано влияние различных наночастиц на вторичную и третичную структуры фосфолипазы A2.

Фосфолипаза A2 была получена из бычьей поджелудочной железы (Sigma-Aldrich, США). Изучено влияние на ее структуру трех наночастиц различной химической природы: фосфорсодержащие дендримеры (представлены дендримерами третьей генерации AE2G3), амфифильные дендроны (представлены дендронами второй генерации jql53), ПЭГирированные серебряные наночастицы (представлены наночастицами второй генерации с соотношением наночастицы:ПЭГ: 1:1 BDAB27). Влияние различных концентраций наночастиц на вторичную структуру фосфолипазы A2 было исследовано методом кругового дихроизма, на третичную структуру – методом триптофановой флуоресценции. Концентрации, при которых влияние наночастиц на вторичную структуру фосфолипазы A2 выходит на плато, оказались следующими: для дендронов AE2G3 – 2,5 мкМ, для дендримеров jql53 – 3 мкМ, для наночастиц BDAB27 – 0,5 мкг/мл. При этом дендримеры AE2G3 вызывали наиболее значительные изменения во вторичной структуре. Влияние исследованных наночастиц на конформацию фосфолипазы A2 существенно различалось. Так с увеличением концентрации дендримеров AE2G3 наблюдался линейный рост интенсивности максимума флуоресценции и быстрое смещение максимума в коротковолновую область (с 340 нм при 0 мкМ до 331 нм при 0,2 мкМ), после чего он оставался постоянным. При низких концентрациях дендронов jql53 (< 2 мкМ) наблюдалось снижение интенсивности максимума флуоресценции, при более высоких – возрастание с выходом на плато при ~17 мкМ. Также до концентрации 0,25 мкМ наблюдалось смещение пика в коротковолновую область (с 340 нм до 331), а затем – медленное смещение в длинноволновую область (до 334 нм). При добавлении BDAB27 наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции, которое до 10 мкг/мл происходило относительно резко, а при больших концентрациях – плавно. Положение максимума было нестабильным, но в целом незначительно смещалось в коротковолновую область. Таким образом, обнаружены существенные различия в действии "soft nanoparticles" (дендримеров и амфифильных дендронов) и "hard nanoparticles" (серебряных наночастиц) (данные термины предложены Д.А. Томаля) на вторичную и третичную структуру фосфолипазы A2. Полученные результаты могут иметь значение как при исследовании воздействия наночастиц на биосистемы, так и при изучении свойств фосфолипаз.

Данная работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований и Госкомитетом РБ по науке и технологиям, грант Б19АРМГ-002.

ИЗУЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ БИОЛОГИЧЕСКОГО И НЕОРГАНИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Челнокова И.А.^{1,2}, Ронишенко Б.В.³, Стародубцева М.Н.^{1,2}

¹ГНУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси», Гомель, Беларусь, ²УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь, ³ГНУ «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси» Минск, Беларусь

Активное развитие нанотехнологий привело к широкому практическому применению наноразмерных объектов в медицине и формированию целого направления - наномедицина. Органические наночастицы, например, экзосомы, используют в диагностике различных заболеваний и для таргетной доставки лекарственных препаратов в клетку-мишень. Неорганические наночастицы активно используют в качестве контрастирующих агентов в магнитно-резонансной и компьютерной рентгеновской томографии. Однако, в связи с наноразмерностью, идентификация различных типов наночастиц достаточно сложна. Метод атомно-силовой микроскопии является наиболее оптимальным и информативным для исследования такого рода частиц по ряду причин, включающих высокое пространственное разрешение, возможность работы в различных средах, получение информации не только о геометрических, но и механических свойствах наноразмерного объекта. Целью работы являлось выявление методом атомно-силовой микроскопии отличительных особенностей наночастиц биологического и неорганического происхождения.

В качестве бионаночастиц использовали экзосомы, выделенные из плазмы крови мышей линии Af методом последовательного ультрацентрифугирования с последующим нанесением на подложку свежесколотой слюды. Наночастицы серебра, нанесённые на поверхность модифицированной полиэтиленгликолем кремниевой подложки, использовали в качестве частиц неорганического происхождения. Исследование проводили с помощью атомно-силового микроскопа BioScope Resolve (Bruker) в режиме записи PeakForce QNM in Air, иглой-зондом SCANASYST-AIR. Записывали сканы размером 1 мкм × 1 мкм с разрешением 256×256 пикселей со скоростью 0,5 Гц. Карта сил адгезии записывалась в отдельный канал записи одновременно с записью топографической карты изучаемой поверхности. Обработку полученных сканов проводили с помощью программы NanoScope Analysis 1.8. Для оценки параметров адгезионных свойств наночастиц анализировали 120 участков их поверхности размером 25 нм × 25 нм.

Средние значения высоты, диаметра и площади свободной поверхности для наночастиц серебра были больше значений соответствующих параметров для экзосом. Отношение диаметра частицы к ее высоте, характеризующее степень расплываемости частицы, было существенно выше у экзосом. При этом, силы адгезии, измеренные между поверхностью наночастицы и острием АСМ-зонда, для экзосом (3,11(2,63;3,57) нН) были также существенно выше значений силы адгезии, характерных для наночастиц серебра (2,17(1,86;2,52) нН ($p < 0,038$)). Так как экзосомы с жидким содержимым снаружи окружены биологической мембраной, их адгезивная способность по отношению к острию кремниевых зондов выше в сравнении с жесткой поверхностью наночастиц серебра. Данные, полученные методом атомно-силовой микроскопии, свидетельствуют о существенных отличиях АСМ-параметров для наночастиц органического и неорганического происхождения. Метод атомно-силовой микроскопии может служить для идентификации наночастиц различной природы в системе содержащей частицы обоих типов.

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (№ договора Б20Р-427).

ВОЗДЕЙСТВИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ПРОТОКОРМОВ *PHALAENOPSIS* × *HYBRIDUM* BLUME, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO*

Черныш М.А.¹, Лазерко Н.В.¹, Пржевальская Д.А.¹, Жабинский В.Н.²,
Хрипач В.А.², Демидчик В.В.¹

¹ Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

² Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

В последние годы появились данные, указывающие на возможность применения в качестве регуляторов роста растений в условиях *in vitro* стероидных фитогормонов – брассиностероидов (БС). Для данной группы фитогормонов характерно модифицирующее влияние на рост и развитие растений, которое проявляется в исключительно низких действующих концентрациях (10^{-12} – 10^{-6} М). Для некоторых групп растений, таких как семейство Орхидные (крупнейшее среди покрытосеменных растений), потенциал использования брассиностероидов для контроля ростовых процессов не оценен. В этой связи целью настоящей работы было установить характер воздействия на рост и анатомические особенности *in vitro* культуры протокормов *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume шести важнейших БС. В представленной работе была усовершенствована и испытана экспериментальная модель для анализа процессов роста и развития орхидных на базе протокормов. Первичная культура протокормов была получена из семян *Phalaenopsis* × *hybridum* Blume с использованием асептических подходов. Протокармы, полученные из первичной культуры, переносились на среды, содержащие БС: брассинолид (БЛ), кастастерон (КС), 24-эпикастастерон (ЭК), 28-гомокастастерон (ГК), 24-эпибрассинолид (ЭБ) и 28-гомобрассинолид (ГБ) в концентрации 10^{-10} – 10^{-6} М; ауксины: индолил-3-уксусную (ИУК), индолил-3-масляную (ИМК), 1-нафтилуксусную (НУК) и 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоты (2,4-Д) в концентрации 0,1-1 мг/л; а также на среды, содержащие одновременно и БС, и ауксины в концентрациях 10^{-8} М и 1 мг/л соответственно. Анализ изменения ростовых параметров проводился на 100 сут с момента начала культивирования на гормон-содержащих средах. Введение в среду БС вызывало стимуляцию ростовых процессов, что выражалось в значительном увеличении длины протокормов и их массы. Наибольшее стимулирующее воздействие было отмечено при введении в среду БЛ и ЭБ в концентрации 10^{-7} М. Наблюдалось двукратное увеличение длины и трехкратный прирост биомассы по сравнению с контрольными образцами при культивировании протокормов на средах, содержащих БЛ и ЭБ соответственно. ГК и ГБ вызывали наименьшую стимуляцию роста по сравнению с другими исследуемыми БС. Неожиданным результатом, полученным в работе, было то, что воздействие БС на удлинение и набор биомассы превосходило по своей силе влияние ауксинов, в то время как совместное введение БС и ауксинов обладало антагонистическим эффектом. Также были проведены исследования, направленные на установление особенностей модификации анатомического строения протокормов под действием БС. Культивирование на средах, дополненных БС сопровождалось резким увеличением размеров и изменением формы паренхимных клеток протокормов с прямоугольной на шарообразную. Средний объем клеток, выращенных на фоне 10^{-7} М ЭБ, увеличивался по сравнению с контролем в 5-9 раз, что указывает на существенные перестройки в регуляции роста и развития клеток данной ткани в присутствии повышенных уровней БС. Таким образом, нами впервые было обнаружено и детально исследовано действие БС на рост и развитие Орхидных в культуре *in vitro* и выявлен крайне необычный паттерн модификации ростовых процессов у представителей данного семейства – стимуляция удлинения и набора биомассы протокормов.

ОБРАЗОВАНИЕ В ОБЛАСТИ БИОФИЗИКИ

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ БИОФИЗИЧЕСКИХ КОМПЕТЕНЦИЙ У СТУДЕНТОВ МЕДИЦИНСКИХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ

Белая О.Н., Гузелевич И.А.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Формирование предметных биофизических компетенций студентов становятся существенным элементом медицинского образования по причине использования количественных показателей во всех основных направлениях медицины: диагностики, лечения, реабилитации и профилактики заболеваний; возникновение и протекание ряда заболеваний рассматриваются как процесс, происходящий на молекулярном уровне. Помимо этого, количественной оценке подлежит также и состояние окружающей среды (природные и производственные факторы, как в обычных, так и в чрезвычайных ситуациях). Прослеживается также тенденция к существенному возрастанию аппаратных (инструментальных) методов диагностики и лечения, все большее количество диагностических и лечебных процедур удается формализовать. Современные медицинские исследования невозможны без симбиоза биофизических знаний, медицины и фармакологии. В свете этого курс «Медицинская и биологическая физика» в медицинских вузах призван обеспечить формирование и последующее применение указанных компетенций.

Курс медицинской и биологической физики базируется на школьном курсе физики, в связи с этим очень важны знания, полученные во время обучения в учреждениях общего образования, касающиеся основных физических законов и физических понятий. При этом в преподавании курса большое значение имеет методологическая направленность, которая должна формировать у студентов логическое мышление и ряд специфических умений.

Одним из важнейших понятий физики является понятие «энергия», которое широко используется и в других естественных науках – химии, биологии. Формирование понятия «энергия» имеет важное значение для развития у студентов научного мировоззрения и для формирования биофизических компетенций. Однако, в методике изучения данного закона в медицинском вузе существуют недостатки, заключающиеся в том, что не раскрывается должным образом его роль в науке и в технике, не осуществляется обобщение на заключительном этапе изучения физики.

В настоящее время систематический курс медицинской и биологической физики отличается высоким теоретическим уровнем. Возрастает роль теорий в обучении физике, а вместе с ними и роль фундаментальных законов, в частности закона сохранения и превращения энергии. При этом, наблюдается противоречие между необходимостью освещения вопросов энергообмена и методикой изучения этих вопросов, которая раскрывала бы сущностную сторону преобразований энергии в живом организме. В связи с этим возникает необходимость проанализировать роль закона сохранения и превращения энергии при обучении физике в курсе медицинской и биологической физики.

Решение данной проблемы будет способствовать повышению уровня знаний студентов по вопросам энергообмена организма человека с окружающей средой; осознание его сущности и применения в медицине; понимание роли закона сохранения и превращения энергии в биофизических процессах, происходящих в организме человека, изучаемых в курсе медицинской и биологической физики.

Библиографические ссылки

1. Медицинская и биологическая физика / В.Г. Лещенко, Г.К. Ильич. Минск: Новое знание; М.: ИНФРА-М, 2012. – 552 с.

ИННОВАЦИОННЫЕ ФОРМЫ ОБУЧЕНИЯ В КУРСЕ «БЕЗОПАСНОСТЬ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА»

Герасимова Л.К., Бичан О.Д., Мартинович И.В., Черенкевич С.Н.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Учебная дисциплина «Безопасность жизнедеятельности человека» (БЖЧ) относится к числу обязательных для изучения в вузах Республики Беларусь. В учебном плане физического факультета БГУ для направления специальности 1-31 04 01-01 Физика (научно-исследовательская деятельность, специализация «Биофизика») она входит в цикл общенаучных и общепрофессиональных дисциплин. Объем учебной дисциплины составляет 56 часов, в том числе 34 часа аудиторных занятий и 22 часа самостоятельной работы студентов. Аудиторные занятия распределены следующим образом: 20 часов – лекционные занятия, 10 часов – семинарские занятия и 4 часа – управляемая самостоятельная работа. Форма текущей аттестации – зачет. БЖЧ включает следующие разделы: «Основы экологии», «Основы энергосбережения», «Охрана труда». По курсу разработан учебно-методический комплекс [1] и другие учебно-методические материалы. Занятия проводятся на 1 курсе в 1 семестре.

В условиях постоянного нарастания потока общей и профессиональной информации при ограниченном времени, отводимом на изучение учебной дисциплины, возникает необходимость введения в педагогическую практику инновационных подходов, в том числе с использованием информационно-коммуникативных технологий (ИКТ).

На первом занятии проводится входное анкетирование студентов с помощью программы Mentimeter [2] для определения, насколько хорошо владеют студенты информационно-коммуникативными технологиями (ИКТ), какие технические средства доступны для самостоятельной работы и др. Данная программа используется также для текущего контроля качества усвоения знаний на лекциях по некоторым темам.

При подготовке к семинарским занятиям студентам рекомендуется использовать Интернет ресурсы соответствующих компетентных организаций. С этой целью студенты могут применять не только собственное оборудование, но и оборудование компьютерных классов физического факультета, а также читального зала библиотеки БГУ.

Для организации самопроверки знаний студентов, для проведения текущего контроля знаний и контроля самостоятельной работы в учебной дисциплине используется Образовательный портал БГУ на базе LMS Moodle 3.5.2. [3].

Опыт проведения занятий показал, что используемые активные формы обучения с применением интернет ресурсов в образовательном процессе дают возможность параллельного использования образовательных программных средств ИКТ на аудиторных занятиях и во внеаудиторной самостоятельной работе, а также позволяет активизировать работу студентов на занятиях и в процессе внеаудиторной самостоятельной работы.

Библиографические ссылки

1. Безопасность жизнедеятельности человека : учебно-методический комплекс [электронный ресурс] – Минск : БГУ, 2020. 95 с. Режим доступа: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/242299>.
2. Программа Mentimeter для проведения интерактивных опросов [электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.mentimeter.com/>.
3. Образовательный портал физического факультета БГУ [электронный ресурс] – Режим доступа: <https://eduphys.bsu.by/course/view.php?id=14>.

ОРГАНИЗАЦИЯ УПРАВЛЯЕМОЙ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ С ЭЛЕМЕНТАМИ ДИСТАНЦИОННОГО ОБУЧЕНИЯ НА КАФЕДРЕ МЕДИЦИНСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ

Голёнова И.А.

*Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет», Витебск, Беларусь*

В настоящий момент системы образования во всем мире принимают меры по организации образования в условиях пандемии коронавируса (COVID-19). В большинстве стран полностью или частично закрыты учреждения образования, а многие обучающиеся переведены на дистанционное обучение. Это коснулось и студентов УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», где в целях активизации учебно-познавательной деятельности и формирования у студентов умений и навыков самостоятельного приобретения и обобщения знаний, а также реализации мероприятий по профилактике и снижению распространения острых респираторных инфекций, в том числе вызванных COVID-19, на основании решения ректората организовано обучение в форме управляемой самостоятельной работы с элементами дистанционного обучения.

Организация управляемой самостоятельной работы с элементами дистанционного обучения на кафедре медицинской и биологической физики предусматривает:

- проведение групповых занятий с обучающимися в режиме on-line в соответствии с утвержденным расписанием;

- проведение индивидуальной работы с обучающимися с использованием ИКТ, направленной на контроль результатов учебной деятельности обучающихся.

В процессе организации управляемой самостоятельной работы с элементами дистанционного обучения (ДО) на кафедре медицинской и биологической физики используются следующие средства электронной информационно-образовательной среды, обеспечивающие взаимодействие преподавателя и обучающегося:

- on-line видеотрансляции (платформа Zoom) – для ежедневного проведения занятий и консультаций с обучающимися в режиме on-line;

- мессенджеры (Viber, Telegram, WhatsApp и др.) – для консультации обучающихся в любое удобное время;

- электронная почта – для обмена документированной информацией с преподавателями кафедры;

- тесты и задания в системе ДО (платформа Moodle) – для организации внеаудиторной самостоятельной работы студентов.

Для организации управляемой самостоятельной работы с элементами дистанционного обучения на кафедре медицинской и биологической физики:

- организовано создание специального блока на страницах всех ЭУМК дисциплин кафедры в системе ДО, информирующего студентов о проведении on-line занятий;

- размещены ссылки с указанием даты, времени, темы занятия, ФИО преподавателя и номеров групп на все занятия, проводимые в режиме on-line видеотрансляции в соответствии с расписанием;

- размещены методические материалы по каждой теме занятия (лекционные материалы, презентации, лабораторные работы, контрольные вопросы, тестовые задания, индивидуальные и групповые задания и т.д.);

- определены формы контроля (тесты, контрольная работа, индивидуальные задания и т.д.), а также порядок предоставления ответов обучающимися (on-line тестирование, электронное письмо на адрес преподавателя с решением контрольного или индивидуального задания).

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ЭУМК ПО ДИСЦИПЛИНЕ «БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИКА»

Голёнова И.А., Жукова С.Ю.

*Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет», Витебск, Беларусь*

В ходе реформирования системы образования в Республике Беларусь был сделан акцент на внедрении компетентностного подхода, реализация которого требует создания учебно-методических разработок и ресурсов нового уровня, основанных на современных технологиях обучения и оценивания знаний, умений и навыков студента, а также оценки сформированности компетенций. Одним из программных продуктов, позволяющих реализовать эти функции в учебном процессе, является виртуальная среда обучения Moodle. При разработке электронного учебно-методического комплекса «Биологическая физика» были реализованы многие современные подходы.

«Кроссустройственность»: элементы курса адаптированы для мобильных устройств. Также система дистанционного обучения (СДО) ВГМУ обеспечивает работу мобильного приложения для операционных систем Android и iOS, облегчающего работу с курсом за счёт поддержки оффлайн доступа к учебным материалам.

Полнота форм представления контента: учебные материалы размещены в различных формах, адаптированных не только для просмотра с мобильных устройств, но также для редактирования и печати. Например, лекционный материал размещается не только прикреплённым файлом, но и на основе ресурса «Страница». Таким образом студент получает на выбор наиболее удобную для него форму материала: для чтения на компьютере или распечатывания – файл, для просмотра с мобильного устройства – веб-страница.

Интеграция курса с внешними ресурсами: широко используется встраивание гиперссылок в элементы курса, что особенно удобно при интеграции с курсом материалов, размещаемых на онлайн-ресурсах образовательной тематики. Гиперссылка может быть размещена в визуальном режиме в курсе в любом поле, для которого предусмотрен встроенный редактор («TinyMCE» или «Atto»).

Активное использование элементов обратной связи позволяет интенсифицировать процесс обучения за счёт взаимодействия не только студентов и преподавателей, но и самих студентов между собой.

Контроль прохождения элементов курса в ЭУМК обеспечивается за счёт маркирования элемента курса как «завершённого» при получении студентом оценки выше определённого преподавателем предела.

Условный доступ к элементам курса позволяет спланировать процесс обучения за счёт задания требования выполнения определённого условия по работе с предыдущим элементом прежде чем приступить к последующему.

Мотивационные элементы (значки, сертификаты), приобретаемые после выполнения определённого задания, стимулируют интерес студентов к изучению дисциплины и позволяют формировать личное портфолио.

Онлайн формат ЭУМК делает возможным его использование в течение долгосрочного периода за счёт тенденции роста популярности веб-ресурсов и стремительного снижения использования оффлайн ресурсов по мере совершенствования возможностей доступа в Интернет.

В заключении отметим, что СДО ВГМУ, разработанная на основе системы Moodle, предоставляет широкие возможности для обучения и контроля студентов в процессе изучения дисциплины «Биологическая физика».

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В УЧЕБНОМ ПРОЦЕССЕ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА ВЫСШЕГО МЕДИЦИНСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ

Гольцев М.В., Кухаренко Л.В., Гольцева М.В.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Повышение качества высшего образования и приведение его в соответствие с мировыми стандартами является одной из важнейших задач, стоящих перед образовательной системой. Использование научно-исследовательской работы профессорско-преподавательского состава в процессе обучения является одним из путей решения столь важной задачи.

На кафедре медицинской и биологической физики Белорусского государственного медицинского университета проводятся научно-исследовательские работы по использованию атомно-силовой микроскопии (АСМ) в изучении медико-биологических объектов. В учебном процессе при проведении практических и лабораторных занятий по предметам «Биологическая физика» и «Медицинская и биологическая физика» используются результаты исследований морфофункционального состояния тромбоцитов, полученные с помощью АСМ. Так, совместно с кафедрой гистологии подготовлено и издано учебно-методическое пособие «Метод атомно-силовой микроскопии в исследовании процессов адгезии и агрегации тромбоцитов в норме». В данном пособии рассмотрены общие характеристики и ультраструктура тромбоцитов, представлены современные представления о механизмах агрегации тромбоцитов и тромбообразования, а также приводятся результаты визуализации процессов адгезии и агрегации тромбоцитов в норме с помощью АСМ (DimensionTM 3000 и Nanoscope IIIa). В лекционном материале курсов «Биологическая физика» и «Медицинская и биологическая физика», читаемых студентам всех факультетов, фотодинамической терапии посвящен отдельный раздел, в котором представлены результаты научных исследований генетически запрограммированной смерти клеток с помощью АСМ. Студентам наглядно показывается изменение морфологии поверхности клеток в ответ на воздействие разнообразных индукторов апоптоза на примере их АСМ-изображений: сморщивание клетки и ее фрагментацию; локальные выпячивания наружной мембраны, под которыми находятся остатки фрагментированного ядра; образование апоптических телец. В ходе лабораторной работы «Измерение малых объектов с помощью микроскопа» студентами используется программа позволяющая работать с изображениями клеток, полученными с помощью АСМ. Для полученного АСМ-изображения студент может определить расстояния между двумя выбранными точками на поверхности исследуемого биообъекта, построить профиль сечения поверхности, получить данные о высоте и ширине биообъекта, определить величины среднего значения шероховатости поверхности образца в пределах анализируемой области.

Таким образом, использование в учебном процессе результатов научных исследований, проводимых на кафедре медицинской и биологической физики, существенно улучшает такие показатели учебного процесса, как мотивацию изучения теоретического предмета, личную заинтересованность студента в овладении знаниями и его интерес к научно-исследовательской работе. Более того, использование в учебном процессе результатов научных исследований профессорско-преподавательского состава повышает уровень педагогического мастерства и позволяет не только проводить процесс обучения студентов на качественно новом уровне, но и знакомить их с новыми современными методами изучения медико-биологических объектов.

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ БИОФИЗИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНСКИХ УНИВЕРСИТЕТАХ

Гольцев М.В., Руденок В.В., Гольцева М.В., Кухаренко Л.В., Гузелевич И.А.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Необходимость биофизического образования в медицинских университетах состоит в формировании у студентов научных знаний о физических основах функционирования биологических тканей и о физических факторах воздействия на них, а также физических принципах современных методов диагностики и лечения и обосновывается двумя основными задачами.

Первая задача – обеспечение качества медицинского образования и медицинских услуг для населения Республики Беларусь на уровне мировых стандартов. В настоящее время все значимые исследования в мировой и отечественной медицине, при превращении современной клиники в высокотехнологичный комплекс, основаны на результатах научных достижений в области молекулярной биологии, биофизики, ядерной физики, материаловедения, а также медицинской информатики. Когда сегодня в здравоохранении ставятся задачи создания высокотехнологичных центров ядерной медицины, закупаются ускорительные комплексы для онкоцентров, системы ПЭТ, ЯМРТ и КТ, УЗ диагностики, спектрального и фотометрического анализа биоматериалов, лазерная хирургическая и терапевтическая техника, имплантируемые кардиостимуляторы-дефибрилляторы и т.д., необходимо осознавать, что без соответствующей квалификации специалистов и без высокоразвитой медицинской физики все это обречено на существенные трудности [1].

Вторая задача – обеспечение высокого уровня экспорта медицинских образовательных услуг на уровне мировых стандартов. Экспорт образовательных услуг сегодня входит в число важных приоритетов государственной политики как Беларуси, так и ведущих стран Евросоюза, а также США и Китая. Наибольшее число иностранных граждан обучается в том числе в Белорусском государственном (10%), и еще 3 медицинских университетах страны. Политические реальности нахождения в ЕвразЭС и Союзном государстве Беларуси и России с учетом того, что Беларусь 14 мая 2015 г. принята Болонский процесс таковы, что для конкурентности отечественного высшего медицинского образования и аффилирования дипломов необходимо иметь идентичную корреляцию с изучаемыми предметами в лучших мировых медицинских высших школах.

Также надо отметить, что последние годы параллельно с успехами в биофизическом образовании в медицинских вузах проявляются и негативные моменты. Ряд статистических исследований показал, что не более 15% абитуриентов имеют высокие базовые физические и математические знания, что свидетельствует о том, что сокращение изучения биофизики в системе отечественного высшего медицинского образования может привести к серьезным проблемам в освоении студентами современного наукоемкого медицинского оборудования, и поставить под вопрос конкурентность выпускников в процессе инновационного развития белорусского общества. В ряде случаев наблюдается непонимание и даже торможение представителями медицинского сообщества современных успехов научного прогресса в области биофизики. Очевидно, что соответствие позитивным тенденциям в мировом образовательном пространстве даст положительные последствия и для национальной системы медицинского образования. Все это, в конечном счете, ведет к повышению качества образования в соответствии с потребностями общества и личности, а также установленным современным нормам, требованиям и стандартам.

Библиографические ссылки

1. Инновационные обучающие технологии в медицине: сборник материалов Республ. науч.-практ. конф. с межд. участием./гл. ред.: проф. А.Т. Щастный. Витебск: ВГМУ, 2017. 767 с.

ФОРМИРОВАНИЕ НАВЫКОВ РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ В ПРОЦЕССЕ ОБУЧЕНИЯ СТУДЕНТОВ-ФИЗИКОВ В БЕЛОРУССКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ

Григорьева Д.В., Горудко И.В.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Сегодня существуют *различные мнения* в отношении перспективы использования атомной энергетики. Одни считают, что атомная энергетика должна быть исключена из энергетического баланса мирового сообщества как область, связанная с повышенным риском для жизни и здоровья человека и окружающей среды. Следуя данной концепции, по примеру Италии, правительство Германии планирует полностью отказаться от эксплуатации атомных электростанций (АЭС) и ядерных реакторов к 2022 г. Другие же считают, что атомная безуглеродная энергетика при условии ее безаварийного функционирования является не только экологически чистой, но и недорогостоящей. На сегодняшний день в 31 стране мира в общей сложности действуют около 450 ядерных реакторов, вырабатывающих порядка 10 % от всемирно генерируемой энергии, более 50 реакторов находятся на стадии строительства. Запуск первого блока Белорусской АЭС запланирован на июль 2020 г.

К настоящему времени установлено, что 70 % аварий на предприятиях ядерной энергетики связаны с так называемым «человеческим фактором». И уроки, извлеченные из аварий на АЭС, используются для повышения безопасности атомной энергетики. Так, в последние десятилетия сформировалось понятие «культуры безопасности» и было признано, что именно ее отсутствие явилось причиной многих трагедий на АЭС. Следовательно, работа на данных видах предприятий требует от специалистов, которых готовят в высших учебных заведениях, повышенной меры ответственности и высокой степени образованности в вопросах ядерной безопасности.

Процесс обучения студентов, будущих специалистов для работы на АЭС, включает в себя изучение ряда дисциплин, которые помогают начинающим специалистам получить достаточное количество знаний и умений, позволяющих оценивать риски, которые могут возникнуть на реальном объекте, уметь предупредить возникновение опасных и неблагоприятных ситуаций, а в случае их возникновения, уметь принять грамотные решения по нераспространению или ликвидации, как самой нестандартной в плане безопасности ситуации, так и ее последствий.

Студенты физического факультета Белорусского государственного университета получают представления о радиационной (ядерной) безопасности в рамках курсов лекций «Защита населения от чрезвычайных ситуаций. Радиационная безопасность», «Безопасность жизнедеятельности человека», особое внимание данному предмету уделяется при подготовке студентов, специализирующихся в области ядерной физики, в рамках курса «Ядерная безопасность». При изложении вопросов радиационной безопасности детально рассматриваются риски при использовании ядерных технологий и необходимость строгого соблюдения норм безопасности при их применении. Особое внимание уделяется ознакомлению с системой норм обеспечения безопасности на международном, региональном и национальном уровнях, а также с международными организациями, работающими в области безопасности ядерных и радиационных технологий. Детально изучается международная шкала происшествий на АЭС, а также основные аварии (АЭС ThreeMileIsland (США), Чернобыльская АЭС (СССР), АЭС Fukushima-1 (Япония)), опыт которых способствовал становлению понятия культура ядерной безопасности.

Работа выполнена в рамках ГП «Образование и молодежная политика» на 2016-2020 гг. (подпрограмма 10 «Подготовка кадров для ядерной энергетики»).

6 ПРОГРАММ И СЕРВИСОВ, КОТОРЫЕ МОЖНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ОНЛАЙН ЗАНЯТИЙ

Жукова С.Ю., Голёнова И.А.

Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск, Беларусь

Дистанционное обучение в настоящее время процветает. Современные технологии позволяют общаться со студентами по всему миру, а качество дистанционного обучения не хуже, чем на очном отделении. С помощью мобильных и компьютерных приложений вы можете легко использовать на онлайн занятиях наглядные пособия, проверять работу учащихся и исправлять их ошибки. Любой, кто решит проводить занятия онлайн, способен освоить данные программы. Однако их выбор полностью зависит от предмета, который вы преподаете.

В этой статье представлен обзор самых популярных и современных сервисов:

Moodle – бесплатная и широкоизвестная платформа дистанционного обучения. Здесь можно создавать текстовые лекции и опросы, размещать презентации и текстовые документы, проводить проверку знаний при помощи различных видов тестов. Нет возможности бесплатно вести конференции онлайн, но через гиперссылки легко объединить с другими платформами, как Zoom, например.

Zoom – самое популярное приложение при проведении онлайн занятий сегодня. Сервис доступен для систем Android, iOS, ПК и macOS. В Zoom можно активировать виртуальную доску, на которой можно писать, рисовать и строить схемы. Есть возможность демонстрировать экран или отдельные приложения. Сервис предусматривает возможность рисования и выделения поверх демонстрации экрана. Этот инструмент доступен как создателю конференции, так и ее участникам. В бесплатной версии ограничено время одной сессии до 40 минут и 100 человек.

Skype – программа, позволяющая организовывать чаты до 50 человек с голосовыми и видео-разговорами. Сервис включает в себя веб-версию, а также приложения для Android, iOS, ПК, macOS и Linux, что является наиболее универсальным вариантом с точки зрения выбора устройства. Кроме того, многие пользователи уже имеют Skype, а это значит, что не нужно устанавливать, настраивать и обучать использованию данного сервиса. Из удобств можно выделить демонстрацию экрана и чат. Из недостатков – приложение требует стабильное интернет соединение.

Discord – бесплатный мессенджер с поддержкой видеоконференций. Приложение реализовано для Windows, macOS и Linux, мобильное приложение — для Android, iOS. В Discord организовываются не групповые чаты, а более удобные каналы — текстовые или голосовые. Каналы могут быть как публичными, так и приватными (доступны только по ссылке). Благодаря такой системе можно удобно организовать учебный процесс, поделив студентов на курсы, группы и подгруппы. В Discord есть видеочаты и возможность демонстрировать экран. В видеоконференциях может участвовать до 50 человек.

Google Hangouts **Google Hangouts** – один из самых простых сервисов в подборке. Это видеочат с возможностью демонстрировать экран. Для создания конференции достаточно иметь аккаунт Google и открыть страницу сервиса, если вы используете компьютер. Пользователям устройств на iOS и Android придется установить приложение. В видеоконференциях может участвовать до 15 человек.

WhatsApp – доступен для Windows, macOS, iOS и Android. По функциям все стандартно: голосовые звонки, видеосвязь, обмен файлами, групповые аудио и видеоконференции. Из минусов - количество человек в конференции очень ограничено до 4 человек, удобно принимать отработки пропущенных занятий.

ОРГАНИЗАЦИЯ ОНЛАЙН ЗАНЯТИЙ С ПОМОЩЬЮ СЕРВИСА ZOOM: ПЛЮСЫ И МИНУСЫ

Жукова С.Ю.

Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск, Беларусь

Zoom в настоящее время – это один из самых популярных сервисов для проведения видеоконференций и онлайн-занятий. Его используют не только школы и университеты, но и бизнесы для проведения онлайн встреч и переговоров.

Сегодня компании и учреждения образования выбирают Zoom по ряду причин:

Бюджетность. Встроена возможность бесплатно проводить видеоконференции с продолжительностью до 40 минут и одновременным подключением до 100 человек.

Стабильность. Не смотря на резкую возросшую популярность данного сервиса, пока Zoom отлично справляется с тысячами конференций, которые идут одновременно.

Мобильность. Данное приложение можно бесплатно установить, как на компьютер, так и на мобильное устройство с операционными системами iOS или Android. Таким образом занятия можно проводить из любого места, главное иметь стабильный интернет.

Легкоуправляемость. Организатор конференции полностью руководит инструментами и процессом. Он может включать и выключать микрофон у себя и у всех участников, есть возможность включения или выключения видеоизображения. Он может назначить "помощника" – соорганизатора и у него также будут возможности включать и выключать микрофоны, но все инструменты в руках у руководителя.

Интерактивность. Организатор имеет возможность демонстрировать экран компьютера (телефона) полностью или отдельные элементы (приложения): презентация, браузер, галерея и др.. В настройках допускается дать возможность всем участникам делиться экранами или же включить ограничение, чтобы делать это мог только организатор. Во время демонстрации можно оставлять заметки на экране (подчеркивать, отслеживать). Демонстрацию экрана можно ставить на паузу в любой момент занятия.

Есть возможность проводить **запись видеоконференции** и в определенные моменты останавливать ее. Затем данное видео можно рассылать коллегам, руководству или учащимся, которые не могли присутствовать на данном занятии.

На ряду со столь убедительными плюсами конечно не обошлось и без минусов:

Популярность. Резкое увеличение числа пользователей (~ в 20 раз) многие считают большим минусом, так как это приводит к пока редким сбоям в работе системы. В связи с этим занятия приходится проводить в «непопулярное» время – вечерние часы и даже выходные дни.

Сложный интерфейс. Многие пользователи, в том числе и сотрудники кафедры медицинской и биологической физики ВГМУ, столкнулись с тем, что перед работой с Zoom нужно потратить достаточное количество времени на самостоятельное знакомство с приложением и это, несмотря на то, что в университете были организованы курсы «Интерфейс Zoom» отделом дистанционного обучения.

Хакерские атаки. Злоумышленники используют поддельные домены Zoom для распространения вредоносного ПО и получения доступа к чужим видеоконференциям. Это исключение из правил, но судя по мировой статистике такой негативный опыт уже имеется в ряде стран.

ПРИМЕНЕНИЕ МАТНСАД-ТЕХНОЛОГИЙ В МЕДИЦИНСКОМ ВУЗЕ ДЛЯ ОБУЧЕНИЯ ОСНОВАМ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПАНДЕМИИ КОРОНАВИРУСА

Клинцевич С.И., Лукашик Е.Я., Пашко А.К.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Вычислительная медицина и компьютерные расчётные модели приходят в медицинскую практику сегодняшнего дня. Поэтому одной из задач курса медицинской и биологической физики (МиБФ) является обучение основам математического моделирования. Традиционно данная задача решалась путём рассмотрения некоторых наиболее удачных и простых классических моделей. Изучение таких моделей обычно ведётся на уровне объяснения существующих логических схем и их математического описания в виде готовых уравнений, многие из которых не имеют аналитического решения. Одним из минусов такой «бумажной» модели является её статичность и отсутствие возможности имитационного моделирования явления, при котором варьируются и оптимизируются параметры модели, осуществляется прогнозирование.

Учитывая недостатки существующих методик, нами разработан новый методический подход. Сущность подхода заключается в использовании современной компьютерной среды MathCad, которая позволяет проводить имитационное динамическое моделирование. Другая особенность - применение образовательной платформы Moodle, которая включает в себя инструментарий для организации интерактивного обучения и дистанционного взаимодействия в системе «преподаватель-студент».

Для изучения особенностей интерактивного моделирования нами создана учебная математическая модель распространения инфекционных заболеваний (МРИЗ). Актуальность моделирования данного явления связана с последними событиями распространения инфекции COVID-19, которая приобрела масштабы пандемии. Любая математическая модель включает в себя наряду с математическими уравнениями целый ряд параметров, значения которых заранее неизвестны. Обычно параметры подбираются путём подгонки модели к имеющимся данным наблюдений. В этом отношении в ситуации с пандемией коронавируса исследователь находится в благоприятном положении – Всемирная организация здравоохранения ежедневно публикует мировую и региональную статистику по числу заболеваний и выздоровлений, а также смертность.

Работа студентов с моделью включает такие этапы: 1) изучение теории по модели; 2) математическую формулировку задачи; 3) выбор метода решения; 4) разработку алгоритма численного решения; 5) подбор параметров модели на основе данных ВОЗ; 6) расчёты и анализ полученных решений; 7) формулировку выводов и создание отчёта.

Проект МРИЗ оформлен в виде лабораторной работы с документацией по модели, набором вариантов индивидуальных заданий, бланка отчёта для оформления результатов численного моделирования, образцов отчёта. Кроме того, имеется набор видеофайлов, демонстрирующих конкретные приёмы работы в среде MathCad по созданию интерактивного документа, в котором реализован алгоритм задачи. Задания для лабораторных работ и результаты их выполнения размещаются на платформе Moodle УО «ГрГМУ».

Опыт применения предлагаемой методики на кафедре МиБФ показал её эффективность по сравнению с традиционной (бескомпьютерной) моделью. Важно, что в процесс обучения вносится исследовательский элемент и тем самым повышается мотивированность студентов к изучению математического моделирования. Кроме того, данный подход в обучении позволяет легко проецировать методику не только на аудиторные формы обучения, но и на дистанционное обучение.

ФОРМИРОВАНИЕ ИНФОРМАЦИОННО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ КОМПЕТЕНТНОСТИ СТУДЕНТОВ-МЕДИКОВ НА КАФЕДРЕ МЕДИЦИНСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

Клинцевич С.И., Пашко А.К.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

В условиях современной рыночной экономики в силу чрезвычайно высокой подвижности ее конъюнктуры работодатели заинтересованы в специалисте высокого интеллектуального развития. Формирования у будущих специалистов медицинского профиля информационно-технологической компетентности на кафедре медицинской и биологической физики обусловлена включением в программу учебных дисциплин «Информатика в медицине» и «Математическая статистика в медицине». Специфика материала учебного назначения и особенности методики его преподавания по указанным дисциплинам заключаются в том, что они ориентированы на формирование принципиально единой системы знаний, умений и навыков.

Формирование информационно-технологической компетентности студентов-медиков на учебных занятиях по дисциплинам «Информатика в медицине», «Математическая статистика в медицине» реализуется в процессе последовательной реализации следующих этапов: мотивационно-целевого, содержательно-деятельностного, результативно-оценочного.

Эффективность формирования информационно-технологической компетентности студентов медицинского университета на кафедре медицинской и биологической физики зависит от ряда педагогических условий: обеспечение непрерывности формирования информационно-технологической компетентности студентов при переходе из учреждения общего среднего образования в учреждение высшего, а затем в течение всего периода изучения данных дисциплин, обеспечение педагогически комфортной образовательной среды через индивидуальное сопровождение профессиональной подготовки будущих специалистов медицины, организованное на основе взаимодействия преподавателя и студентов в дидактической компьютерной среде, вовлечение студентов в процесс совершенствования содержания и методики преподавания дисциплин «Информатика в медицине», «Математическая статистика в медицине» через компьютерные форумы и опросы, профессионально-направленное обучение – форма активного обучения в учреждении высшего образования, суть которого состоит в том, что в обучении на языке наук и с помощью всей системы форм, методов и средств обучения последовательно моделируется профессиональное и социальное содержание (контекст) будущей профессиональной деятельности студента.

Профессиональная направленность обучения реализуется посредством частичного или системного создания профессионального контекста, постепенного насыщения содержания обучения элементами профессиональной деятельности, через его организацию в таких формах и видах деятельности, которые, соответствуя системной логике построения учебной дисциплины, моделируют познавательные и практические задачи профессиональной деятельности будущего специалиста.

Таким образом, формирование информационно-технологической компетентности обусловлено ее значимостью в профессиональной и учебной деятельности будущих медицинских работников, социальной потребностью в кадрах с высоким уровнем информационно-технологической компетентности. Соответственно дисциплины «Информатика в медицине» и «Математическая статистика в медицине» обеспечивают фундамент для развития информационно-технологической компетентности будущего медицинского работника.

АСПЕКТЫ ОРГАНИЗАЦИИ УЧЕБНОГО ПРОЦЕССА ПО ДИСЦИПЛИНЕ «МЕДИЦИНСКАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИКА» ПРИ ДИСТАНЦИОННОМ ОБУЧЕНИИ СТУДЕНТОВ ФАКУЛЬТЕТА ИНОСТРАННЫХ УЧАЩИХСЯ ГрГМУ

Копыцкий А.В., Хильманович В.Н.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

В связи со сложившейся в последнее время неблагоприятной эпидемиологической обстановкой студенты 1-го курса факультета иностранных учащихся Гродненского государственного медицинского университета (ГрГМУ) были переведены на дистанционную форму обучения. Таким образом, актуальной стала задача обеспечения дальнейшего непрерывного учебного процесса по дисциплине «Медицинская и биологическая физика» в новых условиях.

Для решения поставленной задачи кафедрой медицинской и биологической физики ГрГМУ были предприняты следующие действия. Во-первых, была выбрана платформа для обеспечения учебного процесса – модульная объектно-ориентированная динамическая обучающая среда «Moodle» [1], которая уже значительное время использовалась нашей кафедрой в качестве вспомогательного инструмента преподавания дисциплины «Медицинская и биологическая физика». Во-вторых, была определена методика преподавания дисциплины. Согласно этой методике студенты-иностранцы занимаются следующим образом: они знакомятся с теоретическим материалом занятия: для этого в их распоряжении есть учебные пособия и учебники в электронном виде, лекции в формате «pdf» или «pptx», видеоматериалы. После рассмотрения теоретических аспектов темы студенты переходят к выполнению практических заданий, оформленных в виде тестов. Каждый тест состоит из практических и теоретических заданий. Для быстрого создания тестовых заданий мы используем возможность импорта вопросов в среду Moodle из предварительно подготовленных текстовых документов (формата «gift»). Такой подход позволяет создавать тесты значительно быстрее, чем методы создания тестов через web-интерфейс среды Moodle, более того, это открывает широкие возможности автоматизации и масштабируемости процесса. Что мы и используем для автоматической генерации тестовых расчётных заданий. Для последнего нами была написана программа на языке программирования «R», состоящая из 4 модулей. Первый модуль содержит текст задания, второй модуль является генератором случайных чисел для каждого задания, третий – является генератором ответов (одного правильного и набора неправильных), четвертый модуль, наконец, предназначен для объединения данных, полученных от предыдущих программ, в готовый вопрос формата «gift». Таким образом, нам удаётся за короткое время сгенерировать большое количество уникальных тестовых расчётных заданий, что исключает возможность перебора ответов студентами, и заставляет их решать предоставленные задачи.

Добавим, что общение со студентами (обратная связь, консультации) осуществляется в рамках дистанционного обучения посредством электронной почты, системы личных сообщений среды Moodle, мессенджеров.

Таким образом, как уже показал опыт, выбранный нами подход является довольно эффективным методом дистанционного обучения студентов факультета иностранных учащихся по дисциплине «Медицинская и биологическая физика», позволяющим сполна использовать возможности образовательной системы Moodle.

Библиографические ссылки

1. Moodle - Open-source learning platform | Moodle.org [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://moodle.org/?lang=ru>. – Дата доступа: 14.04.2020.

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПРЕПОДАВАНИЯ МЕДИЦИНСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ В БГМУ

Лещенко В.Г., Инсарова Н.И., Королик Е.В., Мансуров В.А.

Белорусский государственный медицинский университет, кафедра медицинской и биологической физики, Минск, Беларусь

Современный врач должен быть интеллектуальной личностью с хорошо развитым аналитическим мышлением, способным активно и грамотно осваивать новейшие методы диагностики и лечения, основанные на современных физических технологиях. К сожалению нынешние студенты-первокурсники имеют недостаточную школьную подготовку по физике и математике, недостаточно мотивированы и плохо видят роль дисциплины «медицинская и биологическая физика» в системе своих будущих знаний.

В системе образования сейчас идет поиск новых образовательных технологий, новых методик повышения качества образовательного процесса [1-3]. Уход от традиционного урока через использование в процессе обучения новых технологий позволяет устранить однообразие образовательной среды и монотонность учебного процесса, создает условия для смены видов деятельности обучающихся.

Для повышения интереса студентов-медиков к изучению «медицинской и биологической физики» преподаватели показывают будущим врачам важность этой дисциплины на примерах из реальной медицинской практики. Студентам предлагается сделать сообщения, освещающие физические принципы некоторых современных методик лечения и диагностики. Преподаватели предлагают наиболее подготовленным студентам исходные материалы по теме, в том числе сайты Интернета и затем курируют подготовку этого сообщения в форме самостоятельной работы студентов.

В образовательном аспекте, такой подход мотивирует процесс, побуждающий студентов к продуктивной познавательной деятельности и активному освоению предмета изучения. Это также формирует положительное отношение к предмету, сопровождается активностью студентов в учебном процессе, умением ставить перспективные цели, предвидеть результат, преодолевать трудности на пути достижения цели.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Ковалевская Л. Организационно-педагогическая модель применения педагогической диагностики в процессе организации самостоятельной работы студентов //Высшая школа // 2018.№1. С. 41 - 46.
2. Захарова А.В., Поспелова Т.Б. О проблеме индивидуализации процесса формирования исследовательских компетенций студентов в высшей школе //«Alma mater» Вестник Высшей школы // 2018. №3. С. 66 - 70.
3. Макаров А.В. Инновационные образовательные системы в высшей школе: проблемы качественного развития. // Высшая школа // 2018. №2. С. 15-18.
4. Инсарова Н.И., Лещенко В.Г., Королик Е.В. и др. Опыт использования клинических данных при изучении медицинской и биологической физики в БГМУ // Сборник материалов научно-методологического семинара «Фундаментальная наука и образовательная практика» . 2019. С. 15-19.

ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРОВ ОПТИЧЕСКОГО ДИАПАЗОНА В КУРСЕ МЕДИЦИНСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

Лукашик Е.Я., Хильманович В.Н.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Актуальность. Применение интерактивных и дистанционных форм обучения с использованием компьютерных технологий и сети Интернет в лабораторном практикуме по медицинской и биологической физике требует пересмотра его приборного и программного обеспечения [1]. Акцент должен быть сделан на компьютеризированные лабораторные установки. Такой подход нами реализован по дисциплине «Медицинская и биологическая физика» в лабораторном практикуме по теме «Исследование спектров источников оптического излучения».

Цель. Разработка активной дистанционной методики обучения в лабораторном физическом практикуме по изучению спектров излучения, поглощения, флуоресценции.

Материалы и методы. Для изучения оптической спектроскопии используется малогабаритный спектрометр S100 (СОЛАР ЛС), предназначенный для спектрального анализа источников света в широкой спектральной области, охватывающей ультрафиолетовую, видимую и ближнюю инфракрасную области спектра (190-1100 нм). В комплекте со спектрометром используется программа “CCD Tool”, предназначенная для измерения и обработки спектров и позволяющая определять длины волны и полуширины спектральных линий. Возбуждение флуоресцирующих веществ: флуоресцина, эозина, родамина - осуществляется лазерным источником с длиной волны 409 нм (лазерная указка).

Результаты. Вначале преподавателем демонстрируется запись спектров нескольких отдельных источников, затем производится изменение конфигурации лабораторной установки для регистрации спектров флуоресценции, например, флуоресцина или спектров поглощения марганцовокислого калия. После ознакомления с принципом измерения и анализа спектров, а также просмотра видео с пошаговой инструкцией, студенты самостоятельно работают с прикладной программой “CCD Tool”, установленной на учебных компьютерах. Каждый студент выполняет индивидуальное задание по изучению пяти спектров, выбранных, из предварительно записанных, спектров различных источников: лампы накаливания, аргоно-ртутно-кварцевой, люминесцентной, неоновой, светодиодной ламп, солнца, а также одноцветных и трехцветных светодиодов, полупроводниковых лазеров, спектров фотолюминесценции и поглощения.

Выводы. Таким образом, реализуется активный метод обучения в виде исследовательских заданий, который легко реализуем и для дистанционной формы обучения с помощью сетевой платформы «Moodle». Студенты наглядно видят количественные и качественные особенности спектров различных источников оптического излучения, трансформацию спектров при флуоресценции и поглощении света. Использование персонального компьютера само по себе повышает интерес студента к изучаемому материалу и приобщает его к современным компьютерным информационным технологиям.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Хильманович В.Н. Активная демонстрация как элемент интерактивного электронного образовательного контента / В.Н. Хильманович, А.Е. Василевич, Н.В. Матецкий // Перспективы развития высшей школы: материалы X Международной науч.-метод. конф./редкол: В. К. Пестис [и др.]. Гродно: ГГАУ, 2017. С. 320-323.

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ УЧЕБНОГО ЭЛЕКТРОННОГО АТЛАСА КЛЕТОК КРОВИ НА ОСНОВЕ ИЗОБРАЖЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Стародубцева М.Н.^{1,2}, Надыров Э.А.², Челнокова И.А.^{1,2}, Шклярова А.Н.¹,
Кравцова И.Л.², Егоренков Н.И.²

¹ГНУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси

²УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

В настоящее время новые разработки с применением современного оборудования активно внедряются в учебный процесс, тем самым повышая качество образования и способствуя подготовке высококвалифицированных специалистов. Атласы клеток, включая атласы клеток крови, широко используются как в образовательных целях, так и в клинической практике. Они необходимы для лучшего понимания материала многих дисциплин, включая цитологию и гистологию, биологию и клеточную биофизику. В существующих на сегодняшний момент атласах клеток крови используют двумерные изображения клеток и их внутриклеточных структур, полученные с помощью световой микроскопии. Отдельные атласы, кроме традиционной световой микроскопии включают также изображения, полученные с помощью флуоресцентной и электронной микроскопии. Метод световой микроскопии является наиболее распространённым, если не единственным, применяемым при изучении клеток студентами медицинских и биологических ВУЗов на практических занятиях, так как является самым доступным и простым методом исследования.

Одним из наиболее современных методов исследования является атомно-силовая микроскопия (АСМ). АСМ имеет ряд преимуществ перед другими методами, позволяющих визуализировать клетки. Метод позволяет получать изображения поверхности целых клеток и микро- и наномасштабных участков её поверхности с высоким разрешением, позволяет работать как с фиксированными клетками на воздухе, так и с живыми клетками в жидкости, тем самым создавая максимально естественные условия для изучаемых клеток, позволяет также получать карты распределения важнейших биомеханических характеристик, таких как силы адгезии, модули упругости, деформация, диссипация механической энергии и т.д. для поверхностного слоя клеток. Дизайн учебного электронного атласа должен включать несколько уровней различной иерархии представления данных о клетке: (1) морфология поверхности целой клетки; (2) участки поверхности микромасштабного размера, представляющие характерные структуры (структуры цитоскелета клеток, расположенные под плазматической мембраной, например, лейкоцитов при активации); (3) микро- или наномасштабные участки поверхности клеток, представляемые как карты разных клеточных свойств. Используя подобный подход визуализации для каждого типа форменных элементов крови, студенты смогут (1) наглядно увидеть особенности клеточной поверхности, не видимые на обычных световых микрофотографиях, но важные для понимания функционирования клетки; (2) увидеть и соотнести топографию поверхности клетки и его подмембранную структуру, а также лучше понять особенности межклеточных взаимодействий в норме и при воздействии патогенных факторов (ионизирующее излучение, воздействие токсических веществ, бактериальные и вирусные патогены и др.).

Внедрение данного атласа в учебный процесс позволит повысить качество профессиональной подготовки будущих врачей и биологов. Использование данного атласа на практических занятиях сократит время при изучении особенностей морфологии и архитектоники форменных элементов крови, существенно повысит качество изучения вопросов, в том числе при дистанционном обучении, которое всё чаще внедряется в образовательный процесс.

К 90-ЛЕТИЮ МАРИИ ТИХОНОВНЫ ЧАЙКА – ИЗВЕСТНОГО УЧЕНОГО В ОБЛАСТИ ФИЗИОЛОГИИ ФОТОСИНТЕЗА



31 декабря 2019 г. исполнилось 90 лет со дня рождения Марии Тихоновны Чайка (1929-1997) – известного ученого в области физиологии и биохимии фотосинтеза, члена-корреспондента НАН Беларуси, доктора биологических наук, профессора.

Мария Тихоновна Чайка родилась в г. Горки Могилевской области в семье Тихона Николаевича Годнева – профессора Горецкой сельскохозяйственной академии. В 1946 г. она поступила на биологический факультет Белорусского государственного университета, где получила глубокие знания в области физиологии растений, включая проблемы фотосинтеза. После окончания университета с отличием в 1951 году Мария Тихоновна продолжила учебу в Москве в аспирантуре Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева под руководством профессора А.А. Прокофьева. В 1955 г. она защитила кандидатскую диссертацию на тему «Исследование влияния газового и светового режима на накопление жира в семенах мака масличного».

С 1955 до 1965 года М.Т. Чайка работала в Институте биологии АН БССР (в настоящее время Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси) в лаборатории биохимии растений под руководством академика А.С. Вечера и занималась изучением биогенеза нелистных пластид. В 1965 году М.Т. Чайка была утверждена в ученом звании старшего научного сотрудника по специальности «биохимия растений».

В 1967 г. Мария Тихоновна связала свою дальнейшую жизненную и творческую судьбу с Институтом фотобиологии АН БССР (в настоящее время Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси), где сначала работала в должности старшего научного сотрудника. В эти годы исследования М.Т. Чайка были посвящены выяснению функциональной активности пластид и изучению биогенеза фотосинтетических мембран хлоропластов. М.Т. Чайка была инициатором применения иммунохимических методов в работах по изучению биосинтеза белковых компонентов пигментного аппарата растений, которые начали успешно развиваться в институте. Благодаря успешному сочетанию традиционных приемов изучения биосинтеза пигментов с возможностями анализа структуры и функций белковых компонентов аппарата фотосинтеза были получены оригинальные научные результаты, которые легли в основу докторской диссертации М.Т. Чайка на тему «Исследование биосинтеза хлорофилла и биогенеза пигмент-белковых комплексов пластидных мембран», успешно защищенной в 1978 г.

В 1981 г. по инициативе члена-корреспондента АН СССР А.А. Шлыка в Институте была создана новая лаборатория физиологии фотосинтетического аппарата, которую возглавила доктор биологических наук М.Т. Чайка. Главным научным направлением новой лаборатории являлось изучение физиологических основ формирования фотосинтетического аппарата и его взаимосвязей с высокой продуктивностью и устойчивостью растений хлебных злаков. Успешному развитию данного научного направления способствовали выполненные ранее фундаментальные исследования биогенеза фотосинтетических мембран при переходе растений от гетеротрофного к автотрофному существованию.

Под руководством М.Т. Чайка сотрудниками лаборатории было показано, что ранние этапы биогенеза фотосинтетических мембран в зеленеющих проростках ячменя осуществляются главным образом на базе белков этиопластов. Были получены доказательства возможности синтеза апобелков реакционного центра фотосистемы 1 (РЦ ФС 1) и светособирающего комплекса фотосистемы 2 (ССК-2) в отсутствие хлорофилла. Обнаружена несинхронность в накоплении хлорофилловых пигментов и апобелков реакционного центра фотосистемы 1 и ССК-2 в ответ на активирование фитохромной системы в зеленеющих проростках, что указывало на разные механизмы фоторегуляции пигментного и белкового состава этих комплексов. Впервые было установлено, что координация сборки комплекса ССК-2 регулируется на посттрансляционном уровне непосредственно в месте его локализации в мембране. Впервые экспериментально доказано участие в синтезе хлорофилла в зеленых листьях протохлорофиллид-оксидоредуктазы (ПОР), идентичной ферменту, присутствующему в этиопластах. ПОР была обнаружена в различных внутривулкостных компартментах зеленых листьев, включая фотосинтетические мембраны и пластидную оболочку, и не являлась интегральным компонентом пигмент-белковых комплексов. Было установлено, что стадия включения ПОР в систему биосинтеза хлорофилла является определяющей в регуляции биосинтеза пигмента при переходе от темноты к свету.

По инициативе М.Т. Чайка в лаборатории были начаты исследования биогенеза фотосинтетических мембран в разных фотосинтезирующих органах растений, получены новые данные об органоспецифических особенностях регуляции пластидогенеза и установлена иерархия основных регуляторных процессов. Полученные результаты нашли отражение в монографиях М.Т. Чайка, Г.Е. Савченко «Биосинтез хлорофилла в процессе развития пластид» (1981) и в коллективной монографии Н.Г. Аверина, А.Б. Рудой, Г.Е. Савченко, Л.И. Фрадкин, М.Т. Чайка и др. «Биогенез пигментного аппарата фотосинтеза» (1988).

Результаты изучения основных компонентов системы биосинтеза хлорофилла, их пространственной локализации и регуляторных аспектов биогенеза фотосинтетических мембран хлоропластов послужили основой для исследований фотосинтетической функции на уровне клетки, целого растения и посева. Основная задача данных исследований состояла в выяснении корреляционных взаимосвязей фотосинтетической деятельности злаковых растений с продуктивностью и возможностями использования фотосинтетических показателей в селекции.

В 1982 году совместно с коллегами из Белорусского научно-исследовательского института земледелия Госагропрома БССР (в настоящее время РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию») были выполнены исследования фотосинтетического аппарата у растений ряда сортов ярового ячменя, отражающего ход сортосмены этой культуры в Беларуси за 30 лет (1955-1985 гг.). В условиях контрастных ценотических взаимодействий (загущенный и разреженный посевы) были выявлены разные адаптивные возможности фотосинтетического аппарата у экстенсивных и интенсивных сортов ячменя как на уровне агрофитоценоза, так и первичных фотосинтетических процессов и определен вклад фотосинтезирующих систем разной сложности (фотосинтетических мембран, листа, растения и посева) в формирование продуктивности растений ячменя. Обнаружены

положительные корреляционные взаимосвязи между показателями морфоструктуры, содержанием фотосинтетических пигментов на разных уровнях организации фотосинтетического аппарата и зерновой продуктивностью ячменя и разработаны критерии ранней диагностики перспективных для селекции форм ярового ячменя по фотосинтетическим показателям.

Начиная с 1988 года совместно с Институтом генетики и цитологии АН БССР и Белорусским научно-исследовательским институтом земледелия Госагропрома БССР под руководством М.Т. Чайка был выполнен цикл работ по изучению организации пигментного аппарата тритикале (искусственно полученной зерновой культуры со сложным полигеномом), в результате которого было установлено, что низкая реализация потенциала продуктивности тритикале в нашей республике связана, главным образом, со снижением фотосинтетической активности единицы площади листовой поверхности, при заметном увеличении содержания хлорофилла в листе. Полученные результаты изложены в коллективной монографии М.Т.Чайка, В.Н. Решетников, А.К. Романова и др. «Фотосинтетический аппарат и селекция тритикале» (1991). В этот же период было начато изучение характера наследования пигментных признаков у гибридов тритикале, а также корреляционных взаимодействий между пигментными показателями, ростом и зерновой продуктивностью этой новой зерновой культуры. Были обнаружены достоверные генотипические различия по содержанию пигментов и показателям ультра- и мезоструктурной организации пигментного аппарата у форм и гибридов озимого гексаплоидного тритикале. Показана высокая генетическая изменчивость признаков «содержание хлорофилла *a*» и «соотношение хлорофилл *a*/хлорофилл *b*», что позволило использовать данные признаки в практической селекции.

М.Т. Чайка стояла у истоков разработки и внедрения в практику нового технологического приема – инкрустации семян зерновых культур с использованием многокомпонентных полимерных составов. Под ее непосредственным руководством в 80-х годах прошлого столетия было начато изучение физиологического действия многокомпонентных составов для предпосевной обработки семян на основе физиологически активных веществ отечественного производства. Впервые в республике были созданы защитно-стимулирующие составы на основе экологически безопасных регуляторов роста (гуминовых, кремневых и меланоидиновых препаратов, янтарной кислоты, брассиностероидов), изучены механизмы действия и разработаны технологические регламенты использования. Это обеспечило стабильное получение высоких урожаев зерна, повышая устойчивость растений к неблагоприятным природным условиям, импортозамещение и снижение химической нагрузки на почву и окружающую среду.

Плодотворная и активная научная деятельность Марии Тихоновны и руководимого ею коллектива способствовали выяснению роли фотосинтетического аппарата в системе целого растительного организма, а также многих аспектов фотосинтетической деятельности растений, обеспечивающих высокую продуктивность и устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Мария Тихоновна проводила большую работу по подготовке научных кадров, в том числе для вузовской науки, оппонировала диссертации во многих научных центрах республики и за ее пределами. Она была талантливым педагогом, воспитавшим 8 кандидатов наук.

Заслуги М.Т.Чайка в развитии физиологии и биохимии фотосинтеза были отмечены высокими правительственными наградами – Грамотой Верховного Совета БССР (1979 г.), медалью «Ветеран труда» (1985 г.), медалью «За трудовую доблесть» (1989 г.). В 1991 году М.Т. Чайка была избрана членом-корреспондентом НАН Беларуси, а в 1992 году ей было присвоено ученое звание профессора по специальности «физиология растений».

М.Т. Чайка – автор более 120 научных работ, в том числе 3 монографий. Многие ее труды получили широкую известность среди ученых-фотосинтетиков. Она многократно выступала с докладами на ответственных научных форумах, в том числе с лекцией «Биосинтез хлорофилла и биогенез фотосинтетического аппарата», прочитанной в 1993 году на 54-х ежегодных Тимирязевских чтениях в Москве в честь 150-летия со дня рождения великого ученого и изданной в 1996 году в виде брошюры. Достоянная продолжательница научных идей своего отца, глубоко преданная науке, она постоянно придерживалась традиций белорусской школы фотосинтетиков и фотобиологов, принимала деятельное участие в организации ежегодных Годневских чтений в Минске и издании книги воспоминаний о Тихоне Николаевиче Годневце.

Важнейшими чертами научного портрета Марии Тихоновны Чайка являлись глубокая преданность науке, новаторство, умение выделять главное, широкий научный кругозор и научное предвидение. Успешной реализации новых идей и научных направлений способствовали широкие научные связи и высокая научная активность. М.Т. Чайка пользовалась всеобщей любовью и уважением среди многочисленных коллег и людей, с которыми ее сталкивала жизнь. Она много сделала для развития исследований фотосинтеза в нашей республике, и ее ученики и коллеги активно продолжают эти интересные и важные исследования.

Имя члена-корреспондента НАН Беларуси Марии Тихоновны Чайка, посвятившей свою жизнь изучению строения, формирования и функционирования фотосинтетического аппарата растений и внесшей значительный вклад в становление и развитие физиологии и биохимии фотосинтеза, по праву занимает почетное место в ряду известных имен белорусской школы фотосинтетиков и фотобиологов.

Волотовский Игорь Дмитриевич,
Слобожанина Екатерина Ивановна,
Кабашникова Людмила Федоровна,
Аверина Наталья Георгиевна

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Ajeeb Y.H., 159
Angelis K.J., 80
Barczewski M., 63
Baruah K., 57
Batyuk L.V., 64
Bechelany M., 201
Bilyavska N.O., 62
Bolotine L.N., 202
Borisov K.N., 202
Brzostek A., 23
Chelnokova I.A., 102
Davidovskii A.I., 26, 27
Demidchik Vadim, 61
Dudko A.R., 21, 22
Dziadek J., 23
Faletrov Y.V., 21, 22, 23, 24
Fediuk O.M., 62
Frolova N.S., 21, 22, 24
Gladkov L.L., 159
Gorbenko G.P., 25
Gröger R., 63
Guereschi C., 202
Harmaza Y.M., 201
Horetski M.S., 21, 22, 23
Huang Xin, 61
Iatsunskyi I., 201
Karachrysafi S., 102
Karampatakis V., 102
Kirilov G., 25
Kirilova E., 25
Kizilova N.N., 64
Klenitsky D.V., 159
Klopava V.A., 24
Komnenou A., 102
Kravchenko I.E., 202
Kruk M.M., 159
Kukharensky L.V., 63
Kulahava T.A., 24
Lassalle H.-P., 202
Maes W., 159
Мотылева С.М., 182
Panada J.V., 24
Papamitsou Th., 102
Petrova D.V., 159
Plocinska R., 23
Sarma B.-K., 57
Schimmel Th., 63
Semeikin A.S., 159
Shklierava N.M., 102
Shkumatov V.M., 21, 22, 23, 24
Shman T.V., 63
Sioga A., 102
Smolich Igor, 61
Starodubtseva M.N., 102
Tamashevski A.V., 201
Tarabara U.K., 25
Tarasova A.V., 63
Trusova V.M., 25
Urban V.A., 26, 27
Veresov V.G., 26, 27
Vershilovskaya I.V., 159
Vus K.O., 25
Walheim S., 63
Yakavets I.V., 202
Yu Min, 61
Zhytniakivska O.A., 25
Абашкин В.М., 203, 204
Абдуллаева А.Б., 162
Абрамов А.А., 135
Абрамчик Л.М., 160, 179, 185
Аверина Н.Г., 161, 174
Агейко С.А., 58
Азизов И.В., 162
Алешин С.В., 168
Ананич Т.С., 86, 121
Антипова О.А., 143
Антоневич Н.Г., 147, 154, 155
Арабей С.М., 28, 55
Артемяева Ю.Н., 43, 207
Артюхов В.Г., 49
Балабин Ф.А., 52, 138
Барковский А.В., 30
Барсукова М.В., 32
Барулин Н.В., 86
Басырева Л.Ю., 103, 107, 114
Бачище Т.С., 65, 66, 160
Башура А.М., 119
Белая О.Н., 217
Белевич Е.И., 104, 105
Белько Н.В., 106, 122, 137, 205
Березин Д.Б., 116
Бесчасный С.П., 67
Биричевская Л.Л., 43, 207
Бич Н.Н., 29
Бичан О.Д., 218
Болдова А.Е., 68
Боме Н.А., 163
Бондаренко А.В., 59
Бондаренко В.Ю., 30, 42
Брышевская М., 203, 204, 212, 213

Буганов О.В., 57
 Будаговская О.Н., 164, 165
 Будаговский А.В., 164, 165
 Будаговский И.А., 165
 Булай П.М., 78
 Бушмакина И.М., 155
 Ванин А.Ф., 139
 Василевич И.Б., 32, 142, 143, 144, 148, 150, 151
 Василевская Е.Д., 43, 207
 Васильев Г.А., 70
 Вахрушева Т.В., 107, 108, 114
 Вейко А.Г., 71
 Венская Е.И., 109, 117
 Вершиловская И.В., 166
 Ветошкин А.А., 31
 Викс Т.Н., 167
 Винтер М.А., 207
 Войнаровский В.В., 110
 Войтехович М.А., 42, 72
 Волотовский И.Д., 32, 33, 35, 37, 54, 93, 142, 143, 144, 145, 148, 150, 151, 152, 153, 156
 Воропай Е.С., 46, 132
 Вчерашняя А.В., 111
 Вязов Е.В., 168, 190
 Габриелян Л.С., 169, 206
 Галюк Е.Н., 112
 Ганцева А.Р., 73
 Ганцева Е.Р., 73
 Гапеева Т.А., 32, 33, 54
 Гармаза Ю.М., 74, 105
 Гарсон Д.А.К., 70, 75
 Гасимова Ф.И., 162
 Гасюк Е.Н., 67
 Герасимова Л.К., 218
 Герловский Д.О., 43, 207
 Гилевич С.Н., 41
 Гинс М.С., 182
 Глебович Т.С., 46
 Глухова А.А., 89
 Говорова Ю.С., 34
 Гоголева С.Д., 57
 Голёнова И.А., 219, 220, 224
 Головач Н.Г., 36
 Гольцев М.В., 126, 221, 222
 Гольцева М.В., 120, 221, 222
 Гомез Р., 203, 204, 213
 Гончарик Р.Г., 168, 190
 Гончаров А.Е., 147, 154, 155
 Горбачевская Е.В., 170
 Горбунов Н.П., 76, 113
 Городецкая Е.А., 127
 Горох Г.А., 98
 Горохова Н.И., 35
 Горудко И.В., 108, 113, 129, 138, 223
 Графская Е.Н., 107, 108
 Григорьева Д.В., 108, 113, 129, 138, 223
 Гриусевич П.В., 31, 77, 85
 Грошева Е.В., 165
 Губина Л.П., 132
 Гузелевич И.А., 217, 222
 Гулюта И.А., 157
 Гусаков Г.А., 122, 205
 Гусев С.А., 103, 107, 114
 Гюльханданян А.Г., 50
 Гюльханданян Г.В., 50
 де ла Мата Ф.Х., 203, 204, 213
 Демидчик В.В., 30, 31, 42, 72, 77, 80, 82, 85, 88, 90, 92, 95, 211, 215
 Денисов А.А., 78, 79, 84
 Джагаров Б.М., 41, 50, 196
 Джумова М.Ф., 144
 Дитченко Т.И., 146
 Дмитриев А.П., 81
 Довбнюк Ю.Н., 186
 Доманская И.Н., 171, 179, 199
 Доманский В.П., 172
 Домашевич Е.В., 115
 Досина М.О., 79
 Дремза И.К., 36
 Дремук И.А., 161
 Дубко А.Д., 157
 Дубровина О.А., 175
 Дудинова О.Н., 173
 Дудылина А.Л., 131, 139
 Дьяченко П.А., 49
 Егоренков Н.И., 91, 231
 Елизарова А.Ю., 113
 Емельянова А.В., 174
 Ермилова Т.И., 116
 Ермоленко Д.А., 37
 Ерофеева А.-М.В., 143, 148
 Жабинский В.Н., 92, 215
 Жаворонок И.П., 143, 150, 151
 Жук О.Н., 115
 Жукова С.Ю., 220, 224, 225
 Жуковская В.А., 120
 Заводник И.Б., 36
 Заводник Л.Б., 36
 Закоян А.А., 50
 Залашко Л.М., 132
 Зафранская М.М., 149, 157
 Звонарев С.Н., 80

Зенков Н.К., 124
 Зинченко А.И., 207
 Золотарева Е.К., 38, 48, 83
 Зорин В.П., 208
 Зорина Т.Е., 116, 208
 Зубкова Т.В., 175
 Зубрицкая Г.П., 109, 117
 Ибрагимов У.Ф., 162
 Иванов А.А., 120
 Иванов В.А., 108
 Иванова М.В., 131
 Иванова Ю.Б., 166
 Ивашин Н.В., 176, 177
 Ильич Т.В., 36, 39
 Ильючик И.А., 178
 Инсарова Н.И., 229
 Ионов М., 212
 Кабачевская Е.М., 54, 93
 Кабашникова Л.Ф., 167, 179, 182, 185
 Каленикова Е.И., 127
 Каляга Т.Г., 180
 Канаш Ю.С., 105
 Карпец Ю.В., 100
 Касперович Е.С., 80
 Касько Л.П., 118
 Квачева З.Б., 144
 Киреев И.И., 183
 Кленицкий Д.В., 181
 Климкович Н.Н., 104, 117
 Климович И.И., 36
 Клинецевич С.И., 226, 227
 Кнюкшто В.Н., 50
 Коблов И.В., 116, 208
 Коваленко Е.И., 209
 Коваленко Т.А., 73
 Коваленя Т.А., 36, 39
 Кожич Д.Т., 28
 Козак Н.В., 182
 Козарезова Т.И., 104, 117
 Козел Н.В., 180, 187, 190, 197
 Коктыш В.Т., 119
 Коктыш И.В., 119, 210
 Колбанов Д.В., 95, 211
 Колоколова Н.Н., 163
 Колупаев Ю.Е., 81, 100
 Кондратьева В.В., 65
 Копыцкий А.В., 228
 Корнейчук А.Д., 75
 Коробкина Ю.Д., 40
 Королев К.П., 163
 Королик Е.В., 120, 229
 Космачевская О.В., 139
 Кособрюхов А.А., 195
 Костевич В.А., 76, 113
 Костень А.А., 211
 Костюк Н.И., 32
 Кохан А.Ю., 138
 Кравцова И.Л., 231
 Кравченко И.Е., 116, 208
 Креславский В.Д., 195
 Крицкий М.С., 184
 Крук Н.Н., 166, 181
 Крученюк Ю.В., 121
 Ксендзова Г.А., 149
 Кубарко А.И., 123
 Кузив Ю., 208
 Кузнецова Т.Е., 143, 148
 Кулагова Т.А., 209
 Кулакович О.С., 210
 Куликов Е.А., 168
 Кулинкович А.В., 72
 Кутько А.Г., 117
 Кухаренко Л.В., 221, 222
 Куцевол Н., 208
 Лавыш А.В., 46, 57
 Лазарев В.Н., 107, 108
 Лазерко Н.В., 30, 95, 215
 Лакомкин В.Л., 135
 Ландо Д.Ю., 112
 Лапшина Е.А., 36
 Лацис И.А., 107, 108
 Лепешкевич С.В., 41, 196
 Леусенко И.А., 86
 Лещенко В.Г., 229
 Липницкий О.М., 119
 Литвинко Н.М., 43, 207
 Лицкевич К.С., 82
 Лобай М.В., 149, 157
 Лобышев В.И., 44, 45
 Логвинович П.Н., 28
 Ломако Ю.В., 32
 Лубневская Г.Г., 120
 Луговский А.А., 46, 57, 122, 132, 205
 Луговский А.П., 122
 Лукашевич В.А., 90
 Лукашик Е.Я., 226, 230
 Лукьяненко Л.М., 109, 118
 Лычагина Ю.А., 46
 Люлькович Е.С., 166
 Магиера Я., 212
 Маес В., 181
 Мажораль Ж.-П., 212, 213
 Макаров В.Н., 66, 160
 Максимов Д.И., 114

Малеева Ю.В., 184
 Мананкина Е.Е., 170, 190
 Мансуров В.А., 123, 229
 Мартинович Г.Г., 110, 111, 124
 Мартинович И.В., 111, 124, 218
 Мартынова М.А., 155
 Мартысюк А.В., 66, 186
 Мартыянов А.А., 89
 Марченко Л.Н., 144
 Маскевич А.А., 46, 57
 Маскевич С.А., 210
 Маслова Г.Т., 115
 Маслова М.В., 165
 Матиевский К.А., 145
 Матюшкина Д.С., 108
 Мацкевич В.С., 42, 80, 82, 88, 95
 Медведев О.С., 127
 Медведева В.А., 131
 Меджидова К.М., 146
 Мелеховец Е.В., 47
 Мельникова Я.И., 210
 Меньщикова Е.Б., 124
 Микулич А.В., 86
 Миловска К., 204
 Минич Я.С., 147, 155
 Мирончик М.И., 126
 Мисюкевич А.Ю., 33, 37, 54
 Михайленко Н.Ф., 48
 Михайлопуло И.А., 43, 207
 Мкртчян Л.В., 50
 Мокросноп В. М., 83
 Молчанова А.Ю., 142, 143, 148, 150, 151
 Морозова И.Л., 148
 Мотылёва С.Ю., 175
 Муллоев Н.У., 97
 Мурина М.А., 125, 130
 Надыров Э.А., 231
 Наёкова С.К., 95
 Назимова С.В., 69, 134, 140
 Насек В.М., 132, 133
 Насыбулина Э.И., 139
 Неверов К.В., 183, 184
 Нехаев И.С., 49
 Нечипоренко А.Н., 150
 Нечипоренко Н.А., 150
 Нижегородова Д.Б., 149, 157
 Никандров В.Н., 115, 178
 Никифоров А.В., 78, 84
 Николаева-Киселевич А.И., 126
 Нитиевский В.А., 77
 Новаковская С.А., 150, 151
 Новосельский И.Ю., 31, 77, 85
 Обернихин С.С., 69, 134, 140
 Оболенская О.Н., 127
 Обухов Ю.Н., 184
 Олешкевич А.А., 136
 Онойко О.Б., 48
 Осипов А.Н., 136
 Островский Е.М., 114
 Павич Т.А., 28
 Панасенко О.М., 103, 107, 108, 114, 129
 Панкова С.М., 49
 Пантелеев М.А., 52, 73, 89
 Пархоменко В.А., 122
 Пархоц М.В., 41, 50
 Пашкевич Л.В., 51, 185, 186
 Пашкевич С.Г., 78, 79
 Пашко А.К., 226, 227
 Пащенко И.А., 52
 Педзивиатр-Вербицка Э., 203, 204
 Петров П.Т., 106, 132, 133
 Печенкина Е.И., 187, 190
 Пинчук С.В., 32, 35, 142, 143, 145, 148, 150, 151
 Питлик Т.Н., 78, 84
 Плавская Л.Г., 86
 Плавский В.Ю., 86, 121, 173
 Плотникова А.О., 166
 Побат В.С., 124
 Побойнев В.В., 128
 Поводайло В.А., 87
 Позняк Г.И., 53
 Полешко А.Г., 35, 37, 152, 153, 156
 Полищук А.В., 191, 192
 Пржевальская Д.А., 30, 95, 211, 215
 Прусов А.Н., 183
 Пуховская С.Г., 166
 Пшибытко Н.Л., 188
 Рассадина В.В., 189
 Рекиш А.Л., 82
 Ремеева Е.А., 43, 207
 Реут В.Е., 129
 Ринейская О.Н., 112
 Романенко А.А., 210
 Ронищенко Б.В., 214
 Рошупкин Д.И., 125, 130
 Руденок В.В., 222
 Рууге Э.К., 131, 135, 139
 Рыжковская Е.Л., 143, 148
 Рында Е.Г., 154
 Савин А.О., 132, 133
 Савина С.М., 174
 Савко А.И., 39
 Савченко Г.Е., 65, 179, 186

- Сазанович И.В., 41
 Самович Т.В., 170, 187, 190, 197
 Самохина В.В., 31, 42, 88
 Самцов М.П., 106, 132, 133, 137, 205
 Санько-Счисленок Е.В., 132, 133
 Светлаков В.И., 30
 Свечко А.Д., 209
 Свешникова А.Н., 40, 52, 68, 70, 73, 75, 89, 138
 Селищева А.А., 168
 Сергиенко В.И., 125
 Сидоров А.В., 96
 Силинг Е.А., 89
 Симоненко Е.Ю., 40
 Симонян Г.М., 50
 Скоробогатова А.С., 109, 119
 Скоростецкая Л.А., 43
 Слобожанина Е.И., 104, 105, 117, 118
 Слонская С.В., 28
 Смирнов А.А., 54
 Смолич И.И., 31, 42, 72, 82, 90
 Соболевская Е.М., 209
 Собчук А.Н., 86, 173
 Соколик А.И., 31, 77, 88
 Соколов А.В., 76, 108, 113, 129, 138
 Соловых Н.И., 165
 Соловьев К.Н., 28
 Станиславчик К.М., 145
 Станишевский И.В., 28, 55
 Старовойтова В.А., 56
 Стародубцева М.Н., 91, 98, 214, 231
 Степанов С.С., 191
 Степура В.И., 46, 57, 58
 Степура И.И., 58
 Стожаров А.Н., 128
 Стрельцова Д.Е., 92
 Стрельченя И.И., 32
 Строкина В.В., 195
 Суховеева С.В., 54, 93
 Счастливая Н.И., 148
 Сыса А.Г., 149
 Сытник С.К., 192
 Тагиева К.Р., 162
 Тамашевский А.В., 94, 105
 Тарасов Д.С., 106, 132, 133, 137, 205
 Терехов С.Н., 177
 Терехова М.М., 212, 213
 Тетяников Н.В., 163
 Тимохина Е.П., 134
 Тимохина О.В., 147, 155
 Тимошин А.А., 135
 Титов В.Ю., 136
 Тихомиров С.А., 57, 87
 Тишель В.В., 30
 Тишук О.И., 156
 Токальчик Д.П., 78
 Токальчик Ю.П., 79
 Толкачева Ю.В., 77
 Топунов А.Ф., 139
 Топчий Н.Н., 192, 193
 Травкина М., 58
 Третьякова А.И., 86
 Трчунян А.А., 206
 Тюлькова Е.Г., 194
 Тюрин-Кузьмин П.А., 68
 Урецкий В.Б., 115
 Усатов А.В., 161
 Уснич С.Л., 95
 Фалетров Я.В., 47, 53, 56
 Федорова Е.А., 103, 114
 Федулов А.С., 144
 Филатова Е.А., 147
 Филькова А.А., 70, 75
 Фролова Н.С., 47
 Харитонов В.Р., 96
 Хильманович В.Н., 228, 230
 Хиневич Н.В., 59
 Хлудеев И.И., 116, 137
 Ходжазода Т.А., 97
 Холявка М.Г., 49
 Хомочкин А.П., 48
 Храмова П.С., 39
 Хрипач В.А., 92, 215
 Хрусталёв В.В., 59, 128
 Хрусталёва Т.А., 59, 128
 Худякова А.Ю., 195
 Цеханович И.А., 171
 Цомартова Д.А., 134
 Цуканова Е.В., 91, 98
 Цю Дж., 212, 213
 Чайковский А.Ф., 196
 Чекина А.Ю., 144
 Челнокова И.А., 91, 98, 214, 231
 Чепелева Е.В., 197
 Черенкевич С.Н., 78, 79, 110, 111, 124, 218
 Черныш М.А., 30, 95, 211, 215
 Чешик И.А., 91
 Шадыро О.И., 111, 149
 Шамаль Н.В., 198
 Шамова Е.В., 138
 Шамшеня А.А., 30
 Шаповалов Ю.А., 99
 Шашко А.Ю., 30, 42

Швиденко Н.В., 100
Шевченко Г.В., 193
Шикер А.А., 82
Широканов А.Д., 87
Ширшикова Г.Н., 195
Шкляревский М.А., 100
Шклярова А.Н., 91, 98, 231
Шкуматов В.М., 47, 53, 56
Шман Т.В., 116
Шманай В.В., 87
Шпилевский С.Н., 186, 199

Шумаев К.Б., 131, 135, 139
Щербин Д.Г., 203, 204, 212, 213
Юркевич М.Ю., 157
Яглов В.В., 69, 134, 140
Яглова Н.В., 69, 134, 140
Яковлев Д.Л., 87
Янковская М.Б., 165
Янцевич А.В., 58
Яскевич А.В., 114
Ястреб Т.О., 81