



Институт биофизики  
и клеточной инженерии  
НАН Беларуси

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ И КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ НАН БЕЛАРУСИ

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ, МЕМБРАННЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОСИСТЕМ

**Тезисы докладов  
16-й Международной научной конференции**

**Республика Беларусь  
Минск, 25–27 июня 2024 г.**

Научное электронное издание

МИНСК, БГУ, 2024

ISBN 978-985-881-648-3

© БГУ, 2024

УДК 557.3(06)  
ББК 28.07я431

**Редакционная коллегия:**

доктор биологических наук, профессор *Г. Г. Мартинович* (гл. ред.);  
доктор биологических наук, профессор,  
академик НАН Беларуси *И. Д. Волотовский*;  
кандидат биологических наук *Л. М. Лукьяненко*;  
доктор биологических наук, профессор,  
член-корреспондент НАН Беларуси *Е. И. Слобожанина*;  
доктор биологических наук, профессор,  
член-корреспондент НАН Беларуси *Л. Ф. Кабашишникова*;  
доктор биологических наук, доцент *В. Г. Вересов*;  
доктор биологических наук, профессор *Д. Г. Щербин*;  
кандидат биологических наук *Н. Г. Антонец*;  
кандидат биологических наук *Е. В. Князева*;  
кандидат медицинских наук, доцент *А. Е. Гончаров*

**Рецензенты:**

доктор биологических наук, профессор *И. Б. Заводник*;  
кандидат биологических наук *Е. В. Шамова*

**Молекулярные**, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем [Электронный ресурс] : тез. докл. 16-й Междунар. науч. конф., Респ. Беларусь, Минск, 25–27 июня 2024 г. / Белорус. гос. ун-т ; редкол.: Г. Г. Мартинович (гл. ред.) [и др.]. – Минск : БГУ, 2024. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – ISBN 978-985-881-648-3.

Рассмотрены современные фундаментальные и прикладные аспекты приоритетных направлений научных исследований в области биофизики, молекулярной биологии, клеточной инженерии, нанобиотехнологий, биологии стволовых клеток, иммунологии, вирусологии и др.

---

**Минимальные системные требования:**

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

Оригинал-макет подготовлен в программе Microsoft Word

В авторской редакции

Ответственный за выпуск *О. Д. Бичан*

Подписано к использованию 20.06.2024. Объем 2,6 МБ

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

## ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ

### *Сопредседатели:*

- Мартинович Г.Г. доктор биологических наук, профессор, БГУ (Минск, Беларусь)
- Волотовский И.Д. доктор биологических наук, профессор, академик НАН Беларуси, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (Минск, Беларусь)

### *Члены программного комитета:*

- Вересов В.Г. доктор биологических наук, доцент, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (Минск, Беларусь)
- Гончаров А.Е. кандидат медицинских наук, доцент, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (Минск, Беларусь)
- Демидчик В.В. доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, БГУ (Минск, Беларусь)
- Заводник И.Б. доктор биологических наук, профессор, Гродненский государственный университет им. Янки Купалы (Гродно, Беларусь)
- Кабашникова Л.Ф. доктор биологических наук, профессор, член-корр. НАН Беларуси, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (Минск, Беларусь)
- Красновский А.А. доктор биологических наук, профессор, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (Москва, Россия)
- Лукьяненко Л.М. кандидат биологических наук, доцент, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (Минск, Беларусь)
- Панасенко О.М. доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России (Москва, Россия)
- Осипов А.Н. доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова (Москва, Россия)
- Рубин А.Б. доктор биологических наук, профессор, академик РАН, МГУ им. Ломоносова (Москва, Россия)
- Слобожанина Е.И. доктор биологических наук, профессор, член-корр. НАН Беларуси, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (Минск, Беларусь)
- Стародубцева М.Н. доктор биологических наук, доцент, Гомельский государственный медицинский университет (Гомель, Беларусь)
- Твердислов В.А. доктор физико-математических наук, профессор, МГУ им. Ломоносова (Москва, Россия)
- Титов Л.П. доктор биологических наук, профессор, академик НАН Беларуси, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Минск, Беларусь)
- Щербин Д.Г. доктор биологических наук, профессор, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (Минск, Беларусь)

# СОДЕРЖАНИЕ

## РАЗДЕЛ I

### ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

<i>Демидчик В. В.</i> Сигнальный хаб на основе цитоплазматического $\text{Ca}^{2+}$ и активных форм кислорода в клетках высших растений.....	23
<i>Зинченко В. П., Теплов И. Ю., Тюрин Ф. В., Гайдин С. Г., Малибаева А., Ларюшкин Д.П.</i> Биофизические механизмы ритмогенеза при эпилепсии .....	24
<i>Кабашникова Л. Ф.</i> Природные индукторы иммунитета растений: биофизические механизмы действия и перспективы использования .....	26
<i>Панасенко О. М.</i> Свободнорадикальная пероксидация липидов в условиях галогенирующего стресса.....	28
<i>Пантелеев М. А.</i> Мембранно-зависимые реакции свертывания крови: механизмы, кинетика и физиология .....	29
<i>Соколов А. В., Исакова-Сивак И. Н.</i> Участники обмена железа, как мишени для терапии онкологических и вирусных заболеваний.....	30

## РАЗДЕЛ II

### МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

<i>Horetski M. S., Frolova N. S., Faletrov Y. V.</i> Synthesis and antimycobacterial activity of fluorescent bodipy-labeled isoniazid .....	32
<i>Lepeshkevich S. V., Sazanovich I. V., Parkhats M. V., Gilevich S. N., Yantsevich A. V., Weinstein J. A., Towrie M., Dzhagarov B. M.</i> Picosecond to millisecond transient absorption spectroscopy of carbonmonoxy- and oxyhemoglobin in the visible and mid-infrared spectral region .....	33
<i>Абашкин В. М., Жогла В. А., Игнатъев-Качан А. О., Шарко О. Л., Шманай В. В., Щербин Д.Г.</i> Использование миметиков аполипопротеина для создания липосомальных носителей малых интерферирующих РНК .....	35
<i>Алексеева М. И., Черныш М. А., Савенко П. О., Соколик А. И., Демидчик В. В.</i> Анализ содержания щелочных металлов в антигололедных обработках с использованием пламенной спектрофотометрии и оценка их фитотоксичности.....	37
<i>Байроченко Д. С.</i> Селективность действия ингибиторов сериновых протеаз нафамостатного типа.....	38
<i>Башкиров П. В.</i> Предел изгибной прочности липидного бислоя определяет путь структурной перестройки мембран при их слиянии и делении.....	40

<i>Белько Н. В., Мальтанова А. М., Богданова А. В., Кулагова Т. А., Луговский А. П., Позняк С. К., Самцов М. П.</i> Многофункциональный сенсор внутриклеточных процессов на основе ацилгидразона родамина Б .....	41
<i>Бочаров Э. В., Бершацкий Я. В., Лесовой Д. М., Павлов К. В., Кузьмина Н. В., Ракитина Т. В., Кузнецов А. С., Волынский П. Е., Бритиков В. В., Бритикова Е. В., Усанов С. А., Ефремов Р. Г., Арсеньев А. С.</i> Конформационные перестройки и взаимодействия трансмембранных доменов битопных белков в норме и патологии .....	42
<i>Бритиков В. В., Бритикова Е. В., Бочаров Э. В., Усанов С. А.</i> Взаимодействие рибосом-инактивирующего белка трихобакина с С-концевым фрагментом Р2 белка 80S рибосомы по данным корреляционной гетероядерной ЯМР спектроскопии .....	43
<i>Бритикова Е. В., Бритиков В. В., Бочаров Э. В., Усанов С. А.</i> Динамика полипептидной цепи рибосом-инактивирующего белка трихобакина по данным <sup>15</sup> N релаксационной ЯМР спектроскопии .....	45
<i>Бузмаков М. Д., Брацун Д. А.</i> Математическое моделирование динамических свойств репрессилатора с запаздыванием в цепях обратной связи.....	47
<i>Верлов Н. А., Бурдаков В. С., Кулаков И. А., Иванова Л. А., Богданов Ал. А., Эмануэль В. Л.</i> Вклад уромодулина в стабилизацию коллоида мочи в норме и на фоне индуцированного кристаллогенеза в системе <i>in vitro</i> .....	48
<i>Волков В. В., Степанов Г. О., Осипов А. Н.</i> Уязвимость цитохрома С: изучение его дегградации при действии гидроперекисей.....	49
<i>Габрусёнок П. В., Соколов П. А.</i> Анализ кривых флуоресцентного плавления АТФ-аптамера в разных рН при помощи термодинамической модели .....	50
<i>Галец-Буй И. В., Терехова М. М., Кью Дж., Ши К., Мажораль Ж. П., Щербин Д. Г.</i> Анализ комплексообразования между амфифильными фосфорными дендронами и белками крови человека альбумином и тромбином методом нативного гель-электрофореза.....	52
<i>Гапеева Т. А., Семанюк Т. В., Кабачевская Е. М.</i> Экспрессия трансгенов в клетках растений картофеля с геном гетерологичного антимикробного пептида при длительном размножении <i>in vitro</i> .....	54
<i>Ильин А. Ю., Старухин А. С., Павич Т. А.</i> Влияние молекулярного кислорода на дезактивацию триплетных состояний металлопорфиринов .....	55
<i>Константинов Ф. О., Урбан В. А., Вересов В. Г.</i> Виртуальный скрининг и молекулярно-динамическое моделирование потенциальных ингибиторов стволовой области гемагглютинаина вируса гриппа А.....	57
<i>Костюченко Н. С., Хрусталёва Т. А.</i> Аминокислотная изменчивость каталитического домена бета-секретазы позвоночных животных.....	59
<i>Кудряшева Н. С., Сушко Е. С., Зеньков А. В.</i> Морские люминесцентные бактерии: мониторинг токсичности селенит-ионов и биосинтез наночастиц селена.....	61
<i>Лахвич Ф. Ф., Ринейская О. Н.</i> Мутантные варианты кетоацил[АСР]синтаз в изучении микобактериальной активности <i>in silico</i> .....	62

<i>Макаров А. Ю., Степанов Г. О., Осипов А. Н.</i> Электростатическое взаимодействие цитохрома <i>c</i> с кардиолипином и фосфатидной кислотой .....	64
<i>Малиборский А. Я., Бринкевич С. Д., Свердлов Р. Л.</i> Влияние нитропроизводных имидазола и 1,2,4-триазола на образование продуктов радиационно-химических превращений этанола в деаэрированных водных растворах .....	66
<i>Мельникова Е. А., Лукьянова К. А., Орешко О. В., Амаэзбери Н. В., Семенкова Г. Н.</i> Механизмы влияния циннаматов на функциональные свойства нейтрофилов .....	67
<i>Панада Я. В., Фролова Н. С., Фалетров Я. В.</i> Оценка редокс-активности 2-оксо-3-(этилоксалил)-1,4-оксатиана на примере неферментативного окисления NADH в присутствии 1,4-бензохинона .....	69
<i>Пархоц М. В., Лепешкевич С. В., Веремейчик М. В., Джагаров Б. М.</i> Фотосенсибилизированное образование синглетного кислорода Zn-протопорфирином, встроенным в белковую матрицу гемоглобина .....	71
<i>Першин С. М., Орлович В. А.</i> $\pi$ – повороты гайки джанибекова обеспечивают трансмембранный перенос спинового изомера орто-Н <sub>2</sub> O через аквапориновые каналы .....	72
<i>Першукевич П. П., Арабей С. М., Рычихина Е. Д., Стужин П. А.</i> Фосфоресценция индиевого комплекса этиопорфирина-I при низкой и комнатной температурах .....	73
<i>Песняк А. В., Максимчик Ю. З.</i> ДНК диагностика и оценка частоты встречаемости мутации связанной с дегенеративной миелопатией у собак на территории Республики Беларусь .....	75
<i>Плигин Е. И., Луговский А. А., Воронай Е. С., Маскевич А. А.</i> Индуктивно-резонансный перенос энергии между тиофлавином Т и его стироловыми производными при их встраивании в амилоидные фибриллы .....	76
<i>Рукояткин Н. С., Беспалко К. Р., Решетникова О. В., Бражко В. А., Джимак С. С.</i> Изотопный <sup>2</sup> H/ <sup>1</sup> H состав водного окружения может изменять вероятность возникновения зон открытых состояний в молекуле ДНК .....	77
<i>Русакович А. А., Белозор А. С., Демидчик В. В.</i> Влияние антиоксидантов природного и синтетического происхождения на показатели окислительной стабильности пищевых масел .....	78
<i>Самохина В. В., Русакович А. А., Мацкевич В. С., Змитрович И. В., Аксюциц А. В., Логунов К. Т., Пишибытко Н. Л., Котов Д. А., Демидчик В. В.</i> Влияние холодной плазмы атмосферного разряда на ростовые процессы у высших растений .....	80
<i>Серебрянская Т. В., Кинжалов М. А., Касьяненко Н. А.</i> Особенности взаимодействия диаминокарбеновых комплексов палладия (II) и платины (II) с тимусной ДНК .....	81
<i>Степанов Г. О., Родионова Н. Н., Петрова А. О., Кухнинова А. А., Молодцова И. В., Борискин В. С., Новиков В. В., Яблокова Е. В., Снастин М. В., Тарасов С. А.</i> Квантово-молекулярное, молекулярное и клеточное воздействие радиоизлучения сверхвысоких разведений антител к интерферону гамма .....	82

<i>Стручкова А. А., Степанов Г. О., Осипов А. Н.</i> Оценка стехиометрии и константы диссоциации взаимодействия кардиолипина и фосфатидной кислоты с цитохромом С .....	84
<i>Султанова Г. Г., Ганиева Р. А., Дадашева С. Б., Мамедова Х. Х., Гасимова В. Х., Гусейнова Н. Б.</i> <i>In silico</i> анализ активности ацетилхолинэстеразы с использованием молекулярного докинга .....	86
<i>Тарасик М. С., Хрусталёв В. В., Хрусталёва О. В., Побойнев В. В., Стожаров А. Н.</i> Молекулярная динамика белков термостабильных архей.....	88
<i>Тарасова Д. А., Черепанов И. С., Черенков И. А.</i> Исследование физико-химических свойств лигнинсодержащих гидрогелей.....	89
<i>Урбан В. А., Константинов Ф. О., Вересов В. Г.</i> Молекулярные механизмы ингибирования Т-клеток белком LAG-3, экспрессируемым на регуляторных Т-клетках .....	91
<i>Фирова Р. Х., Мосиевич Д. В., Балабушевич Н. Г., Панасенко О. М., Михальчик Е. В.</i> Природные полисахариды пектин и фукоидан снижают хемилюминесценцию системы люциферин-люцифераза .....	93
<i>Шершень В. С., Старухин А. С., Павич Т. А.</i> Изучение эффективности процесса переноса энергии для комплексов металлопорфиринов с куркуминами и аминокпартерфенилами .....	94
<i>Яковец П. С., Колчина А. О., Ерёмин Н. В., Фролова Н. С., Фалетров Я. В.</i> Синтез и <i>in silico</i> оценка применимости двух 9-алкил-6-гидрокси-3Н-ксантен-3-онов в качестве потенциальных аффинных лигандов цитохромов P450....	95

### РАЗДЕЛ III КЛЕТОЧНАЯ БИОФИЗИКА

<i>Soliyev N. N., Abdullayeva G. T., Lutpillayev G. H., Asrarov M. I.</i> The effect of polyphenol extract isolated from <i>karelinia caspia</i> plant on mitoK <sub>ATP</sub> channel of liver mitochondria.....	98
<i>Арзамазкина К. И., Герман А. Д., Губаревич К. И., Мацкевич В. С.</i> Влияние свободных аминокислот на продукцию гидроксильного радикала в условиях <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> .....	100
<i>Бабаева Г. Х., Мусаев Н. А.</i> Воздействие экстрактов из <i>Artemisia L.</i> на плазматическую мембрану в условиях стресса.....	102
<i>Байрамуков В. Ю., Ковалев Р. А., Анкудинов А. В., Пантина Р. А., Григорьев С. В., Варфоломеева Е. Ю.</i> Архитектура хроматина, выявленная в механически деформированных ядрах нормальных и опухолевых клеток, методом атомно-силовой микроскопии.....	103
<i>Баланчук А. Н., Крытынская Е. Н.</i> Комбинированное действие глицина и карбоновых кислот на мембранный потенциал харовых водорослей .....	104
<i>Бережнов А. В., Федотова Е. И., Крицкая К. А., Надеев А. Д.</i> Регуляция динамики митохондриальной сети при болезни паркинсона .....	106

<i>Бурдаков В. С., Верлов Н. А., Богданов Ан. А., Богданов А. А.</i> Оптимизация протокола измерения внутриклеточного водородного показателя к условиям макроскопической оценки для популяции клеток .....	107
<i>Бутенко А. В., Пинчук С. В., Волотовский И. Д.</i> Влияние «Коллост» геля на структурно-функциональные показатели дермальных фибробластов человека .....	109
<i>Варфоломеева Е. Ю., Федорова Н. Д., Колмогоров В. С., Горелов С. В., Швецов А. В., Горелкин П.В., Ерофеев А.С.</i> Белки острой фазы воспаления модифицируют функциональную активность и биомеханические характеристики нейтрофилов периферической крови .....	110
<i>Войтенко Д. А., Ивановская Е. В., Пантелеев М. А., Свешиникова А. Н.</i> Математическая модель влияния гиалуроновой кислоты и ее продуктов на пролиферацию фибробластов в зависимости от их возраста .....	111
<i>Гармаза Ю. М., Пашкова О. Л., Гаспарян В. К., Тамашевский А. В.</i> Изучение эффективности лектиносодержащих систем доставки лекарственных препаратов на основе ферритина к опухолевым клеткам крови человека .....	112
<i>Герман А. Д., Арзамазкина К. И., Губаревич К. И., Гордых С. А., Мацкевич В. С.</i> Влияние Ni <sup>2+</sup> и Ni-гистидиновых комплексов на рост и жизнеспособность клеток корней сельскохозяйственных культур .....	113
<i>Гончарик Р. Г., Самович Т. В., Курьянчик Т. Г., Прищепчик Ю. В., Козел Н. В., Кабачевская Е. М.</i> Ферментативная активность и экспрессия гена нитратредуктазы в листьях проростков ячменя и пшеницы в условиях засухи и при действии биорегуляторов .....	115
<i>Гриусевич П. В., Толкачева Ю. В., Михалева Т. Д., Кошель С. А., Королевич А. Э., Демидчик В. В.</i> Роль калиевых каналов GORK и анионных каналов ALMT в оттоке электролитов из клеток корня <i>Arabidopsis thaliana</i> L.....	116
<i>Гусакова С. В., Гусакова В. С., Пшемьский М. А., Смаглий Л. В., Зайцева Т. Н.</i> Сократительная активность гладкомышечных клеток легочной артерии: роль объем-чувствительного ионного транспорта.....	117
<i>Денисов А. А., Никифоров А. В., Снопич Ф. Ю., Варивончик М. В.</i> Система визуализации и анализа электрической активности нейронов срезов гиппокампа <i>in vitro</i> .....	118
<i>Заводник И. Б., Вейко А. Г., Коваленя Т. А., Ильич Т. В., Савко А. И., Лапина Е. А.</i> Взаимодействие флавоноидов с митохондриальными, эритроцитарными и искусственными мембранами .....	120
<i>Иванова Л. А., Копица Г. П., Япрынцев А. Д., Баранчиков А. Е., Лебедев Д. В., Кульминская А. А.</i> Биоминерализация CaCO <sub>3</sub> : эволюция структуры осадков и зависимость их структурных параметров от состава бактериального матрикса .....	121
<i>Игнатьева М. М., Сергеев В. Г., Черенков И. А.</i> Особенности электрохимического поведения толуидинового синего в гидрогелевой среде, содержащей лейкоциты .....	122
<i>Ильючик И. А., Никандров В. Н., Новикова В. А.</i> Влияние нитрата кобальта <i>in vivo</i> на протеолитическую активность гомогенатов <i>Spirulina platensis</i> .....	124

<i>Квачева З. Б., Семенкова Г. Н., Осташева Н. В., Полешко А. Г., Василевич И. Б., Пинчук С. В.</i> Морфофункциональная характеристика дермальных фибробластов при воздействии гипохлорита натрия .....	125
<i>Клименко В. В., Моисеенко В. М., Богданов А. А.</i> Механизм истощения триплетного кислорода в опухолевых сфероиды и его влияние на эффективность фотодинамического воздействия .....	126
<i>Кохан А. Ю., Прокофьев И. И., Долговечная В. В., Шамова Е. В.</i> Исследование механочувствительных ионных каналов Piezo1 тромбоцитов методом пЭТЧ-кламп.....	127
<i>Кохан А. Ю., Шумко А. Д., Шамова Е. В.</i> Разработка микрофлюидной системы для анализа системы гемостаза .....	129
<i>Красняков И. В., Костарев К. В., Брацун Д. А.</i> Хемомеханическое моделирование процессов морфогенеза эпителиальных листов .....	130
<i>Крученюк Ю. В., Дудинова О. Н., Плавский В. Ю.</i> Влияние билирубина и эндогенных фотосенсибилизаторов на фотогемолиз эритроцитов .....	131
<i>Кульминская А. А., Иванова Л. А., Копица Г. П., Япрынецев А. Д., Баранчиков А. Е., Лебедев Д. В.</i> Биоминерализация CaCO <sub>3</sub> : о роли внеклеточных компонентов бактериальной биопленки .....	132
<i>Ларюшкин Д. П., Гайдин С. Г., Майоров С. А., Косенков А. М., Бережнов А. В., Крицкая К. А.</i> Топологический анализ как ключ к пониманию структурной и функциональной динамики митохондриальных сетей.....	133
<i>Лобан В. А., Драпеза А. И., Якимчук С. В.</i> Рамановская спектроскопия для динамической идентификации инфекционных агентов, выделяемых электрокинетически из гетерогенной дисперсной фазы биопроцессорными чип-форматами .....	134
<i>Майоров С. А., Гайдин С. Г., Ларюшкин Д. П., Рязанцева П. Е., Крицкая К. А., Косенков А. М.</i> Влияние активации A1 аденозиновых рецепторов на функциональную активность нейронов и астроцитов при гипервозбуждении .....	135
<i>Махонько А. А., Харитонова А. Ю., Смирнова А. Е., Дениева З. Г., Константинова А. Н., Варламова Е. А., Батищев О. В.</i> Фосфорсодержащие порфирины с этоксиаксиальными группами вызывают гибель <i>Escherichia coli</i> T-61, нарушая целостность бактериальной мембраны.....	136
<i>Мацкевич В. С., Герман А. Д., Арзамаскина К. И., Губаревич К. И., Демидчик В. В.</i> Индукция токсических и сигнальных реакций в корнях высших растений в ответ на Ni <sup>2+</sup> и комплексы Ni <sup>2+</sup> -гистидин .....	137
<i>Муравицкая А. О., Зуёнок С. С., Чернявская Е. А., Демидчик В. В.</i> Конструирование вектора для гетерологической экспрессии ионного канала AtCNGC14 в клетках НЕК293 для дальнейшего электрофизиологического анализа.....	138

<i>Муравицкая А. О., Светлаков В. И., Бондаренко В. Ю., Вечерек М. С., Самович Т. В., Козел Н. В., Соколик А. И., Габриелян Л. С., Маноян Д. Г., Демидчик В. В.</i> Оценка влияния условий культивирования на продукцию биоводорода и цифровой анализ фенотипа микроводорослей семейства <i>Chlorellaceae</i> .....	139
<i>Наквасина М. А., Чурсанова Е. Н., Корпусова Е. И., Сараджи Н. Г.</i> Исследование механизмов цитопротекторного действия ресвератрола и циклоастренола на лимфоциты человека .....	140
<i>Орлов Н. А., Крюкова Е. А., Ефременко А. В., Якимов С. А., Топорова В. А., Кирпичников М. П., Некрасова О. В., Феофанов А. В.</i> Взаимодействия канала Kv1.1 с пептидными блокаторами: флуоресцентный анализ на клетках млекопитающих.....	141
<i>Пашкевич Л. В., Кабашишникова Л. Ф., Лукаша В. И., Артемчук Я. Н.</i> Оценка действия иммуномодулирующих препаратов на основе биогенных стимуляторов на культуры грибных патогенов .....	143
<i>Подоплелова Н. А., Мишуков А. А., Обыденный С. И., Соловьева П. А., Чабин И. А., Свешникова А. Н., Пантелеев М. А.</i> Сравнительная характеристика некроза и апоптоза тромбоцитов человека .....	145
<i>Погонялова М. Ю., Баженов П. А., Винокуров А. Ю.</i> Влияние антиатерогенных мутаций мтДНК на кальциевый гомеостаз в клеточных моделях атеросклероза .....	146
<i>Попов Д. Ю., Казаков М. С., Шитикова Е. Ю., Винокуров А. Ю.</i> Связанные с атеросклерозом мутации мтДНК влияют на баланс между формами и локализацией продукции АФК в клетках .....	148
<i>Пушкина А. А., Козел А. В., Мацкевич В. С.</i> Влияние NaCl на рост корня и процессы Ca <sup>2+</sup> -сигнализации у высших растений.....	149
<i>Рахимов А. Д., Позилов М. К., Якубова Н. Х., Гафуров М. Б.</i> Влияние производного госсипол дизамина на АТФ зависимый калиевый канал митохондрий .....	150
<i>Рокицкая Т. И., Кирсанов Р. С., Хайлова Л. С., Антоненко Ю. Н.</i> Тетрафенилборат усиливает протонофорное действие предшественников фосфониевых илидов на модельных и биологических мембранах.....	152
<i>Рудак Ю. И., Саваневская Е. Н.</i> Электрогенез афферентных волокон <i>Chorda turyana</i> при активации рецепторов языка пищевыми стимулами с цитрусовым вкусом .....	154
<i>Савицкий А. С., Бондаренко В. Ю., Демидчик В. В.</i> Разработка программного комплекса для фенотипического анализа растений <i>Arabidopsis thaliana</i> в культуре <i>in vitro</i> .....	156
<i>Свидельская Г. С., Игнатова А. А., Пономаренко Е. А., Миндукушев И. В., Гамбарян С. П., Пантелеев М. А.</i> Взаимосвязь маркеров активации и агрегации тромбоцитов.....	157

<i>Сидоров А. В.</i> Увеличение нитритной нагрузки вызывает модификацию временных характеристик спайка при действии пероксида водорода в идентифицированных нейронах <i>Lymnaea stagnalis</i> .....	158
<i>Смирнов А. А., Кабачевская Е. М., Суховеева С. В., Вологовский И. Д.</i> Роль соединений фенольной природы в механизмах формирования устойчивости листьев картофеля к заражению фитофторой .....	160
<i>Стародубцева М. Н., Шклярова А. Н., Челнокова И. А., Шаховская О. В., Матвеевкова Т. Д., Сусленкова А. Е.</i> Изучение возраст-зависимых радиационно-индуцированных изменений механических и функциональных свойств фибробластов <i>in vitro</i> .....	161
<i>Суховеева С. В.</i> Гравиметрический анализ полисахаридного состава клеток стеблей томата при действии гравистимуляции и эпина .....	162
<i>Толчач А. А., Мацкевич В. С.</i> Анализ модификации роста и накопление АФК в клетках корня <i>Arabidopsis thaliana</i> под действием ультрафиолета.....	163
<i>Федорова Н. Д., Ковалёв Р. А., Свердлов Р. Л., Варфоломеева Е. Ю.</i> Влияние тролокса и ионола на функциональную активность клеток врожденного и адаптивного иммунитета .....	164
<i>Федорович С. В., Демидик Е. А., Люля А. С.</i> Роль внутриклеточного закисления в действии короткоцепочечных жирных кислот на синапсомы мозга крыс .....	165
<i>Федотова Е. И., Крицкая К. А., Надеев А. Д., Бережнов А. В.</i> Защитные эффекты закисления внутриклеточной среды в MPP <sup>+</sup> -Индуцированной клеточной модели болезни паркинсона .....	166
<i>Шмелева Е. В., Басырева Л. Ю., Гольцева А. В., Зубко В. С., Вахрушева Т. В., Соколов А. В., Гусев С. А., Панасенко О. М.</i> Образование и деградация модельных нейтрофильных внеклеточных ловушек: возможности и перспективы применения .....	167
<i>Ястребов И. А., Бельчиков В., Колесникова И. С., Галкина С. В., Трахтман П. Е., Сवेशникова А. Н.</i> Исследование влияния культивирования в присутствии тромбоцитов человека на тромбогенность опухолевых клеток.....	169

#### РАЗДЕЛ IV МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

<i>Goltsev M. V., Kir D., Mansurov V. A., Pasiuk H. A., Trushel N. A.</i> Two-dimensional dynamic numerical model of the aortic valve operation .....	172
<i>Rabushka L. V., Shalukho T. A., Goltsev M. V., Barczewski M., Schimmel Th., Shman T. V.</i> Atomic force microscopy study of human mesenchymal stem cells.....	174
<i>Богданов А. А., Богданов Ан. А., Верлов Н. А., Бурдаков В. С., Моисеенко В. М.</i> Подщелачивание опухолей: заблуждение или хорошая терапевтическая перспектива? .....	176
<i>Быков Г. А., Пантелеев М. А.</i> Гибридная многомасштабная модель кровообращения человека при ранении.....	178

<i>Верлов Н. А., Бурдаков В. С., Кулаков И. А., Иванова Л. А., Богданов Ал. А., Эмануэль В. Л.</i> Вклад уромодулина в стабилизацию коллоида мочи в норме и на фоне индуцированного кристаллогенеза в системе <i>in vitro</i> .....	179
<i>Винокуров А. Ю., Казаков М. С., Попов Д. Ю., Шитикова Е. Ю., Погонялова М. Ю., Кузнецова Е. А., Баженов П. А.</i> Регуляция поляризации макрофагов как возможный механизм влияния мутаций митохондриальной ДНК на развитие атеросклероза.....	180
<i>Галюк Е. Н., Ринейская О. Н.</i> Сравнительное исследование воздействия на двойную спираль ДНК металлопорфиринов и противоопухолевых соединений платины .....	181
<i>Гончарова Н. В., Анацкая Л. Н., Потанин М. П.</i> Фенотипический профиль пула циркулирующих микровезикул эндотелиального и тромбоцитарного происхождения у пациентов с церебральной микроангиопатией .....	183
<i>Григорьева Д. В., Янчарский В. А., Баран Л. В., Соколов А. В., Гусаков Г. А., Горудко И. В.</i> Антиоксидантные и антиагрегантные свойства кислотного гидролизата <i>Mytilus edulis</i> .....	185
<i>Губич О. И., Пашкевич В. И., Сорока Д. А.</i> Сравнительный анализ антиоксидантных свойств отваров гиностеммы пятилистной ( <i>Gynostemma pentaphyllum</i> ) и солянки холмовой ( <i>Salsola collina</i> ) в экспериментальной модели хронической алкогольной интоксикации <i>in vivo</i> .....	187
<i>Гусакова В. С., Смаглий Л. В., Гусакова С. В., Зайцева Т. Н.</i> Изоосмотическая стрижка сосудистых гладкомышечных клеток в условиях активации пуринаргических рецепторов .....	188
<i>Давыденко А. И., Кохан А. Ю., Шамова Е. В., Бондаренко А. В., Бурко А. А., Гончаров А. Е., Осипова А. В.</i> Применение кремниевых подложек для разработки белковых тест-систем на основе технологии микрочипов.....	189
<i>Дремук И. А., Шумский В. А., Кизино Е. М., Свешникова А. Н., Шамова Е. В.</i> Влияние микроннк тромбоцитарных микровезикул на пролиферативную активность опухолевых клеток линий А549 и ОКР-GS .....	191
<i>Душанов Э. Б., Тогтохтур Т., Кулагова Т. А., Кулик В. К., Бугай А. Н.</i> Расчёт выхода дунитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках в модели нейтронозахватной терапии .....	193
<i>Ефимова Е. С., Шарабарина Т. В., Грицай У. С., Генин В. Д., Сурков Ю. И., Серебрякова И. А., Тучина Е. С.</i> Комбинированное действие синего (428 нм) светодиодного излучения в сочетании с Zn-содержащим пиридилпорфирином при фотодинамической терапии <i>in vivo</i> .....	194
<i>Зорина Т. Е., Ермилова Т. И., Коблов И. В., Каскех В., Кравченко И. Е., Шман Т. В., Зорин В. П.</i> Анализ особенностей внутриклеточной локализации фотосенсибилизатора мезо-тетрагидроксифенилхлорина при введении в составе комплексов с мономерными и полимерными циклодекстринами.....	196

<i>Зорина Т. Е., Ермилова Т. И., Коблов И. В., Кравченко И. Е., Шман Т. В., Кустов А. В., Березин Д. Б., Зорин В. П.</i> Роль структурных характеристик новых катионных фотосенсибилизаторов, полученных на платформе хлорина е <sub>6</sub> , при перераспределении между клетками.....	198
<i>Зубрицкая Г. П., Климович О. В., Махина О. Ю., Дремук И. А., Слобожанина Е. И.</i> Изменения уровня активных форм кислорода в лимфоцитах человека до и после инкубации с солями лития <i>in vitro</i> .....	200
<i>Зубрицкая Г. П., Найда Е. Н., Григоренко Е. А., Митьковская Н. П., Гармаза Ю. М., Слобожанина Е. И.</i> Изменение элементного состава и общей антиоксидантной активности плазмы крови у пациентов с артериальной гипертензией и острым нарушением мозгового кровообращения.....	201
<i>Иванов А. А., Королик А. К., Козлякова О. В., Лубневская Г. Г., Тарасик М. С.</i> Оценка функционального состояния основных транспортных систем плазмы крови беременных женщин с резус- иммунизацией при проведении им среднеобъемного плазмафереза методом флуоресцентного зондирования.....	203
<i>Иванов В. А., Костевич В. А., Горбунов Н. П., Горудко И. В., Григорьева Д. В., Соколов А. В., Панасенко О. М.</i> Альбумин, модифицированный в условиях моделирования гипергликемии, ингибирует лейкоцитарную миелопероксидазу, препятствуя развитию галогенирующего стресса.....	204
<i>Иванова А. А., Симоненко Е. Ю.</i> Процесс кристаллообразования в криопротекторных средах на основе водно-глицериновых растворов.....	206
<i>Ионова Е. Д., Степанов Г. О., Осипов А. Н.</i> Оценка образования гидроперекисей липидов при действии лазерного излучения на комплексы цитохрома с с фосфолипидами.....	207
<i>Козин С. В., Гришко Д. А., Паремужева О. Ф.</i> Влияние умеренно высокого содержания дейтерия в питьевом рационе на интенсивность окислительных процессов в крови и тканях печени лабораторных животных.....	208
<i>Краецкая О. Ф.</i> Исследование <i>in silico</i> биологической активности пиоглитазона как ингибитора гистондеацилаз.....	209
<i>Краецкая О. Ф.</i> Установление <i>in silico</i> наличия аффинности у метформина к фактору роста кровеносных сосудов VEGF-A.....	211
<i>Кулаков И. А., Верлов Н. А., Богданов Ал. А., Бурдаков В. С.</i> Исследование чувствительности к действию ионизирующего излучения клеток линии аденокарциномы эрлиха с индуцированным радиорезистентным фенотипом методом ДНК-комет.....	213
<i>Луговский А. А., Касич А. С., Гусаков Г. А., Самцов М. П., Мицкевич Е. Д., Пархоменко В. А.</i> Ковалентно модифицированные дипептидами наноалмазы в качестве платформы для эффективной доставки лекарственных средств.....	214
<i>Лукьяненко Л. М., Венская Е. В., Дубовская Т. Г., Скоробогатова А. С., Прокофьев И. И., Эрнандес Касерес Х. Л., Митчел Вальдес-Соса</i> Влияние вальпроевой кислоты на изолированные пресинаптические окончания головного мозга крыс <i>in vitro</i> .....	215

<i>Мартинovich Г. Г., Войнаровский В. В., Мартинovich И. В.</i> Биофизическая модель двухфазного адаптационного ответа опухолевых клеток при окислительном стрессе .....	217
<i>Мороз Г. Д., Вахрушева Т. В., Соколов А. В., Юдин М. С., Варижук А. М., Алиева С. Э., Лазарев В. Н., Панасенко О. М.</i> Взаимодействие миелопероксидазы и катионных антимикробных пептидов .....	218
<i>Мотевич И. Г., Попко Н. М., Шульга А. В., Маскевич С. А., Стрекаль Н. Д.</i> Флуоресцентные наночастицы CdSe/ZnS в диагностике патологий яичников .....	220
<i>Мурина М. А., Милойкович Л. А., Аносов А. К., Роцупкин Д. И.</i> Хлораминовые производные структурных аналогов аденозина – новые антиагреганты ковалентного типа действия .....	221
<i>Мурина М. А., Михальчик Е. В., Роцупкин Д. И.</i> Клеточная избирательность действия хлораминовых производных структурных аналогов аденозина .....	222
<i>Надеев А. Д., Федотова Е. И., Крицкая К. А., Бережнов А. В.</i> Активаторы митохондриальной функции как потенциальные нейропротекторы при болезни Паркинсона .....	224
<i>Осипов А. Н., Макаров А. Ю., Волков В. В., Ионова Е. Д., Стручкова А. А., Сучков М., Смолева С., Степанов Г. О.</i> Роль пероксида водорода в апоптотических реакциях цитохрома С .....	225
<i>Петухов В. И., Дмитриев Е. В.</i> Гомеостаз электрогенных металлов в эпидермисе как феномен самоорганизованной критичности .....	226
<i>Семенкова Г. Н., Адзерихо И. Э., Амазгбери Н. В., Кулагова Т. А., Владимирская Т. Э.</i> Новый взгляд на роль оксидативного стресса в развитии легочной артериальной гипертензии .....	227
<i>Сидоренко А. В., Солодухо Н. А.</i> Оценка эмоции отвращения человека под воздействием электромагнитного шума из диапазона WiFi .....	228
<i>Скоробогатова А. С., Венская Е. В., Садовничук М. Д., Аляхнович Н. С.</i> Содержание ионов титана в эритроцитах и плазме крови пациентов с выявленной гиперчувствительностью к диоксиду титана .....	229
<i>Слобожанина Е. И., Шамова Е. В.</i> Металлотионеины в прогнозировании терапии пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом .....	230
<i>Смаглий Л. В., Демкин В. П., Светлик М. В., Мельничук С. В., Руденко Т. В., Акинина М. Д.</i> Физико-математическая модель механической стимуляции волосковых клеток отолитовых органов крысы .....	232
<i>Султанова Г. Г., Ганиева Р. А., Дадашева С. Б., Мамедова Х. Х., Гасимова В. Х., Гусейнова Н. Б.</i> Анализ активности ацетилхолинэстеразы <i>in silico</i> с применением молекулярного докинга .....	234
<i>Сысоев М. Д., Игнатова А. А., Сунцова Е. В., Пантелеев М. А.</i> Оценка статуса десИАИрования тромбоцитов с помощью флуоресцентно меченых лектинов .....	235
<i>Тарасов Д. С., Самцов М. П., Воронай Е. С.</i> Фотоиндуцированное образование синглетного кислорода индотрикарбоцианиновым красителем с объемными заместителями в структуре молекулы .....	236

<i>Тарасов Д. С., Самцов М. П., Ощепкова Ю. И., Луговский А. П.</i> Фотофизические свойства молекул индотрикарбоцианиновых красителей при комплексообразовании с полипептидами .....	237
<i>Телегина Т. А., Вечтомова Ю. Л., Буглак А. А.</i> Действие тетрагидробиоптерина, УФ облучения и наночастиц Pt-Pd на тирозиназу в связи с патогенезом витилиго .....	238
<i>Теселкин Ю. О., Бабенкова И. В., Лебедева С. Ю., Выхристюк Ю. В., Шалина Р. И., Осипов А. Н.</i> Сравнительная оценка уровней маркеров оксидативного стресса при нормальной беременности и преэклампсии .....	239
<i>Титов В. Ю., Осипов А. Н., Бабенкова И. В., Теселкин Ю. О., Шалина Р. И., Выхристюк Ю. В., Лебедева С. Ю.</i> Оксид азота (NO) при преэклампсии .....	241
<i>Титов В. Ю., Осипов А. Н., Шалина Р. И., Ананкина А. А.</i> Концентрация нитро- и нитрозосоединений в плазме крови матери – важнейший показатель для ранней диагностики внутриутробной инфекции и воспаления плодных оболочек .....	242
<i>Шамова Е. В., Дубовская Т. Г., Шумский В. А., Стенникова П. С., Кохан А. Ю., Свешникова А. Н.</i> Исследование способности опухолевых клеток линий A549 и ОКР-GS индуцировать образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs) .....	243
<i>Шарабарина Т. В., Сливина Ю. И., Ефимова Е. С., Тучина Е. С.</i> Использование многократного фотодинамического воздействия для подавления жизнеспособности клеток <i>Staphylococcus aureus</i> .....	245
<i>Янг Ч., Лю Г., Чжунжуй Х., Паришина Е. Ю., Байжуманов А. А.</i> Антиоксидантная активность растительных экстрактов традиционной китайской медицины .....	247

## РАЗДЕЛ V

### КЛЕТочНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ, КЛЕТочНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ

<i>Антонова О. Ю., Кочеткова О. Ю., Канев И. Л.</i> Влияние ультраструктуры композитных материалов на основе нейлоновых нановолокон на пролиферацию и рост шванновских клеток .....	249
<i>Вашкевич Е. П., Ласюков Е. А., Шман Т. В.</i> Влияние длительности криохранения и состава криосреды на цитотоксическую активность экспансированных ЕК клеток .....	251
<i>Волков А. В., Денисов А. А.</i> Анализ изображений клеток глиомы С6 в камере горяева с применением нейросетевых методов .....	253
<i>Игнатова А. А., Некрасова О. В., Феофанов А. В.</i> Аналитическая система с использованием флуоресцентно-меченого канала Kv1.2 и HGTX-L3-GFP для исследования пептидных блокаторов .....	254
<i>Ионова А. Г., Космачёва С. М., Гончарова Н. В., Потапнев М. П.</i> Минимально манипулированные в нейрогенном направлении мезенхимальные стромальные клетки пуповины человека .....	255

<i>Клименкова О. В., Потапнев М. П., Куделич О. А.</i> Сравнение пролиферативной активности порфт/PRP в отношении мезенхимальных стромальных клеток и лимфоцитов селезенки крысы.....	256
<i>Козьячая А. С., Крытынская Е. Н.</i> Фенотипические реакции термопраймированных асептических проростков <i>A. thaliana</i> и <i>L. erinus</i> L. ....	258
<i>Луцкович Д. В., Мелешко А. Н.</i> Выбор наиболее эффективных анти-V7-N3 химерных антигенных рецепторов для лечения солидных опухолей.....	260
<i>Малахов В. И., Максимович А. В., Гончарова Н. В.</i> Характеристика влияния мск пуповины, культивируемых при 35 °С, на пролиферацию Т-лимфоцитов .....	261
<i>Мисюкевич А. Ю., Полешко А. Г.</i> Сравнительная оценка эффективности трансфекции культивированных МСК и фибробластов дермы методами липофекции и электропорации .....	262
<i>Покладок Е. С., Мелешко А. Н., Кушнерова Е. В.</i> Оценка эффективности нокаута Т-клеточного рецептора и МНС1 в клетках Т-лимфоцитов с использованием различных экспрессионных кассет .....	263
<i>Полешко А. Г., Водопьянова А. В., Пинчук С. В., Чиж О. И., Квачева З. Б.</i> Влияние условий культивирования мезенхимальных стромальных клеток на их способность к продукции внеклеточных везикул.....	265
<i>Туромша И. С., Гвоздев М. Ю., Варфоломеева Е. Ю., Ковалев Р. А., Федорова Н. Д., Осипович Н. П., Ксендзова Г. А., Логинова Н. В., Свердлов Р. Л.</i> Основания манниха производных 4-трет-бутилпирокатехина: радикалрегуляторные свойства и цитотоксичность .....	266
<i>Шклярова А. Н., Сусленкова А. Е., Стародубцева М. Н.</i> Сравнительный анализ механических свойств фибробластов лёгкого крысы при культивировании их первичных культур с использованием сред DMEM и DMEM/F12 .....	267
<i>Шклярова А. Н., Челнокова И. А., Стародубцева М. Н.</i> Изучение параметров физико-механических свойств клеток рака молочной железы линии ZR-75 с помощью АСМ .....	268
<i>Шман Т. В., Ермилова Т. И., Лебедева Ю. В., Клыч А. В., Мухаметшина А. С., Горбач Е. И., Вашкевич Е. П.</i> Генетическая модификация естественных киллерных клеток человека <i>in vitro</i> с использованием лентивирусных векторов.....	269
<i>Яроцкая М. А., Качан А. В., Мелешко А. Н.</i> Экспрессия и секреция эффекторов системы секреции III типа SIPV и SOPE сальмонелл.....	270

## РАЗДЕЛ VI НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

<i>Баскаев А. А., Хомутов Г. Б.</i> Магнитные взаимодействия в управлении локализацией коллоидных частиц в биоподобных системах .....	273
<i>Белякова Т. А., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Стрельникова Н. С.</i> Противоопухолевое действие наноселена и ускоренных ионов углерода на клетки асцитной карциномы Эрлиха <i>ex vivo</i> .....	274

<i>Богданов Ан. А., Моисеенко В. М., Богданов А. А.</i> Серебряно-цистеиновые наноконплексы как перспективные противоопухолевые средства.....	275
<i>Богданова А. В., Кулик В. К., Корень С. В., Фомина Е. Г., Бугай А. Н., Кулагова Т. А.</i> Взаимодействие бор-нитридных наночастиц с опухолевыми клетками .....	276
<i>Буглак А. А., Помогаев В. А., Сыч Т. С., Кононов А. И.</i> Наноструктуры серебра и золота как наносенсоры для детекции биомолекул .....	278
<i>Войнаровский В. В., Мартинович И. В., Богданёнок А. А., Мартинович Г. Г.</i> Механизмы действия наночастиц диоксида церия на клетки линии HeLa при окислительном стрессе .....	279
<i>Горудко И. В., Григорьева Д. В., Ивашкевич Д. Е., Пархоменко В. А., Луговский А. А., Гусаков Г. А.</i> Влияние наноалмазов детонационного синтеза с различным составом функциональных групп на клетки крови.....	280
<i>Горудко И. В., Григорьева Д. В., Реут В. Е., Сак Е. В., Баран Л. В., Барышев А. С., Симакин А. В.</i> Стержневые наночастицы селена активируют нейтрофилы.....	282
<i>Горшкова Ю. Е.</i> Мембранная система как ключевой элемент функционирования биогибридных наноконплексов с противомикробной и противораковой активностью .....	284
<i>Григорьева Д. В., Матусевич М. В., Ванина Д. А., Михальчик Е. В., Балабушевич Н. Г., Панасенко О. М., Горудко И. В.</i> Секреторная дегрануляция нейтрофилов при действии функционализированных биополимерами микрочастиц ватерита.....	285
<i>Григорьева Д. В., Михальчик Е. В., Балабушевич Н. Г., Мурина М. А., Панасенко О. М., Соколов А. В., Горудко И. В.</i> Влияние биополимеров и функционализированных ими микрочастиц ватерита на агрегацию тромбоцитов .....	286
<i>Жогла В.А., Хэ Л., Гао Ю., Шэнь М., Ши С., Щербин Д.Г.</i> Применение мультифункциональных дендримеров для регуляции метаболизма опухолевых клеток .....	288
<i>Канев И. Л., Верхолашин М. В., Тайлаков М. Е., Брысякин Е. Р., Антонова О. Ю.</i> Технология доставки аэрозольных наночастиц на поверхность клеточного слоя ....	289
<i>Касьяненко Н. А.</i> Анализ сопряжения ДНК в растворе с наночастицами металлов .	291
<i>Коблов И. В., Каскех В., Кравченко И. Е., Зорина Т. Е., Куцевол Н. В., Зорин В. П.</i> Особенности процесса взаимодействия темпорфина с термозависимым сополимером на разных этапах его двухстадийного коллапса.....	292
<i>Кулагова Т. А., Богданова А. В., Коптяева М. И., Амаэбери Н. В., Семенкова Г. Н.</i> Взаимодействие графеновых квантовых точек с пероксидазами ...	294
<i>Макшанова Н. С., Бурдаков В. С., Богданов А. А.</i> Наноконплексы миРНК с ионами кальция как эффективный способ подавления экспрессии гена BCR-ABL в клетках K562 .....	296

<i>Ронищенко Б. В., Северинчик Т. П., Панарин А. Ю., Терехов С. Н.</i> Спектры гигантского комбинационного рассеяния органической метки DABCYL и модифицированного олигонуклеотида 5'T20[DABCYL]3' .....	297
<i>Саранцева С. В., Большакова О. И., Лебедев В. Т.</i> Фуллерены и их производные в биомедицинских исследованиях .....	298
<i>Становая А. И., Абашкин В. М., Шибаев И. Э., Падня П. Л., Стойков И. И., Щербин Д. Г.</i> Модифицированные тиакаликс[4]арены как средство доставки малых интерферирующих РНК в опухолевые клетки .....	299
<i>Тамашевский А. В., Гармаза Ю. М.</i> Современные подходы в разработке иммуносенсоров для детекции опухолевых клеток крови .....	301
<i>Терпинская Т. И., Кашевский С. Б.</i> Противоопухолевый эффект локальной гипертермии с использованием ферромагнитных наночастиц .....	302
<i>Улосевич Д. С., Ринейская О. Н., Ермоленко Е. М.</i> Сравнительное исследование антиоксидантной активности водорастворимых фуллеренов .....	304
<i>Янченко Т. Л., Терпинская Т. И., Артемьев М. В.</i> Влияние дзета-потенциала и химического состава оболочки наночастиц на их связывание с клетками .....	305
<i>Яцзин Ш., Пишбытко Н. Л., Демидчик В. В.</i> Влияние наночастиц оксида меди на светозависимые реакции устьиц <i>Pisum arvense</i> L. ....	306

## РАЗДЕЛ VII ФОТОСИНТЕЗ И ФОТОБИОЛОГИЯ

<i>Zenkevich E. I., von Borczyskowski C.</i> Photoinduced electron transfer in nanoassemblies containing porphyrin macrocycles: pathways and mechanisms .....	308
<i>Zenkevich E. I., Parkhats M. V., Dzhagarov B. M., von Borczyskowski C.</i> Singlet oxygen generation by nanoassemblies containing porphyrin macrocycles: steric and screening effects, energy transfer and competing processes.....	310
<i>Будаговский А. В., Будаговская О. Н., Будаговский И. А., Соловых Н. В., Янковская М. Б., Дубровский М. Л.</i> Зависимость прямой и обратной фотоконверсии фитохрома b от пространственной когерентности света .....	312
<i>Вачинская А. В., Русакович А. А., Пишбытко Н. Л.</i> Оценка световых фотосинтетических реакций в проростках <i>Hordeum vulgare</i> при совместном воздействии <i>Fusarium culmorum</i> и повышенной температуры.....	314
<i>Вечерек М. С., Мыслейко М. А., Савицкий А. С., Мацкевич В. С., Соколик А. И., Самович Т. В., Козел Н. В., Маноян Дж. Г., Габриелян Л. С., Муравицкая А. О., Демидчик В. В.</i> Разработка методов стимуляции продукции биоводорода клетками <i>Parachlorella kessleri</i> .....	315
<i>Вечтомова Ю. Л., Телегина Т. А., Айбуш А. В., Крицкий М. С.</i> Изомеры каротиноидов в тилакоидных мембранах цианобактерии <i>Arthrospira platensis</i> .....	316

Викс Т. Н., Кабашикова Л. Ф., Савченко Г. Е. Иммуный ответ и фотосинтетический аппарат в проростках ячменя при инфицировании <i>Bipolaris sorokiniana</i> Sacc. Shoem. ....	317
Волынчук Н. Н., Лукша В. И., Пашкевич Л. В. Влияние обработки дрожжевыми биоагентами на физиологическое состояние листьев винограда .....	319
Гришина А. И., Жаворонкова А. С., Агеева М. Н., Брилкина А. А., Воденев В. А. Сравнение оптических методов в досимптомной детекции фитопатогенов в растениях <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	320
Доманская И. Н., Молчан О. В. Антирадикальная активность и содержание полифенолов в листьях огурца, сформированных при светодиодном освещении и инфицированных грибом <i>Fusarium oxysporum</i> .....	321
Емельянова А. В., Курьянчик Т. Г. Влияние гистидина на содержание хлорофилла и его предшественников в проростках озимого рапса, выращенных на растворе 5-аминолевулиновой кислоты .....	323
Зыкова Д. Д., Константинова А. Н., Уродкова Е. К., Соколов В. С. Влияние структурных особенностей фталоцианинов на их адсорбцию и фотодинамическую активность на бислойных мембранах .....	324
Кабачевская Е. М., Суховеева С. В., Трофимов Ю. В., Баркун М. И. Влияние спектрального состава светодиодных ламп на ростовые и метаболические характеристики растений базилика в условиях закрытой светокультуры .....	325
Кабашикова Л. Ф., Доманская И. Н., Пашкевич Л. В., Молчан О. В. Функциональный ответ хлоропластов огурца ( <i>Cucumis sativus</i> ), сформированных при LED-освещении, на фузариозное увядание .....	326
Кленицкий Д. В., Крылов А. Б., Вершиловская И. В., Гладков Л. Л., Крук Н. Н. Ароматичность и $\pi$ -сопряжение NH-таутомеров свободных оснований корролов с различной архитектурой периферического замещения .....	328
Крылов А. Б., Гладков Л. Л., Кленицкий Д. В., Крук Н. Н. Роль N-замещения в формировании спектров поглощения порфина и его производных .....	329
Курьянчик Т. Г., Козел Н. В. Влияние предпосевной обработки семян 5-аминолевулиновой кислотой на фотохимическую активность фотосистем листьев растений ячменя при дефиците влаги в почве .....	330
Ловягина Е. Р., Локтюшкин А. В., Сёмин Б. К. Подкисление среды внутри тилакоида при активации фотосинтеза защищает кислород-выделяющий комплекс фотосистемы 2 от тепловой деградации .....	332
Лукша В. И., Пашкевич Л. В., Даркович М. А., Гордейчик И. Н., Кабашикова Л. Ф. Влияние наночастиц серебра на пигментный фонд проростков пшеницы при заражении грибом <i>Bipolaris sorokiniana</i> .....	334
Майоров В. П., Константинова А. Н., Зыкова Д. Д., Соколов В. С. Катионные порфирины с фосфором (V): механизм проникновения через мембрану .....	336
Надеева Е. М., Ветошкина Д. В., Игнатова Л. К., Руденко Н. Н., Иванов Б. Н. Изменение размера светособирающей антенны в растениях <i>Arabidopsis thaliana</i> с нокаутом альфа-карбоангидразы 2 .....	337

<i>Пищальников Р. Ю.</i> Оптимизация моделирования оптического отклика фотосинтетических пигментов и пигмент-белковых комплексов с помощью эволюционных алгоритмов .....	339
<i>Плавский В. Ю., Третьякова А. И., Плавская Л. Г., Микулич А. В., Нагорный Р. К., Собчук А. Н., Ананич Т. С., Свечко А. Д., Прокопенко Н. Д., Дудинова О. Н., Якимчук С. В., Леусенко И. А.</i> Закономерности ингибирующего действия синего света на раковые клетки в отсутствие экзогенных сенсibilизаторов .....	340
<i>Плюснина Т. Ю., Червицов Р. Н., Хрущев С. С., Дегтерева Н. С., Ризниченко Г. Ю.</i> Математические методы анализа состояния комплекса фотосистемы II в экологическом мониторинге .....	342
<i>Поздеева Л. Е., Ташкин В. Ю., Зыкова Д. Д., Соколов В. С.</i> Стириловые красители как датчики протонов, выделяемых из фотоактивируемых соединений на границе липидной мембраны .....	343
<i>Пишибытко Н. Л.</i> Роль подвижных переносчиков электронов в формировании ответной реакции фотосинтетического аппарата <i>Hordeum vulgare</i> при тепловом стрессе .....	345
<i>Соколов В. С., Ташкин В. Ю., Зыкова Д. Д.</i> Кинетика переноса протонов между липидной мембраной и водой при их освобождении из фотоактивируемых соединений .....	346
<i>Таболитч А. А., Третьякова А. И., Плавская Л. Г., Ананич Т. С., Нагорный Р. К., Плавский В. Ю., Ляшенко Л. С., Воронай Е. С., Луговский А. П.</i> Применение хемилюминесценции для изучения механизма фотодинамического повреждения микробных клеток, сенсibilизированных индотрикарбоцианиновым красителем .....	347
<i>Татур В. В., Филиппова Г. Г.</i> Воздействие пептидного элиситора AtPer на структурно-функциональные характеристики фотосинтетического аппарата проростков пшеницы в условиях окислительного стресса .....	348
<i>Тюлькова Е. Г., Савченко Г. Е.</i> Пути деградации хлорофилла в листьях растений городского ландшафта под влиянием летучих углеводородов .....	349
<i>Хрущев С. С., Плюснина Т. Ю., Фурсова П. В., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б.</i> Математическое моделирование переходных процессов в цитохромном <i>b<sub>6</sub>f</i> -комплексе .....	350
<i>Черепанов Д. А., Неверов К. В., Обухов Ю. Н., Гостев Ф. Е., Шелаев И. В., Айбуш А. В., Крицкий М. С.</i> Изучение динамики возбужденных состояний хлорофилла в водорастворимом хлорофилл-связывающем белке BoWSCP методом фемтосекундной pump-probe спектроскопии .....	351
<i>Шпилевский С. Н., Кабашикова Л. Ф.</i> Изучение влияния β-1,3-глюкана на функциональные и биохимические параметры листьев томата при фузариозе .....	352
<i>Волотовский И. Д., Слобожанина Е. И., Кабашикова Л. Ф., Аверина Н. Г.</i> К 95-летию Марии Тихоновны Чайка – известного ученого в области физиологии и биохимии фотосинтеза .....	353

## РАЗДЕЛ VIII ИММУНОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

<i>Гараев Т. М., Юдин И. И., Гребенникова Т. В., Гинцбург А. Л.</i> Низкомолекулярные ингибиторы РНК-содержащих вирусов прямого действия .....	358
<i>Косенко М. Н., Онхонова Г. С., Рыжиков А. Б.</i> Разработка алгоритма оценки восприимчивости клеточных культур к вирусу гриппа на основании кинетических параметров взаимодействия вирус-клетка .....	360
<i>Лебедева Ю. В., Клыч А. В., Вашкевич Е. П., Шман Т. В.</i> Оптимизация структуры CAR-рецептора для получения CAR-ЕК клеток .....	361
<i>Мальцева В. Н., Гайдин С. Г.</i> Новый подход к получению функционально активной микроглии: трикультура гиппокампа .....	362
<i>Онхонова Г. С., Рухлова Е. А., Косенко М. Н., Святченко С. В., Колосова Н. П., Tran Thi Nhai, Bui Thi Huong, Кузнецов А. Н., Марченко В. Ю., Рыжиков А. Б.</i> Фенотипические свойства штамма вируса гриппа птиц A/chicken/ThanhNoa/V1S5VTC/2020 (H9N2), содержащего адаптивные мутации.....	363
<i>Прокулевич В. А., Потапович М. И., Копылева Д. В., Дуж Е. В., Антонец Н. Г., Гончаров А. Е., Бушмакина И. М.</i> Изучение биологической активности рекомбинантных человеческих цитокинов .....	364
<i>Романова И. В., Гончаров А. Е., Шереметьева Л. З.</i> Метод генерации тучных клеток из гемопоэтических стволовых клеток .....	365
<i>Рубникович С. П., Хрусталёв В. В., Хрусталёва О. В.</i> Вариабельность аминокислотной последовательности главного адгезина стрептококков, вызывающих кариес .....	366
<i>Эргашев Н. А., Комилов Э. Ж., Йулдошев Б. Г., Кучкарова Л. С., Камиллов Х. П., Тахирова К. А., Кадырбаева А. А.</i> Изменение щелочной фосфатазы при экспериментальном афтозном стоматите .....	367

## **ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ**

## **СИГНАЛЬНЫЙ ХАБ НА ОСНОВЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО $\text{Ca}^{2+}$ И АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**

**В. В. Демидчик**

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Растения способны воспринимать внешние факторы посредством широкого спектра рецепторов, передающих информацию на систему вторичных посредников, таких как цитоплазматический  $\text{Ca}^{2+}$ , циклические нуклеотиды и другие вещества. Некоторые рецепторы непосредственно сопряжены с  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемыми ионными каналами и могут очень быстро кодировать информацию в форме мощных и разнообразных по форме флуктуаций цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$ . В то же время, практически любое внешнее воздействие, в особенности, стрессовое, не обходится без генерации активных форм кислорода (АФК). Этот процесс развивается также быстро, как и  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы, в ответ на те же факторы, что наводит на мысль об их общей («единой») природе. Более того, АФК способны активировать повышение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме, а цитоплазматический  $\text{Ca}^{2+}$  стимулировать работу важнейших ферментов синтеза АФК – НАДФН-оксидаз. В течение последних двух десятилетий нами и другими авторами развивается концепция так-называемого АФК/ $\text{Ca}^{2+}$ -хаба – распределительного сигнального центра в плазматической мембране растительной клетки, который управляет разнообразными по силе и качеству внешними сигналами. Данный хаб, вероятно, несет ответственность за распознавание гормональных и других химических сигналов, неспецифические и специфические стрессовые ответы, а также за процессы роста, развития и полярности у высших растений. В представленной работе детально рассматриваются компоненты данного АФК/ $\text{Ca}^{2+}$ -хаба, аспекты их работы и критические функции в клеточной сигнализации у растений.

## БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РИТМОГЕНЕЗА ПРИ ЭПИЛЕПСИИ

В. П. Зинченко<sup>1</sup>, И. Ю. Теплов<sup>1</sup>, Ф. В. Тюрин<sup>1</sup>, С. Г. Гайдин<sup>1</sup>, А. Малибаева<sup>2</sup>,  
Ларюшкин Д.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Россия.

<sup>2</sup>Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

На ранних стадиях развития мозга в нейрональной сети возникает сложный осцилляторный режим/ритм, который охватывает многие параметры клетки. Сложность ритма обусловлена наличием нескольких взаимосвязанных колебательных систем, имеющих различную частоту: колебания потенциалов действия (ПД) с частотой порядка 100 гЦ объединенных в пачки, колеблющиеся с частотой порядка 0,01–0,1 гЦ. Низкочастотные колебания управляются  $Ca^{2+}$  токами и сопровождаются высокоамплитудными осцилляциями концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . При ослаблении ГАМК(А)-рецептор-зависимого торможения режим осцилляций превращается в ритм эпилептиформной активности, для которого характерна гиперсинхронизация пачек ПД и появление еще одной колебательной системы, получившей название пароксизмального деполяризационного сдвига (PDS) с частотой порядка 5 гЦ [1]. Оказалось, что похожий ритм также наблюдается при таких заболеваниях, как ишемия, инсульт, травматические повреждения мозга и, что существенно, наблюдается в первые недели развития нейрональной сети, и необходим для роста отростков и установления синаптических контактов между нейронами. Таким образом, в настоящее время идет речь не столько о подавлении гипервозбуждения, сколько о механизмах управления этим процессом, позволяющих видоизменить ритм эпилептиформной активности и направить его на восстановление повреждений и развитие нейрональных связей. Причем, для уменьшения побочных эффектов фармакология управления должна обладать большей селективностью по отношению, как к типу нейронов, так и к определенным рецепторам. В последние годы решению этой задачи во многом способствовали два открытия. Было показано, что колебания кластеров PDS, самих PDS, кальциевых импульсов и ПД представляют собой автоволны. Для автоволн характерны отсутствие затухания и независимость переднего и заднего фронта импульса. Иными словами, передний и задний фронт формируются различными ионными каналами и ион-транспортными системами. Таким образом, появилась возможность селективно воздействовать на передний, возбуждающий фронт импульса и на задний, тормозной фронт.

Вторым достижением, продвинувшим решение задачи управления гипервозбуждением, стало открытие функций кальций-проводящих AMPA (CP-AMPA) и кинатных (CP-КА) рецепторов ГАМКергических нейронов [2]. В силу своих свойств ГАМКергические нейроны, экспрессирующие CP-KAR и CP-AMPA, раньше и быстрее реагируют на возбуждение, подавляя гипервозбуждение других нейронов за счет опережающей секреции ГАМК. Показано, что ГАМКергические нейроны, экспрессирующие CP-AMPA, растормаживают глутаматергические нейроны, подавляя ГАМКергические нейроны, экспрессирующие CP-KAR. Показано также, что, применяя модуляторы активности CP-KAR и CP-AMPA, можно селективно управлять гипервозбуждением и синаптической пластичностью определенных популяций глутаматергических нейронов.

### **Библиографические ссылки**

1. Involvement of NMDA and GABA(A) receptors in modulation of spontaneous activity in hippocampal culture: Interrelations between burst firing and intracellular calcium signal / I. Yu. Teplov [et al.] // BBRC. 2021. Vol. 553. P. 99–106.
2. Properties of GABAergic neurons containing calcium-permeable kainate and AMPA-receptors / V. P. Zinchenko // Life. 2021. Vol. 11. P. 1309.

## ПРИРОДНЫЕ ИНДУКТОРЫ ИММУНИТЕТА РАСТЕНИЙ: БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Л. Ф. Кабашникова

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

Стимуляция и управление иммунной системой – современное наукоемкое направление повышения устойчивости растений к инфекционным болезням. Научной основой новых биотехнологий защиты является выяснение механизмов стрессового ответа растений при инфицировании фитопатогеном. В процессе эволюции у растений выработались универсальные защитные механизмы для сопротивления биотическим стрессорам: растения развили сложные защитные системы устойчивости против широкого спектра патогенов, часто именуемые в литературе иммунитетом растений [1]. В докладе изложены современные научные представления о молекулярно-клеточных механизмах формирования иммунного ответа при инфицировании растений грибными патогенами, вызывающими корневые гнили. Рассмотрены механизмы действия природных индукторов болезнеустойчивости растений – салициловой кислоты (СК),  $\beta$ -аминомасляной кислоты ( $\beta$ -АМК) и  $\beta$ -1,3-глюкана на растения злаковых и овощных культур при патологических процессах, вызванных возбудителями корневых гнилей. Показано, что инфицирование растений ярового ячменя грибом *Bipolaris sorokiniana* Sacc. Shoem., возбудителем темно-бурой пятнистости, вызывает защелачивание апопласта на 1,7 единиц рН и развитие окислительного стресса в клетках мезофилла листа, что приводит к активации перекисного окисления липидов в мембранах и нарушению фотосинтетических процессов. Природные иммуномодуляторы индуцируют защитные системы растений ячменя путем активации антиоксидантных ферментов – пероксидазы и аскорбатпероксидазы, а также увеличения экспрессии генов PR-белков –  $\beta$ -1,3-глюканазы и хитиназы [2]. Под действием СК наблюдали также повышение активности других компонентов защитного ответа растений ячменя при патологическом процессе – мембранной НАДФН-оксидазы, генерирующей АФК (супероксидный анион-радикал, превращающийся под действием супероксиддисмутазы в пероксид водорода) и L-фенилаланинаммонийлиазы – ключевого фермента синтеза защитных фенольных соединений [2]. Изученные соединения вызывают прайминг защитных реакций в листьях ячменя, участвуя в системе регуляции рН и генерации АФК, стабилизируют окислительные и фотосинтетические процессы в клетках мезофилла ячменя при инфицировании, что обеспечивает снижение количества пораженных растений.

Установлены механизмы иммунного ответа в листьях томата и огурца при фузариозном увядании, вызванном грибом *Fusarium oxysporum*, и защитная роль СК,  $\beta$ -АМК и  $\beta$ -1,3-глюкана в стабилизации структурно-функционального состояния растительных клеток при патогенезе. Полученные результаты реализованы при создании регуляторов роста растений нового поколения «ИММУНАКТ-ГК» и «ИММУНАКТ-БИО», обеспечивающих стимуляцию роста и повышение урожайности зерновых и овощных культур, что способствует развитию в республике высокоэффективных агротехнологий защиты растений со сниженным экологическим риском [3].

### Библиографические ссылки

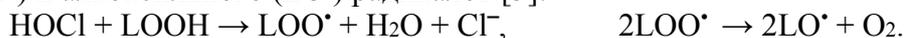
1. Шкаликов В. А. Иммуитет растений. Москва: Колос, 2013. – 190 с.
2. Pashkevich L. V., Kuryanchik T. G., Kabashnikova L. F. Effect of hyperthermia and exogenous salicylic acid on expression of PR-protein genes ( $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase) and activity of enzymes of protective response in barley plants under helminthosporiosis // Visn. HNAU, ser. biol. 2021. Vol. 1, iss. 52. P. 67–82.
3. Природные индукторы устойчивости растений к фитопатогенам: научные и практические аспекты применения / Л. Ф. Кабашникова [и др.]. Минск: Бел. наука, 2021. – 58 с.

# СВОБОДНОРАДИКАЛЬНАЯ ПЕРОКСИДАЦИЯ ЛИПИДОВ В УСЛОВИЯХ ГАЛОГЕНИРУЮЩЕГО СТРЕССА

О. М. Панасенко

ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, РФ

В лейкоцитах человека присутствует фермент миелопероксидаза (донор:  $\text{H}_2\text{O}_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.11.2.2), который катализирует образование активных форм галогенов (АФГ, главным образом,  $\text{HOCl}$  и  $\text{NO}_2$ ), являющихся сильными окислителями и галогенирующими агентами, повреждающими практически все классы биологически важных молекул (белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы и др.), что приводит к развитию галогенирующего стресса [1, 2]. В докладе показано, что АФГ, образующиеся в условиях галогенирующего стресса, способны индуцировать классическую цепную свободнорадикальную пероксидацию липидов (ПОЛ), протекающую через стадии инициирования, продолжения, разветвления и обрыва цепи [2, 3]. Установлено, что АФГ проникают в липидную фазу белок-липидных структур, вызывают деструкцию антиоксидантов, снижают устойчивость липидной фазы к окислению. Это сопровождается убылью числа ненасыщенных связей в ацильных цепях липидов и одновременно накоплением продукты ПОЛ: гидропероксидов, диеновых конъюгатов, карбонильных соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, флуоресцирующих продуктов типа оснований Шиффа. Ловушки свободных радикалов  $\alpha$ -токоферол и 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол в микромолярных концентрациях полностью блокируют выход перечисленных выше продуктов, доказывая свободнорадикальный механизм ПОЛ в условиях галогенирующего стресса. Наиболее вероятными реакциями, претендующими на стадию инициирования АФГ-индуцированной ПОЛ, являются реакции  $\text{HOCl}$  с нитритом и  $\text{NH}_2$ -группами, в которых образуются свободные радикалы.  $\text{HOCl}$  реагирует с гидропероксидами липидов ( $\text{LOOH}$ ) с образованием пероксильного ( $\text{LOO}^\bullet$ ) и алкоксильного ( $\text{LO}^\bullet$ ) радикалов [3]:



Через эти реакции реализуется стадия разветвления цепей АФГ-индуцированной ПОЛ.

В докладе подробно и всесторонне обсуждается механизм АФГ-индуцированной ПОЛ, а также рассмотрены примеры, свидетельствующие о причастности миелопероксидазы и продуцируемых ею АФГ к развитию социально-значимых заболеваний человека, ассоциированных с галогенирующим стрессом и ПОЛ: сердечно-сосудистых, эндокринных, нейродегенеративных, онкологических и др. [3].

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект 20-15-00390.

## Библиографические ссылки

1. Панасенко О. М., Сергиенко В. И. Галогенирующий стресс и его биомаркеры // Вестник Российской АМН. 2010. № 1. С. 27–39.
2. Панасенко О. М., Горудко И. В., Соколов А. В. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах // Успехи биологической химии. 2013. Т. 53. С. 195–244.
3. Панасенко О. М., Владимиров Ю. А., Сергиенко В. И. Свободнорадикальная пероксидация липидов, индуцированная активными формами галогенов // Успехи биологической химии. 2024. Т. 64. С. 291–348.

## МЕМБРАННО-ЗАВИСИМЫЕ РЕАКЦИИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ: МЕХАНИЗМЫ, КИНЕТИКА И ФИЗИОЛОГИЯ

М. А. Пантелеев

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия*

Мембранно-зависимые ферментативные реакции широко распространены во внутриклеточных и внеклеточных управляющих системах организма, так как они позволяют достигать высоких скоростей реакций с использованием небольшого количества молекул, что достигается за счет локального концентрирования молекул-участников и перевода процесса из трехмерного компартмента в двухмерный. Система свертывания крови представляет собой сложный внеклеточный каскад протеолитических ферментов, управляющий процессом формирования фибринового геля для остановки кровотечения при ранениях. Ее ключевые реакции протекают не в плазме крови, а на отрицательно заряженных фосфолипидных мембранах, которые могут предоставляться прокоагулянтной субпопуляцией активированных тромбоцитов, микровезикулами плазмы крови, липопротеидами, поврежденными тканями и другими источниками. Функционирование мембранно-зависимых комплексов факторов свертывания крови является одним из наименее изученных аспектов этой системы в силу их неустойчивости и сложности. Здесь мы рассмотрим основные проблемы, гипотезы и современные направления развития в этой области. Они включают в себя: механизмы сборки комплексов и пути доставки субстратов к ферментам; роль кофакторов в ускорении реакции; роль мембранных реакций в контроле транспортных процессов в зависимости от реологических условий; олигомеризация мембранных факторов свертывания и ее роль в противодействии потоку; управление формированием и особенности структуры прокоагулянтных и апоптотических тромбоцитов; прокоагулянтная активность иных клеток крови и тканей, а также микровезикул; протекание мембранных реакций в тромбах и гемостатических пробках *in vivo*; патофизиологическая, биотехнологическая, диагностическая и фармакологическая значимость мембранных реакций.

## УЧАСТНИКИ ОБМЕНА ЖЕЛЕЗА, КАК МИШЕНИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ И ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

**А. В. Соколов, И. Н. Исакова-Сивак**

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

Железо (Fe) – является микроэлементом, от доступности которого зависят критичные для выживания клетки процессы, как дыхание, адаптация к гипоксии и к окислительному стрессу, а также репликация ДНК. Важно отметить, что в нейтральной среде, в том числе к плазме крови, ионы Fe(II) быстро окисляются до Fe(III), которое нерастворимо и требует наличия специального белкового переносчика – трансферрина (Tf). В плазме крови окисление ионов железа катализирует медь-содержащая ферроксидаза, церулоплазмин (Cp). Последний осуществляет четырех-электронный перенос на кислород с образованием воды без продукции радикалов и эффективную загрузку Fe(III) в Tf либо его катионный гомолог – лактоферрин (Lf). Недавно нами была обнаружена способность Lf выступать в роли антигипоксического фактора, стабилизирующего гипоксия-индуцибельные факторы (HIF 1-альфа и 2-альфа) в апо-форме. Насыщение Lf ионами железа, катализируемое Cp, регулировало антигипоксическую активность апо-формы Lf по принципу отрицательной обратной связи. При взаимодействии Lf с олеиновой кислотой был получен цитотоксический комплекс, эффективность которого была продемонстрирована в экспериментах ростом с клеток гепатомы (H22a), инокулированной мышам. Более того, цитотоксичность комплексов Lf с олеиновой кислотой зависела от насыщения белка железом и регулировалась при взаимодействии Lf с Cp [1]. Учитывая, что поступление Fe в клетку зависит от захвата насыщенного железом Tf его клеточным рецептором (TfR1), TfR1 рассматривается как перспективная мишень для терапии онкологических заболеваний. В частности, в начале этого века были открыты низкомолекулярные индукторы деградации TfR1, ферристатины. Ферристатин II (хлоразоловый черный) оказался эффективным ингибитором инфекции и репликации нескольких штаммов коронавируса (SARS-CoV-2), за счет подавления проникновения рецептор-связывающего домена шипового белка коронавируса в клетки Vero [2]. Использование Lf и других лигандов TfR1 оказалось эффективным подходом для подавления коронавирусной инфекции [3]. Обсуждаются перспективы терапии вирусных инфекций, использующих TfR1 для проникновения в клетки.

### Библиографические ссылки

1. *Elizarova A. Y., Sokolov A. V., Vasilyev V. B.* Ceruloplasmin reduces the lactoferrin/oleic acid antitumor complex-mediated release of heme-containing proteins from blood cells // *International journal of molecular sciences*. 2023. Vol. 24. P. 16711.
2. *Ferristatin II efficiently inhibits SARS-CoV-2 replication in Vero cells / A. Sokolov [et al.] // Viruses*. 2022. Vol. 14. P. 317.
3. *Molecular mimicry of the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein: from the interaction of spike-specific antibodies with transferrin and lactoferrin to the antiviral effects of human recombinant lactoferrin/ A. V. Sokolov [et al.] // Biometals*. 2023. Vol. 36. P. 437–462.

# **МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА**

# SYNTHESIS AND ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF FLUORESCENT BODIPY-LABELED ISONIAZID

**M. S. Horetski, N. S. Frolova, Y. V. Faletrov**

*Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University,  
Minsk, Belarus*

Tuberculosis (TB) remains a major threat in low- and middle-income countries, worsened by drug-resistant *M. tuberculosis* strains. Isoniazid (INH), a prodrug activated by KatG enzyme to inhibit mycobacterial mycolic acid synthesis, is a basis of TB treatment. INH is a hydrophilic molecule that gets into the cell by passive diffusion. While INH demonstrates potent activity, some N-acylated INH derivatives (NAINH) show promise as even more effective anti-TB drugs, possibly for improved cell penetration [1]. For investigating NAINH properties the use of fluorescence offers valuable visualization tools. Among these, boron-dipyrromethenes (BODIPYs) are popular as emissive dyes with high lipophilicity [2]. This property makes BODIPYs ideal for developing fluorescent NAINHs. In this work, we introduce a novel BODIPY-based fluorescent NAINH (BDP-INH) with antimycobacterial activity.

The compound was synthesized by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide mediated coupling of 3-(BODIPY-8-yl)propionic acid with INH. BDP-INH exhibits bright green fluorescence and a high molar absorption coefficient (ethanol,  $\phi=0.84$ ,  $\epsilon_{491}=73490 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). The growth curve of *M. tuberculosis* H37Rv cells demonstrated the antimycobacterial effect of BDP-INH. The minimum inhibitory concentration at 99% inhibition (MIC99) for BDP-INH was determined using the colony-forming unit counting method. The MIC99 value for BDP-INH falls within the range of 0.2  $\mu\text{mol/L}$ . In comparison, the MIC99 for isoniazid in the same experiment was 0.36  $\mu\text{mol/L}$ . The results were reproduced in three independent replicates, indicating reliability.

The lipophilicity of BDP-INH was evaluated using the octanol-1/water partition coefficient (LogP) calculated by the fragment-based XLogP3 method [3]. BDP-INH exhibits a LogP of 1.76, compared to -0.70 for INH. This difference aligns with the hypothesis that lipophilicity enhances INH's antimycobacterial activity.

To clarify the ability of BDP-INH to bind with the KatG (1sj2) enzyme, molecular docking studies (AutodockVina 1.1.2) were performed. The calculated free binding energy ( $E_{\text{bind}}$ ) for INH is -6.1 kcal/mol. Simulations show that BDP-INH adopts a favorable orientation in the enzyme active site with an  $E_{\text{bind}}$  of -7.6 kcal/mol. The increase in  $E_{\text{bind}}$  is likely attributed to the formation of additional hydrogen bonds between BDP-INH and Trp107, Arg104, and Asp137 residues.

The results show NAINHs to be a perspective group of compounds for the development of new INH-based antimycobacterial agents.

This work was supported by the State Program of Scientific Research (grant № 20210560).

## References

1. Molecular details of INH-C<sub>10</sub> binding to wt KatG and its S315T mutant / V. H. Teixeira [et al.] // *Mol. Pharmaceutics*. 2015. Vol. 12. P. 898–909.
2. Kowada T., Maeda H., Kikuchi K. BODIPY-based probes for the fluorescence imaging of biomolecules in living cells // *Chem. Soc. Rev.* 2015. Vol. 44. P. 4953–4972.
3. Horetski M. S., Chylik Y. A., Shkumatov V. M. Investigating lipophilicity of boron dipyrromethenes using experimental and computational approaches // *CDC*. 2024. Vol. 51. P. 101129.

**PICOSECOND TO MILLISECOND TRANSIENT ABSORPTION  
SPECTROSCOPY OF CARBONMONOXY- AND OXYHEMOGLOBIN IN THE  
VISIBLE AND MID-INFRARED SPECTRAL REGION**

**S. V. Lepeshkevich<sup>1</sup>, I. V. Sazanovich<sup>2</sup>, M. V. Parkhats<sup>1</sup>, S. N. Gilevich<sup>3</sup>,  
A. V. Yantsevich<sup>3</sup>, J. A. Weinstein<sup>4</sup>, M. Towrie<sup>2</sup>, B. M. Dzhagarov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*B.I. Stepanov Institute of Physics, Minsk, Belarus*

<sup>2</sup>*Central Laser Facility, STFC Rutherford Appleton Laboratories, Harwell, UK*

<sup>3</sup>*Institute of Bioorganic Chemistry, Minsk, Belarus*

<sup>4</sup>*University of Sheffield, Sheffield, UK*

Human hemoglobin (Hb) is an allosteric protein that transports molecular oxygen (O<sub>2</sub>) [1]. Hb is a tetramer consisting of two  $\alpha$  and two  $\beta$  subunits. Each subunit contains one identical ferrous heme group which can reversibly bind one ligand molecule (O<sub>2</sub> or carbon monoxide (CO)). Hb binds four ligands cooperatively. As tetrameric Hb is liganded, its quaternary structure changes and the ligand affinity increases. At present, there is no definitive agreement on how ligand-induced conformational changes influence individual ligand binding properties of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in the different conformational forms of tetrameric Hb. This information is necessary to understand the molecular mechanism of cooperative oxygenation of Hb as well as the mechanism of ligand transport and tissue oxygenation. The principal aim of this study was to determine how ligand-induced conformational changes influence the individual ligand binding properties of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits within Hb.

Taking advantage of the photosensitivity of the chemical bond between the ferrous heme iron and the ligand molecule (O<sub>2</sub> or CO), picosecond to millisecond laser time-resolved spectroscopy in the visible and mid-infrared spectral region was used for kinetic studies of ligand binding and conformational changes following ligand photodissociation in Hb. Valency hybrids of Hb and the isolated Hb chains were used as models for Hb. The valency hybrids were obtained by the method [1]. Time-resolved spectra in the visible (Soret) and mid-infrared region were measured on the ULTRA apparatus [2] at the Central Laser Facility (Didcot, UK). All the experiments were performed in 50 mM Tris buffers, at 19 °C. Excitation wavelength, 543 nm.

A kinetic model for the geminate ligand rebinding in the ferrous hemoglobin subunits, ligand migration between the primary and secondary docking site(s) [3], and nonexponential tertiary relaxation within the liganded quaternary structure, was introduced and discussed. Significant functional non-equivalence of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in both the geminate ligand rebinding and concomitant structural relaxation was revealed. The conformational relaxation following the ligand photodissociation in the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits was found to decrease the rate constant for the geminate ligand rebinding, this effect being more than one order of magnitude greater for the  $\beta$  subunits than for the  $\alpha$  subunits. Evidence was provided for the modulation of the ligand rebinding to the individual  $\alpha$  and  $\beta$  subunits within Hb by the intrinsic heme reactivity through a change in proximal constraints upon the relaxation of the tertiary structure on a picosecond to microsecond time scale.

## References

1. Towards understanding non-equivalence of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits within human hemoglobin in conformational relaxation and molecular oxygen rebinding / S. V. Lepeshkevich [et al.] // Chem. Sci. 2021. Vol. 12. P. 7033–7047.
2. ULTRA: A unique instrument for time-resolved spectroscopy / G. M. Greetham [et al.] // Appl. Spectrosc. 2010. Vol. 64. P. 1311–1319.
3. Molecular oxygen migration through the xenon docking sites of human hemoglobin in the R-state / S. V. Lepeshkevich [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. 2016. Vol. 1864. P. 1110–1121.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИМЕТИКОВ АПОЛИПОПРОТЕИНА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ НОСИТЕЛЕЙ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК

**В. М. Абашкин<sup>1</sup>, В. А. Жогла<sup>1</sup>, А. О. Игнатъев-Качан<sup>2</sup>, О. Л. Шарко<sup>3</sup>,  
В. В. Шманай<sup>3</sup>, Д. Г. Щербин<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>*Корейский институт науки и технологий, Сеул, Корея*

<sup>3</sup>*Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Для лечения различных онкологических заболеваний в последние годы разрабатываются новые методы, включающие подходы генетической терапии, в том числе на основе РНК-интерференции, эффекторами которой являются малые интерферирующие РНК (миРНК).

Основным препятствием для реализации потенциала механизма РНКи в качестве лекарственной терапии является получение молекул миРНК в нужном месте в организме. В этой связи внимание исследователей было привлечено к природному механизму доставки с помощью липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Такие частицы состоят из биологических молекул, таких как фосфолипиды, простые эфиры холестерина и аполипопротеины, и поэтому сохраняют биосовместимость. Аполипопротеины, белки, которые могут связываться с липидами, играют ключевую роль в формировании естественных ЛПВП и поддержании их функций [1]. Тем не менее, природные аполипопротеины являются дорогостоящими и требовательными в использовании. Вместо непосредственно аполипопротеинов могут быть использованы миметики, которые представляют собой небольшие пептиды с амфипатическими спиральными мотивами, предназначенные для повторения поведения природных аполипопротеинов. По ряду характеристик миметики не только не уступают природным аналогам, но и превосходят их в зависимости от поставленной задачи.

Печень является основным органом метаболизма холестерина, и поэтому в гепатоцитах наблюдается гиперэкспрессия рецепторов для ЛПВП SR-BI. SR-BI – физиологический рецептор гепатоцитов с высоким сродством к белку аполипопротеину A1 ЛПВП, участвует в двунаправленном переносе холестерина между липопротеинами и клеточной мембраной клеток печени. Текущие исследования выявили гиперэкспрессию этого рецептора при нескольких типах рака. Таким образом, печень является преобладающим органом-мишенью для ЛПВП, а раковые клетки имеют измененный липидный обмен, сопровождающийся гиперэкспрессией рецептора SR-BI [1].

В нашей работе мы сравнили эффективность доставки миРНК с помощью липидных наночастиц (ЛНЧ) на основе смеси природных и синтезированных липидов в сочетании с Аполипопротеином A1 (ApoA1) и его пептидным миметиком 4F в отношении клеток гепатоцеллюлярной карциномы. В результате исследования было показано, что независимо от использования природного ApoA1 или же его миметика 4F, ЛНЧ высокой плотности образуют стабильные комплексы с миРНК. Размер ЛНЧ варьируется в зависимости от способа подготовки и добавления компонентов от 10 до 50 нм. При этом использование пептида-миметика

демонстрировало лучшие результаты при формировании комплексов. При формировании наночастиц ЛПВП было обнаружено, что существует риск 4F- или ApoA1-опосредованного высвобождения миРНК из липидных наночастиц в случае использования ионизируемых липидов.

#### **Библиографические ссылки**

1. A high-density lipoprotein-mediated drug delivery system / Z.-C. Mo [et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. Vol. 106. P. 132–147.

## АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ЩЕЛОЧНЫХ МЕТАЛЛОВ В АНТИГОЛОЛЕДНЫХ ОБРАБОТКАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАМЕННОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ И ОЦЕНКА ИХ ФИТОТОКСИЧНОСТИ

М. И. Алексеева, М. А. Черныш, П. О. Савенко, А. И. Соколик, В. В. Демидчик

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь*

Обработка дорог антигололедными реагентами в зимний период оказывает негативное влияние на окружающую среду, поражая придорожную растительность. Антигололедные реагенты – химические вещества, понижающие температуру замерзания воды и задерживающие образование льда. Обработка данными реагентами является обычной практикой в странах с холодным климатом. Предполагается, что негативные эффекты таких реагентов связаны с воздействием NaCl на организм растения, в первую очередь, на корневую систему. Тем не менее, системных исследований с привлечением физико-химического и биологического анализа по этой проблеме не проведено. Среди антигололедных обработок наиболее часто используется NaCl из-за его доступности, низкой стоимости и невысокой токсичности для человека. Однако, NaCl в высоких концентрациях токсичен для большинства растений и вызывает так называемый солевой стресс. Реакция растений на NaCl детально исследована для растений засушливых регионов. Она включает изменения ионного, осмотического и электрического баланса растительной клетки, приводящие к задержке роста и развития организма, а также, при высоких уровнях NaCl (>40 мМ), к острой токсичности, проявляющейся в повреждении и отмирании клеток. Целью данной работы являлся анализ содержания Na<sup>+</sup> и катионов других щелочноземельных металлов в пробах снега и почв, собранных на разном расстоянии от дороги после применения антигололедных обработок в г. Минске и Минском районе (пламенная спектрофотометрия). В работе исследовался рост и развитие модельных видов высших растений в субстратах, изготовленных на основе данных проб (культуры *in vitro*, почвенные субстраты). В качестве модельных объектов выступали *Arabidopsis thaliana* (L. Heynh.), *Forsythia intermedia* Zabel и *Betula pendula* Roth. Элементный анализ исследуемых проб показал, Na<sup>+</sup> является основным компонентом антигололедных реагентов. Его концентрация во всех пробах многократно превышала уровни K<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup>. На самом приближенном к трассе участке (1 м) она составила 344±28 мМ, на наиболее дальнем (100 м) – 2,6±1,9 мМ. На втором месте по содержанию в пробах оказался Ca<sup>2+</sup> (1 м: 15,37±3,5 мМ; 100 м: 0,12±0,01 мМ). На третьем месте – K<sup>+</sup>, его концентрация в пробе, отобранной на расстоянии 1 м, составляла 1,1±0,07 мМ, на расстоянии 100 м – 0,005±0,03 мМ. Известно, что такие низкие уровни Ca<sup>2+</sup> и K<sup>+</sup> безвредны для высших растений. Соответственно, токсическое действие антигололедных обработок связано с Na<sup>+</sup>. Ростовые тесты показали, что наибольшее ингибирующее воздействие проб проявлялось в отношении форзиции промежуточной. Пробы, отобранные на расстоянии 1 и 5 м от дороги, полностью подавляли рост как побегов, так и корней данного растения, на расстоянии 25 м снижали скорость роста побегов на 43% и на 26% корня, на расстоянии 100 м не подавляли рост. Береза повислая и арабидопсис были менее чувствительными к засолению, однако демонстрировали полное угнетение роста корней и побегов на фоне проб, отобранных на расстоянии 1 и 5 м от дороги. Рост корней березы повислой ингибировался пробами, отобранными с 25 м, на 35%, побегов – на 25%; а пробами, отобранными на расстоянии 50 м, рост корней и побегов подавлялся на 32% и 18%, соответственно. У арабидопсиса пробы, отобранные на расстоянии 25 м от дороги, ингибировали рост на 40%, а на 50 м – на 34%. Эти данные коррелировали с чистым эффектом NaCl на тестируемые виды растений.

## СЕЛЕКТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ НАФАМОСТАТНОГО ТИПА

Д. С. Байроченко

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

Сериновые протеазы – подкласс ферментов, которые необходимы для реализации целого ряда физиологических процессов. Особенно важная роль отводится урокиназе – ферменту с внеклеточной локализацией. При определенных типах онкологических заболеваний происходит сверхэкспрессия гена, кодирующего данный белок [1]. Вследствие этого интенсифицируются процессы разрушения межклеточного матрикса и адгезионных межклеточных контактов, что неуклонно ведет к прогрессированию опухолевого процесса и раковой инвазии.

Ранее в исследовании *in silico* [2] нами был сконструирован ряд производных Нафамостата, которые показали большую аффинность к урокиназе по сравнению с первоначальным соединением и могут рассматриваться как потенциальные ингибиторы данного фермента. При этом важным этапом разработки лекарственных средств является изучение селективности их действия по отношению к молекуле-мишени. В настоящей работе было проведено *in silico* исследование взаимодействия Нафамостата и его производных 6-(N-метилкарбамидоил)нафталин-2-ил-4-гуанидилбензоата (MYG) и 6-карбомидоилнафталин-2-ил-4-(3,3-диметилгуанидино)бензоата (СУВ) с сериновыми протеиназами организма человека.

С помощью онлайн-сервиса SwissTargetPrediction был проведен обратный докинг Нафамостата и двух его производных, в результате чего была создана библиотека из 50-ти потенциальных белков-мишеней. Из полученного списка было отобрано девять белков, для которых программой определена наибольшая вероятность взаимодействия с изучаемыми лигандами: активатор фактора роста гепатоцитов, гепсин, калликреин 1, компонент системы комплемента C1s, матриптаза, плазмин, трипсин 1, тромбин и фурин. Третичные структуры белков были получены из базы данных PDB. Докинг был выполнен в программе AutoDock 4.2.6 с использованием алгоритма Ламарка с числом пробегов 50 и размером популяции 150. Для изучения вероятности связывания лигандов не только в области каталитической триады белков, но и возникновения неспецифических взаимодействий мы придерживались тактики так называемого «слепого» докинга (с покрытием максимально возможной поверхности белка). Установлено, что Нафамостат проявляет наибольшую аффинность к фурину (-11,56 ккал/моль), урокиназа же находится на 2-ом месте со значением -10,15 ккал/моль. Лиганды MYG и СУВ проявляют наибольшее сродство к урокиназе (-13,88 и -13,47 ккал/моль соответственно). Вышеназванные лиганды также взаимодействуют с иными изучаемыми белками, однако, со значительно меньшим значением свободной энергии Гиббса.

Результаты позволяют предположить наибольшую специфичность взаимодействия с урокиназой у лиганда СУВ. Полученные данные являются предпосылкой для проведения дальнейшего более детального изучения белок-лигандных взаимодействий посредством гибкого докинга.

### Библиографические ссылки

1. *Madunić J.* The urokinase plasminogen activator system in human cancers: an overview of its prognostic and predictive role // *Thromb Haemost.* 2018. Vol. 118, iss. 12. P. 2020–2036.

2. *Ринейская О. Н., Байроченко Д. С.* Дизайн производных гуанидилбензойной кислоты с потенциальной антиопухолевой активностью с использованием методов молекулярного докинга // *БГМУ в авангарде медицинской науки и практики.* 2023. Т. 1, № 13. С. 321–327.

# ПРЕДЕЛ ИЗГИБНОЙ ПРОЧНОСТИ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ ОПРЕДЕЛЯЕТ ПУТЬ СТРУКТУРНОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ МЕМБРАН ПРИ ИХ СЛИЯНИИ И ДЕЛЕНИИ

**П. В. Башкиров**

*НИИ Системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия*

Деление и слияние мембран в клетке реализуются через образование сильно искривленных промежуточных мембранных структур. Изгиб мембраны не только позволяет ограничить место топологической перестройки мембраны, но и создает упругое напряжение, являющиеся триггером структурной реорганизации липидного бислоя [1, 2]. Экспериментальные и теоретические исследования позволили выявить различные пути реорганизации липидов, индуцированные критическим изгибным напряжением. Однако остается неясным, какие молекулярные и силовые факторы контролируют выбор определенного пути и обеспечивают перестройку мембраны с сохранением ее барьерных свойств. В данной работе мы экспериментально и теоретически исследуем действие изгибного стресса с помощью простой одномерной модели – мембранной нанотрубки (НТ), сжимаемой белками и физическими силами. Мы используем электрическое поле для измерения ионной проводимости просвета и стенки НТ и одновременно для оценки материальных параметров (изгибная жесткость) мембраны НТ во время ее сужения и разрыва [3]. Мы обнаружили, что мембрана НТ сохраняет линейную упругость при изгибе вплоть до момента разрыва. Разрыв, наблюдаемый по резкому исчезновению люминальной связности, происходил спонтанно при достижении определенной критической кривизны мембраны НТ, являющейся функцией ее липидного состава. Теоретический анализ показал, что структурная неустойчивость липидного бислоя связана с достижением порогового значения напряжения изгиба, функцией изгибной жесткости и спонтанной кривизны монослоев НТ. Анализ динамики сужения НТ белками деления мембран показал, что эти белки чувствуют упругий отклик липидов и обычно создают предкритические или кратковременные критические напряжения, что позволяет эффективно избежать утечки мембраны. Мы пришли к выводу, что деформации сильно изогнутых промежуточных структур слияния и деления мембран могут быть описаны в терминах линейной макроскопической упругости. Мы также предполагаем, что материальные свойства липидного бислоя отражаются на функциональном дизайне белков, опосредующих топологическую перестройку клеточных мембран, – действие этих белков адаптировано к липидному клеточной мембраны.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект №22-15-00265.

## **Библиографические ссылки**

1. *Golani G., Schwarz U. S.* High curvature promotes fusion of lipid membranes: Predictions from continuum elastic theory // *Biophysical Journal*. 2023. Vol. 122, iss. 10. P.1868–1882.
2. *Kozlov M. M., McMahon H. T., Chernomordik L. V.* Protein-driven membrane stresses in fusion and fission // *Trends in biochemical sciences*. 2010. Vol. 35, iss. 12. P. 699–706.
3. *Reconstitution and real-time quantification of membrane remodeling by single proteins and protein complexes / P. V. Bashkirov [et al.] // Nature protocols*. 2020. Vol. 15, iss. 8. P. 2443–2469.

## МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СЕНСОР ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ НА ОСНОВЕ АЦИЛГИДРАЗОНА РОДАМИНА Б

Н. В. Белько<sup>1</sup>, А. М. Мальтанова<sup>2</sup>, А. В. Богданова<sup>3</sup>, Т. А. Кулагова<sup>3</sup>,  
А. П. Луговский<sup>1</sup>, С. К. Позняк<sup>2</sup>, М. П. Самцов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко БГУ, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>НИИ физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь

<sup>3</sup>Институт ядерных проблем БГУ, Минск, Беларусь

Гидразид родамина Б (ГРБ) и его производные находят применения для визуализации внутриклеточных процессов и детектирования различных аналитов *in vitro* [1].

В данной работе приведены результаты исследований ацилгидразона родамина Б (АРБ) в качестве сенсора для внутриклеточного определения рН и присутствия потенциально токсичных ионов меди(II). В результате того, что в кислой среде происходит протонирование молекул АРБ и раскрытие спиролактамового цикла, новое соединение приобретает окраску и флуоресценцию. Впоследствии наблюдается медленный гидролиз АРБ до ГРБ и ацетона, что приводит к ослаблению окраски и флуоресценции. Протонирование и гидролиз АРБ катализируются избытком ионов водорода, а ионы меди(II) способствуют этим процессам за счет связывания гидроксид-ионов и понижения рН. Помимо протонирования и гидролиза молекул АРБ, ионы меди (II) способствуют дальнейшим превращениям красителя с образованием катиона родамина Б и производного фенантрена, которые обладают флуоресценцией в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах соответственно. Полученные результаты могут быть использованы в различных сенсорах на основе родаминов и оснований Шиффа.

Эффективность АРБ для биоимаджинга продемонстрирована на культуре клеток MDBK. В результате установлено, что краситель проникает внутрь клеток и начинает флуоресцировать в диапазоне 550–700 нм внутри органелл с кислым рН, преимущественно в лизосомах. Яркая флуоресценция наблюдается даже при инкубации клеток с малыми концентрациями красителя (5 мкмоль/л). Несмотря на гидролиз в кислой среде, интенсивный сигнал флуоресценции красителя внутри клеток сохраняется в течение нескольких часов, что позволяет производить длительные эксперименты. Последующая инкубация клеток с ионами меди(II) приводит к возникновению флуоресценции в ближнем инфракрасном диапазоне (700–900 нм).

Таким образом, РБА может использоваться в качестве многофункционального флуоресцентного биосенсора для визуализации клеточных компартментов с кислым рН и внутриклеточного обнаружения ионов меди(II).

Данная работа выполнена при поддержке ГПНИ «Конвергенция – 2025» (задание 3.03.6).

### Библиографические ссылки

1. A new trend in rhodamine-based chemosensors: application of spiro lactam ring-opening to sensing ions / H. M. Kim [et al.] // Chem. Soc. Rev. 2008. Vol. 37. P. 1465–1472.

## КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ БИТОПНЫХ БЕЛКОВ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

**Э. В. Бочаров<sup>1,2</sup>, Я. В. Бершацкий<sup>1,2</sup>, Д. М. Лесовой<sup>1</sup>, К. В. Павлов<sup>2</sup>,  
Н. В. Кузьмина<sup>3</sup>, Т. В. Ракитина<sup>1</sup>, А. С. Кузнецов<sup>1,2</sup>, П. Е. Волынский<sup>1</sup>,  
В. В. Бритиков<sup>4</sup>, Е. В. Бритикова<sup>4</sup>, С. А. Усанов<sup>4</sup>, Р. Г. Ефремов<sup>1,2</sup>,  
А. С. Арсеньев<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
Москва, Россия*

<sup>2</sup>*Московский физико-технический институт (государственный университет),  
Долгопрудный, Россия*

<sup>3</sup>*Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва,  
Россия*

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

Биологическая функция битопных мембранных белков, имеющих только один трансмембранный сегмент, обеспечивается сетью разнообразных межмолекулярных взаимодействий в клеточной мембране. Битопные белки из цитохром Р450-зависимой системы принимают участие в биосинтезе и метаболизме физиологически активных веществ в организме человека. К этому классу белков также принадлежат рецепторы типа I, которые принимают непосредственное участие в развитии и поддержании гомеостаза тканей организма человека. Рецепторные тирозинкиназы служат удобными моделями рецепторов типа I, чтобы показать, как лиганд-индуцированные конформационные перестройки и специфическая димеризация внеклеточных и трансмембранных доменов приводят к аллостерической активации цитоплазматических доменов при передаче сигнала через мембрану клетки. Болезнь Альцгеймера представляет собой возрастную патологию, связанную с накоплением  $\beta$ -амилоидных пептидов, – продуктов ферментативного расщепления секретазы битопного белка-предшественника  $\beta$ -амилоида, принадлежащего к рецепторам типа I. Нарушения функционирования данных битопных белков приводят к развитию ряда патологий, а их ингибиторы являются одними из самых успешных примеров таргетной терапии онкологических и нейродегенеративных заболеваний на сегодняшний день. В течение ряда лет мы определяли альтернативные конформации примембранных и трансмембранных сегментов данных битопных белков в имитирующих мембрану средах, используя ЯМР-спектроскопию высокого разрешения в сочетании с другими методами структурной биологии. Нами показано, что функционирование данных битопных белков обуславливается не только специфическими белок-белковыми и белок-липидными взаимодействиями, но и физическим состоянием липидного окружения, как одного из главных компонентов самосогласованной системы биологической мембраны. Это позволило нам раскрыть принципы, лежащие в основе передачи сигнала через мембрану клетки и распознавания субстрата мембранными белками, а также механизмы действия ряда патогенных мутаций.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-44-10021 <https://rscf.ru/project/23-44-10021/>) в части структурно-динамических исследований белков и совместного научного проекта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований с Российским научным фондом “БРФФИ–РНФ” (грант № X23РНФ-091) в части белковой инженерии.

# ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИБОСОМ-ИНАКТИВИРУЮЩЕГО БЕЛКА ТРИХОБАКИНА С С-КОНЦЕВЫМ ФРАГМЕНТОМ P2 БЕЛКА 80S РИБОСОМЫ ПО ДАННЫМ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ ГЕТЕРОЯДЕРНОЙ ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

**В. В. Бритиков<sup>1</sup>, Е. В. Бритикова<sup>1</sup>, Э. В. Бочаров<sup>2</sup>, С. А. Усанов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*ФГУБ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация*

Корреляционная гетероядерная ЯМР спектроскопия является мощным методом, позволяющим детально изучить на атомарном уровне взаимодействия между молекулами белков и их лигандами различной природы. Анализ картины пертурбации химических сдвигов в  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC спектрах при титровании  $^{15}\text{N}$  меченного белка молекулами лигандов является основой эксперимента, направленного на определение кинетики и термодинамики процесса взаимодействия между исследуемыми молекулами [1].

В данной работе мы использовали ЯМР спектроскопию для исследования взаимодействия рекомбинантного рибосом-инактивирующего белка трихобакина (ТВК) с С-концевым фрагментом P2 белка стеблевого комплекса 80S рибосомы человека. ТВК является перспективным белком для создания на его основе таргетных противоопухолевых препаратов, так как обладает исключительной ингибирующей активностью синтеза белка на рибосомах млекопитающих ( $\text{IC}_{50} - 3.5 \text{ пМ}$ ) [2]. ТВК относится к РИБ 1-го типа, поэтому не обладает токсическими свойствами, избирательно ингибирует рост раковых клеточных линий [3]. Для рационального улучшения таргетных свойств ТВК необходимо располагать детальной информацией о механизме взаимодействия с белками партнерами, в том числе и с ключевыми белками стадии элонгации трансляции, к которым относится P2 белок, для того чтобы снизить вероятность нарушения соответствующего взаимодействия при изменении структуры методами белковой инженерии.

В результате работы был картирован сайт взаимодействия и определена константа  $K_D$  и  $K_{\text{off}}$  для комплекса между ТВК и фрагментами P2 белка разной длины (от 11, 18 и 24 а.о. с С-конца) с применением 2D анализа формы линии кросс-пиков в спектрах  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC [4]. Установлено, что механизм взаимодействия может быть описан одностадийной бимолекулярной реакцией с одним сайтом взаимодействия в области спиралей  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$  и С-концевой  $\beta$ -шпильки. Сродство между ТВК и P2 увеличивается при переходе от 11 ( $K_D - 960 \pm 80 \text{ мкМ}$ ) к 18 остаткам ( $K_D - 264.9 \pm 1.7 \text{ мкМ}$ ) и не изменяется при дальнейшем удлинении цепи P2. Полученная информация позволит избежать нежелательного воздействия на результирующую ингибирующую активность при рациональном дизайне противоопухолевого препарата на основе ТВК методами белковой инженерии.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (грант № X23РНФ-091) и РФФ (грант № 23-44-10021).

### Библиографические ссылки

1. *Williamson M. P.* Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding // *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*. 2013. Vol. 73. P. 1–16.
2. Backbone and side-chain chemical shift assignments for the ribosome-inactivating protein trichobakin (TBK) / V. V. Britikov [et al.] // *Biomolecular NMR Assignments*. 2020. Vol. 14. P. 55–61.
3. *In vitro* and *in vivo* anti-tumor effect of Trichobakin fused with urokinase-type plasminogen activator ATF-TBK / D. D. Pham [et al.] // *Molecular Biology Reports*. 2024. Vol. 51, iss. 1. P. 130.
4. Two-dimensional NMR lineshape analysis / C. A. Waudby [et al.] // *Scientific reports*. 2016. Vol. 6, iss. 1. P. 24826.

# ДИНАМИКА ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ РИБОСОМ-ИНАКТИВИРУЮЩЕГО БЕЛКА ТРИХОБАКИНА ПО ДАННЫМ $^{15}\text{N}$ РЕЛАКСАЦИОННОЙ ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

**Е. В. Бритикова<sup>1</sup>, В. В. Бритиков<sup>1</sup>, Э. В. Бочаров<sup>2</sup>, С. А. Усанов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>ФГУБ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

Рибосом-инактивирующий белок 1-го типа трихобакин (ТВК) был клонирован из *Trichosanthes sp. Backan 8-98* и получен в рекомбинантной форме [1]. ТВК обладает потенциальной противоопухолевой активностью, способен эффективно ингибировать рост раковых клеточных линий человека и рост опухолевых тканей в моделях животных [2]. ТВК ингибирует процесс трансляции в бесклеточной системе на основе лизата ретикулоцитов кролика с феноменальной эффективностью ( $\text{IC}_{50}$  – 3.5 пМ). Таким образом, ТВК выступает в качестве перспективного кандидата для создания лекарственного препарата для таргетной противоопухолевой терапии. Для усовершенствования структуры ТВК методами белковой инженерии с целью увеличения таргетных противоопухолевых свойств, без значительного воздействия на результирующую ингибирующую активность, в первую очередь необходимо детально изучить структурно-динамические детерминанты, обуславливающие его функционирование на атомарном уровне. Важным параметром, связывающим структуру с функцией белковой молекулы, является внутренняя динамика полипептидной цепи.  $^{15}\text{N}$  релаксационный ЯМР анализ является мощным методом для изучения скоростей вращательной диффузии белка и внутренней динамики цепи на пико-наносекундном и микро-миллисекундном временном интервале [3].

В данной работе мы с использованием  $^{15}\text{N}$  релаксационной ЯМР спектроскопии определили основные параметры ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  ЯЭО) ядерной релаксации векторов NH связей основной полипептидной цепи ТВК. С использованием расширенного формализма Липари-Сабо был определен анизотропный тензор вращательной диффузии и рассчитаны параметры внутренней динамики NH векторов для 221 остатка цепи ТВК. Время глобальной вращательной корреляции ( $\tau_c$ ) для ТВК при температуре 30 °C и pH 6.8 составило 13.05 нс. Среднее значение параметра порядка ( $S^2$ ), который отражает амплитуду движений NH векторов на пс – нс временном интервале, составило 0.8, что характерно для высокоструктурированных белков. Значительное уменьшение  $S^2$  по сравнению со средним значением наблюдается в области C-конца ТВК. Полученные локальные значения  $S^2$ , соответствующие времена корреляции ( $\tau_{\text{loc}}$ ) или непосредственно исходные параметры  $^{15}\text{N}$  релаксации, представляют значительный интерес, так как необходимы для дальнейшей экспериментальной валидации результатов моделирования молекулярной динамики ТВК при использовании различных силовых полей.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (грант № X23РНФ-091) и РФФ (грант № 23-44-10021).

### Библиографические ссылки

1. Backbone and side-chain chemical shift assignments for the ribosome-inactivating protein trichobakin (TBK) / V. V. Britikov [et al.] // *Biomolecular NMR Assignments*. 2020. Vol. 14. P. 55–61.
2. *In vitro* and *in vivo* anti-tumor effect of Trichobakin fused with urokinase-type plasminogen activator ATF-TBK / D. D. Pham [et al.] // *Molecular Biology Reports*. 2024. Vol. 51, iss. 1. P. 130.
3. *Kovermann M., Rogne P., Wolf-Watz M.* Protein dynamics and function from solution state NMR spectroscopy // *Quarterly reviews of biophysics*. 2016. Vol. 49. P. e6.

# МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕПРЕССИЛЯТОРА С ЗАПАЗДЫВАНИЕМ В ЦЕПЯХ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

М. Д. Бузмаков, Д. А. Брацун

*Пермский национальный исследовательский политехнический университет,  
Пермь, Россия*

Репрессия является элементарной рабочей единицей синтетической биологии. Устройство было сконструировано на основе плазмид *lacI*, *λcI* и *tetR* [1]. Гены имеют естественное происхождение, но в такой комбинации в природе не встречаются. Промотор каждого гена подавляет экспрессию соседа, что приводит к возбуждению колебаний. Репрессия до сих пор привлекает внимание исследователей своим потенциалом усовершенствования. В частности, в последние годы появилась технология внедрения искусственного запаздывания в цепи обратной связи. Кроме того, естественное запаздывание всегда имеет место быть в процессах генной регуляции [2]. Это требует рассмотрения запаздывающего репрессия как отдельной функциональной единицы.

В данной работе предложена модель репрессия с запаздыванием: теоретически исследуется нелинейная динамика устройства как в рамках детерминистского, так и стохастического описания. Первый подход представлен в виде системы ОДУ с запаздыванием. Для стохастического описания использован алгоритм Гиллеспи, модифицированный на случай запаздывающих реакций [2]. Результаты, полученные в рамках второго подхода, значительно отличаются от детерминистской динамики системы даже при усреднении по числу реализаций. В подкритической области было обнаружено возбуждение квазирегулярных колебаний, вызываемых взаимодействием шума и запаздывания. Вблизи нейтральной кривой наблюдается процесс спонтанной деградации и возбуждения периодических колебаний, при фазе восстановленных колебаний изменяется случайным образом. Рассмотрены две основных конфигурации репрессия. В симметричном случае все свойства участвующих в регуляции генов одинаковы, поэтому из-за высокой конкуренции происходит длительная первоначальная настройка системы, которая динамически выражается в существовании медленного притягивающего многообразия. Учет флуктуаций в рамках стохастического описания приводит к сравнительно быстрому срыву траектории с многообразия и переходу динамической системы к поочередной экспрессии генов в рамках одного глобального предельного цикла [3]. В несимметричном случае, в котором скорости синтеза белка у генов различаются, приводит к ускорению перехода к кооперативному режиму. При этом учет шума все равно приводит к более быстрой настройке системы.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (грант № FSNM-2023-0003).

## Библиографические ссылки

1. Elowitz M. B., Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators // *Nature*. 2000. Vol. 403. P. 335–338.
2. Delay-induced stochastic oscillations in gene regulation / D. Bratsun [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. Vol. 102, iss. 41. P. 14593–14598.
3. Брацун Д. А., Бузмаков М. Д. Репрессия с запаздывающей экспрессией генов Часть II. Стохастическое описание // *Компьютерное исследование и моделирование*. 2021. Т. 13, № 3. С. 587–609.

## ВКЛАД УРОМОДУЛИНА В СТАБИЛИЗАЦИЮ КОЛЛОИДА МОЧИ В НОРМЕ И НА ФОНЕ ИНДУЦИРОВАННОГО КРИСТАЛЛОГЕНЕЗА В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Н. А. Верлов<sup>1</sup>, В. С. Бурдаков<sup>1</sup>, И. А. Кулаков<sup>1</sup>, Л. А. Иванова<sup>1</sup>, Ал. А. Богданов<sup>2</sup>,  
В. Л. Эмануэль<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ  
«Курчатовский институт», г. Гатчина, Россия

<sup>2</sup>ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализи-  
рованных видов медицинской помощи (онкологический) им. Н.П. Напалкова»,  
г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский универ-  
ситет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской  
Федерации, г. Санкт-Петербург, Россия

Актуальной задачей при исследовании процессов, приводящих к манифестации мочекаменной патологии, является изучение механизмов, призванных стабилизировать коллоид мочи в норме и при патологии. Важнейшим компонентом мочи, препятствующим кристаллогенезу или, если говорить точнее, образованию нерастворимого конкремента, который не может быть выведен из организма естественным путем, является система белков мочи, основной вклад в действие которой вносит белок уромодулин [1]. Нами ранее показано, что стабилизация коллоида происходит за счёт формирования гель-подобной структуры, образованной нитями полимеризованного уромодулина [2]. Масса полимера уромодулина может достигать 10 МДа, при массе мономера – 95 кДа. В физиологически адекватном для человека диапазоне концентраций белка уромодулина и ионной силы раствора проведено исследование диффузных свойств частиц размером от 10 нм до 3 мкм методом анализа треков наночастиц и конфокальной микроскопии. Показано, что наличие уромодулина в концентрации от 100 мкг/л и более приводит к существенному уменьшению коэффициента диффузии частиц размером 70 нм, при этом не оказывает влияния на коэффициент диффузии частиц размером 10–30 нм. Для частиц размером 3 мкм методом конфокальной микроскопии показано, что гель-подобная структура полимера уромодулина препятствует, вплоть до полной остановки, их осаждению в растворе. Полученные данные хорошо объясняют механизмы стабилизации коллоида мочи в условиях первичного кристаллогенеза и более поздних стадий развития мочекаменной патологии, такие как агрегация и рост кристаллов и роль основного белка мочи уромодулина в этих процессах.

### Библиографические ссылки

1. *Schaeffer C., Devuyst O., Rampoldi L.* Uromodulin: Roles in Health and Disease // *Annu Rev Physiol.* 2021. Vol. 83. P. 477–501.

2. *Верлов Н. А., Ланда С. Б., Эмануэль В. Л.* Олигомеры уромодулина в растворах различной ионной силы и рН // *Актуальные вопросы биологической физики и химии.* 2021. Т. 6, № 4. С. 607–611.

## УЯЗВИМОСТЬ ЦИТОХРОМА С: ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ДЕГРАДАЦИИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГИДРОПЕРЕКИСЕЙ

**В. В. Волков, Г. О. Степанов, А. Н. Осипов**

*ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова" Минздрава России, Москва, Россия*

Апоптоз и ферроптоз, две формы регулируемой клеточной смерти, являются неотъемлемой частью клеточного гомеостаза и патологии. В то время как апоптоз характеризуется контролируемым разрушением клеток [1, 2], ферроптоз включает железозависимое перекисное окисление липидов, приводящее к гибели клетки [2, 3]. Цитохром С, ключевой компонент митохондриальной электронно-транспортной цепи, в комплексе с кардиолипином уже давно ассоциируется с инициацией апоптоза путем его выхода в цитоплазму [2]. С другой стороны, перекись водорода, активная форма кислорода, участвует в окислительно-восстановительной сигнализации и окислительном стрессе, потенциально влияя как на апоптотический, так и на ферроптотический пути [4]. Наша работа направлена на раскрытие сложного взаимодействия между апоптозом и ферроптозом с акцентом на роли комплексов цитохрома С с анионными фосфолипидами и перекиси водорода, а также других гидроперекисей, в модуляции процессов клеточной гибели.

В данной работе выполнена спектрофотометрическая оценка разрушения комплексов цитохрома С с фосфолипидными липосомальными мембранами пероксидом водорода или гидроперекисью трет-бутила. Липосомы содержали тетраолеилкардиолипин (ТОСЛ) и диолеилфосфатидную кислоту (ДОРА), а также соевый лецитин. Данное взаимодействие оценивалось по падению интенсивности полосы Core (415–420 нм) при титровании белок-липидных комплексов возрастающими концентрациями пероксида водорода или гидроперекиси трет-бутила.

Оказалось, что самые значительные различия между полученными кривыми титрования наблюдались при соотношении пероксида водорода к цитохрому С равном 215 и гидроперекиси трет-бутила к цитохрому, равном 340.

Также интересно, что динамика изменения полосы Core цитохрома С в комплексе с ранее изученным ТОСЛ, сравнима с той, что наблюдалась для ДОРА. Цитохром С и фосфатидилхолин показали отличные от анионных фосфолипидов результаты.

Выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе этих процессов, позволит по-новому взглянуть на патогенез заболеваний и терапевтические стратегии, открывая возможности для целенаправленного вмешательства в заболевания, характеризующиеся нарушением регуляции клеточной смерти.

### Библиографические ссылки

1. *Elmore S.* Apoptosis: a review of programmed cell death // *Toxicologic pathology.* 2007. Vol. 35, iss. 4. P. 495–516.
2. Redox phospholipidomics of enzymatically generated oxygenated phospholipids as specific signals of programmed cell death / V. E. Kagan [et al.] // *Free Radic Biol Med.* 2020. Vol. 147. P. 231–241.
3. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death / S. J. Dixon [et al.] // *Cell.* 2012. Vol. 149, iss. 5. P.1060–1072.
4. *Checa J., Aran J.M.* Reactive Oxygen species: Drivers of physiological and pathological processes // *J Inflamm Res.* 2020. Vol. 13. P. 1057–1073.

## АНАЛИЗ КРИВЫХ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ПЛАВЛЕНИЯ АТФ-АПТАМЕРА В РАЗНЫХ pH ПРИ ПОМОЩИ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

П. В. Габрусёнок, П. А. Соколов

*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

Широко применяемым методом для изучения термодинамики нуклеиновых кислот является анализ их кривых плавления [1]. Простота организации эксперимента с использованием пары флюоресцентный краситель-тушитель в ПЦР-термоциклерах делает такую методику крайне популярной и доступной. Анализ получаемых кривых плавления подразумевает их корректную интерпретацию, особенно если требуется получить абсолютные значения температур плавления и/или энтальпии и энтропии переходов между состояниями меченой молекулы. Поиск базовых линий сигнала, вид которых зависит как от свойств самих систем, так и от используемого оборудования [2], является первостепенно важной задачей, без решения которой дальнейший анализ существенно ограничен. Как правило, характеристика базовых линий осуществляется за пределами области плавления [3], что в ряде случаев невозможно. В данной работе предлагается простой в реализации подход для интерпретации кривых плавления. Он основывается на накладывании ограничений на интерпретацию сигнала, основанных на термодинамической модели системы. Предлагаемый метод показал высокую воспроизводимость и независимость результатов (температур плавления проб) от юстировки прибора, т.е. выравнивания лазера, положения кюветы с образцом, паразитных отражений в ней и следов испарения образца на стенках и переменной чувствительности детектора от ячейки к ячейке.

Активное исследование аптамеров позволило применять их в качестве терапевтических и диагностических медицинских систем, а также в роли молекулярных сенсоров и датчиков окружающей среды [4]. Применение молекулярных переключателей с замещающей нитью к аптамеру [5] в биологических системах требует изучения термодинамики модифицированных аптамеров в различных pH, так как он варьируется в разных тканях, а также изменяется при определенных заболеваниях [6]. В данной работе мы изучили связывание классического АТФ-аптамера с АТФ и его гибридизацию с замещающими нитями при различных pH и ионных условиях вышеописанным методом анализа флуоресцентного плавления. Мы показали, что стабильность АТФ-аптамера различается в разных pH и растет с повышением концентрации АТФ. Сравнивая pH зависимости стабильности АТФ-аптамера и его дуплексов с комплементарными нитями разной длины, мы пришли к выводу, что молекулярные переключатели вида «аптамер-замещающая нить» могут иметь собственную pH-зависимость, которая ранее никогда не принималась во внимание и должна учитываться при рациональном дизайне подобных систем в будущем.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-25-00302.

### Библиографические ссылки

1. You Y., Tataurov A.V., Owczarzy R. Measuring thermodynamic details of DNA hybridization using fluorescence // *Biopolymers*. 2011. Vol. 95, iss. 7. P. 472–486.
2. Owczarzy R. Melting temperatures of nucleic acids: discrepancies in analysis // *Biophys Chem*. 2005. Vol. 117, iss. 3. P. 207–215.

3. *Palais R., Wittwer C. T.* Mathematical algorithms for high-resolution DNA melting analysis // *Methods Enzymol.* 2009. Vol. 454. P. 323–343.
4. *Dunn M. R., Jimenez R. M., Chaput J. C.* Analysis of aptamer discovery and technology // *Nat Rev Chem.* 2017. Vol. 1, iss. 10. P. 1–16.
5. *Feagin T. A., Maganzini N., Soh H. T.* Strategies for creating structure-switching aptamers // *ACS Sens.* 2018. Vol. 3, iss. 9. P. 1611–1615.
6. pH and its applications in targeted drug delivery / S. Abdella [et al.] // *Drug Discov Today.* 2023. Vol. 28, iss. 1. P. 103414.

## АНАЛИЗ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ МЕЖДУ АМФИФИЛЬНЫМИ ФОСФОРНЫМИ ДЕНДРОНАМИ И БЕЛКАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА АЛЬБУМИНОМ И ТРОМБИНОМ МЕТОДОМ НАТИВНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

**И. В. Галец-Буй<sup>1</sup>, М. М. Терехова<sup>1</sup>, Дж. Кью<sup>2</sup>, К. Ши<sup>2</sup>, Ж. П. Мажораль<sup>3</sup>,  
Д. Г. Щербин<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>*Государственная лаборатория модификации химических волокон и полимерных  
материалов, Университет г. Дунхуа, Шанхай, Китай*

<sup>3</sup>*Университет г. Тулузы, Тулуза, Франция*

Анализ формирования комплексов между амфифильными фосфорными дендронами и белками крови человека является важным в связи с потенциальной возможностью использования наночастиц в качестве систем доставки малых интерферирующих РНК при лечении онкологических и других заболеваний [1]. Внутривенная инъекция лекарства требует лучшего понимания его взаимодействия с жизненно важными компонентами крови. В нашей работе методом полиакриламидного гель-электрофореза в нативных условиях проведен анализ формирования комплексов между белками крови человека (альбумин, тромбин) и амфифильными фосфорными дендронами (jq098, jq108, jq111, jq169, jq170). Электрофорез комплексов проводили в вертикальной ячейке Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA) в неденатурирующих условиях согласно Ornstein-Davis. Локализацию белковых полос после их разделения визуализировали прокраской гелевой пластины в растворе, содержащем Coomassie Brilliant blue R 250.

Показано, что с возрастанием молярного соотношения [дендрон/белок] в интервале 0,013–0,067 и 0,007–0,037 для альбумина и тромбина, соответственно, интенсивность окрашенных полос в геле постепенно снижается по сравнению с контролем (белки в отсутствие дендронов). Количественный анализ показал снижение на 90% массы альбумина в треке в присутствии дендрона jq170 (при максимально используемой концентрации наночастицы). При взаимодействии белка с дендронами jq169, jq098, jq111 и jq108 количественный анализ показал снижение массы альбумина в треке на 30–40% по сравнению с контролем. Это означает, что наибольшее количество белка вовлекалось в комплексы при взаимодействии с дендроном jq170. В случае тромбина наибольшее количество белка ( $\approx 80\%$ ) вовлекалось в комплексы при взаимодействии с дендронами jq169 and jq170. При взаимодействии белка с дендронами jq098, jq111, and jq108 масса тромбина в треке снижалась на 30–50% по сравнению с контролем.

Таким образом, результаты проведенного исследования указывают на формирование комплексов между белками крови человека – альбумином и тромбином – при взаимодействии с амфифильными фосфорными дендронами jq098, jq108, jq111, jq169 и jq170. Представленные результаты согласуются с данными по комплексообразованию между указанными выше наночастицами и белками, полученными другими методами [2].

### **Библиографические ссылки**

1. Amphiphilic phosphorus dendrons associated with anti-inflammatory siRNA reduce symptoms in murine collagen-induced arthritis / Z. Yu [et al.] // *Biomacromolecules*. 2023. Vol. 24, iss. 2. P. 667–677.

2. Effect of amphiphilic phosphorous dendrons on the conformation, secondary structure, and zeta potential of albumin and thrombin / M. Terehova [et al.] // *Polymer Bulletin*. 2023. Vol. 80. P. 9181–9193.

# ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСГЕНОВ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ С ГЕНОМ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ *IN VITRO*

**Т. А. Гапеева<sup>1</sup>, Т. В. Семанюк<sup>2</sup>, Е. М. Кабачевская<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь  
<sup>2</sup>РУП «НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству», Минск, Беларусь

Явление потери экспрессии трансгенов (“gene silencing”) в клетках растений известно с начала 90-х годов и может происходить как на транскрипционном, так и посттранскрипционном уровне [1]. Полная потеря экспрессии трансгена более характерна для полового размножения трансгенных растений. При вегетативном росте и размножении может наблюдаться мозаичная потеря экспрессии трансгенов соматическими клетками с образованием химерных растений. Коллекции трансгенных линий рассматриваются в качестве моделей для изучения эпигенетической регуляции экспрессии генов. Ранее на основе растений белорусских сортов была создана коллекция трансгенных растений картофеля с геном антимикробного пептида цекропин-мелиттинового типа [2]. Целью данной работы было определить наличие существенной потери экспрессии трансгенов при длительном (более 10 лет) вегетативном размножении трансгенных линий *in vitro*.

Методом РВ-ПЦР с красителем SYBR Green было показано наличие трансгенных вставок и экспрессии целевого гена с температурой плавления ПЦР-продукта (Тпл.) в 76 °С и маркерного гена (Тпл. – 88,5 °С). В частности, в случае маркерного гена неомидинфосфотрансферазы кДНК-ПЦР-сигналы для растений дикого типа (WT) отсутствовали, в то время как для совокупности трансгенных линий значение  $C_q$  составляло  $28,86 \pm 2,07$ . Для ПЦР-продукта целевого гена *MsrA1* в случае трансгенных линий значение RFU после 30-35 циклов достигало величины 1200-1500 (выход на плато), в то время как величина RFU для WT-контролей в этой точке было менее 50. Значения  $C_q$  для совокупности трансгенных линий были следующими:  $22,71 \pm 0,70$  (ДНК-ПЦР) и  $24,66 \pm 2,65$  (кДНК-ПЦР). В случае WT-растений ПЦР-сигнал не достигал порогового значения к 45 циклу ПЦР, наличие ПЦР-продукта не определялось как для ДНК-, так и кДНК-матрицы. Пороговые значения флуоресценции ПЦР-продукта для гена-нормализатора – актина (Тпл. – 83,5 °С) были не меньше, чем для трансгенных линий.

Таким образом, при длительном размножении *in vitro* растения картофеля с геном антимикробного пептида *MsrA1* сохраняют как вставки, так и экспрессию трансгенов. Данные растения могут быть использованы в качестве моделей для изучения механизмов действия антимикробных пептидов в клетках растений. В этой связи было установлено, что для трансгенных растений в отличие от WT-растений наблюдается конститутивная активация экспрессии генов пероксидаз и синтеза пататин-подобного белка, что может играть роль в повышенной устойчивости данных растений к биотическим и абиотическим факторам.

## Библиографические ссылки

1. Маренкова Т. В., Дейнеко Е. В. Трансгенные растения как модель для изучения эпигенетической регуляции генов // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. Т. 19, № 5. С. 545–551.
2. Трансгенные растения картофеля белорусских сортов, экспрессирующие гены антимикробных пептидов цекропин-мелиттинового типа / Н. Л. Вутто [и др.] // Генетика. 2010. Т. 46, № 9. С. 1–9.

# ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА НА ДЕЗАКТИВАЦИЮ ТРИПЛЕТНЫХ СОСТОЯНИЙ МЕТАЛЛОПОРФИРИНОВ

А. Ю. Ильин, А. С. Старухин, Т. А. Павич

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

Соединения с порфириновыми макроциклами широко применяются в различных областях науки, техники и медицины. Указанные молекулярные системы широко используются для создания эффективных фотопреобразователей и элементов электронных устройств, а также применяются в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической и антимикробной терапии. При фотовозбуждении порфириновых хромофоров происходит переход молекул в возбужденные синглетные состояния и затем после быстрой релаксации молекулы переходят в основное состояние [1, 2].

В настоящей работе выполнены измерения времен жизни триплетных состояний для металлокомплексов 2,3,7,8,12,13,17,18-октаэтилпорфирина (М-ОЕР) и 5,10,15,20-тетрафенилпорфирина (М-ТРР), где М – Pt(II), Pd(II) в ряде органических растворителей.

Для перечисленных соединений выполнены эксперименты по измерениям времен жизни фосфоресценции металлокомплексов при использовании в качестве растворителей циклогексана (ЦГ), толуола (ТОЛ), дихлорметана (ДХМ) и диметилсульфоксида (ДМСО). Значения дипольных моментов для перечисленных растворителей и значения времен жизни фосфоресценции для образцов Pt-ОЕР приведены в таблице.

## Значения времен жизни фосфоресценции для Pt-ОЕР в различных органических растворителях

Растворитель	ЦГ	ТОЛ	ДХМ	ДМСО
Дипольный момент растворителя, D	0,12	0,37	1,8	3,96
$\tau_{\text{фосф.}}$ , нс.	280	380	780	945

Из данных таблицы видно, что возрастание времени жизни фосфоресценции металлопорфиринов хорошо коррелирует с ростом значений дипольных моментов используемого растворителя. Так, например, для Pt-ОЕР в ЦГ время жизни фосфоресценции составляет 280 нс, а в ДМСО повышается до 945 нс. Приведенные данные доказывают, что полярность используемого растворителя оказывает определяющее влияние на процессы дезактивации триплетных состояний для металлокомплексов порфиринов с ионами Pt(II) в присутствии молекулярного кислорода.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ Ф23МЭ-032 и частичной поддержке ГПНИ «Конвергенция 2025», задание 3.03.10 и ГПНИ «Фотоника и электроника для инноваций», задание 1.8.

### Библиографические ссылки

1. Porphyrin-based framework materials for energy conversion / J. Gu [et al.] // *Nano Research Energy*. 2022. Vol. 1., iss. 1. P. e9120009.
2. *Park J. M., Lee J. H., Jang W. D.* Applications of porphyrins in emerging energy conversion technologies // *Coordination Chemistry Reviews*. 2020. Vol. 407, iss. 4. P. 213157.
3. *Handbook of Photochemistry*. Ed. by Montalti M., Credi A., Prodi L., Gandolfi M. Materials Science, Boca Raton: SRC, Taylor & Francis Group, 2006. – P. 542–548.

# ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ И МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ СТВОЛОВОЙ ОБЛАСТИ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А

**Ф. О. Константинов, В. А. Урбан, В. Г. Вересов**

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

**Введение.** Сезонные или пандемические инфекции, вызванные вирусами гриппа А, представляют собой серьезную проблему для общественного здравоохранения из-за высокой заболеваемости и заметной смертности. Вакцины обладают лишь сезонной эффективностью, а к разрешенным невакцинным препаратам, действующим на различные механизмы, возникает резистентность, что обуславливает поиск новых кандидатов в лекарства. Исследования выявили мутационно-консервативную стволовую область гемагглютинаина – белка, определяющего слияние вирусной частицы с клеткой хозяина, что позволяет рассматривать эту область в качестве перспективной мишени для разработки универсальных вакцин и терапевтических средств [1].

**Цель работы** – идентификация методами виртуального скрининга и молекулярного моделирования низкомолекулярных ингибиторов стволовой области гемагглютинаина H1 вируса гриппа А.

**Методы исследования.** Виртуальный скрининг проводили с помощью программы Glide. Библиотека лигандов включала выборки из Enamine Druglike, Maybridge Hitfinder и др. и содержала 317852 соединения. Скрининг включал три этапа докинга: высокопроизводительный, стандартной точности и сверхвысокой точности с отбором 10% наилучших соединений на каждом этапе. Комплекс соединения JNJ4796 с гемагглютинином (PDB ID: 6CF7) [2] использовали как референсный. Соединения с наилучшими оценками энергии связывания повторно ранжировали по значению оценочной функции  $\Delta G$  нейросетью KDeer, а также оценивали параметры ADMET и синтетическую доступность по SAScore с помощью сервиса SwissADME [3]. Для соединения, соответствующего наибольшему количеству критериев, осуществляли МД-моделирование в программе GROMACS в интервале 200 нс.

**Результаты.** Идентифицировано соединение, которое обладает низким значением оценочной функции свободной энергии связывания, сопоставимым с таковым для референса (-9.59 для обнаруженной молекулы и -9.49 для референса). Лиганд имеет молекулярную массу  $M_r=380.83$ , потенциально не проходит через ГЭБ, соответствует правилам Липински, Гёзе, Вебера, Эгана, Мюгге; SAScore=2.81. Анализ RMSD при моделировании методом МД показал стабильность комплекса на интервале 200 нс. Вероятные побочные мишени: рецептор гистамина H3, рецептор фактора кортикотропин-рилизинга CRF-R1, киназа-3 бета гликогенсинтазы GSK-3 beta, рецептор 2 фактора роста сосудистого эндотелия VEGFR-2, рецепторная тирозинкиназа FLT3. Соединение является перспективным ингибитором стволовой области гемагглютинаина вируса гриппа А.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Биотехнологии-2» (задание 1.32).

### Библиографические ссылки

1. Quadrivalent influenza nanoparticle vaccines induce broad protection / S. Boyoglu-Barnum [et al.] // *Nature*. 2021. Vol. 592, iss. 7855. P. 623–628.
2. A small-molecule fusion inhibitor of influenza virus is orally active in mice / M. J. P. Van Dongen [et al.] // *Science*. 2019. Vol. 363, iss. 6431. P. eaar6221.
3. *Daina A., Michelin O., Zoete V.* SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules // *Sci Rep*. 2017. Vol. 7, iss. 1. P. 42717.

# АМИНОКИСЛОТНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДОМЕНА БЕТА-СЕКРЕТАЗЫ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

**Н. С. Костюченко, Т. А. Хрусталёва**

*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

**Введение.** В настоящее время наиболее перспективным подходом к терапии болезни Альцгеймера является поиск и воздействие на молекулярные мишени, вовлеченные в механизм развития заболевания. Бета-секретаза (BACE1) представляет собой одну из таких мишеней. BACE1 – аспарагиновая протеаза, осуществляющая, помимо своей основной функции, расщепление белка-предшественника бета-амилоидных пептидов по патологическому пути.

**Цель исследования:** получить данные об аминокислотном составе каталитического домена BACE1 для позвоночных животных с учётом его изменчивости.

**Методы исследования.** В базе данных Uniprot [1] отбирали аминокислотные последовательности каталитического домена BACE1 позвоночных животных, включающие информацию об активном центре фермента. Полученные данные выравнивали при помощи алгоритма ClustalW [2] для определения наиболее консервативных регионов последовательности.

**Результаты.** Из базы данных Uniprot были отобраны последовательности от 67 видов животных. После их выравнивания и анализа обнаружены 6 участков с высокой консервативностью аминокислотного состава: Leu14-Ala29, Val54-Gly68, Ser92-Asp117, Met202-Phe228, Ile287-Ala310 и Ser312-Arg334. В выделенных участках содержатся следующие аминокислотные остатки [3, 4], задействованные в формировании активного центра фермента: в первом участке содержатся Leu17, Asp19 и Ser22; во втором – Tyr58; в третьем – Phe96, Ile97, Trp102 и Ile105; в четвертом – Asp215 и Arg222; в пятом – Asp305; шестой участок не содержал таких остатков. Следует отметить, что Tyr185, ответственный за изменение конформации активного центра при сдвигах pH [3], расположен в области, содержащей малое количество конститутивных аминокислотных остатков. Для BACE1 человека встречается инсерция Asp304\_Asp305insGlu [5], чего не обнаружено ни в одной из изученных последовательностей позвоночных животных. При этом у некоторых видов животных (например, *Notechis scutatus* *Bos taurus*) описана замена Asp305Glu.

**Заключение.** Наиболее перспективными мишенями на бета-секретазе для воздействия с целью терапии болезни Альцгеймера являются аминокислотные остатки из участков Leu14-Ala29, Val54-Gly68, Ser92-Asp117 и Met202-Phe228. Участок Ile287-Ala310, как потенциальная мишень, требует дальнейшего изучения, поскольку не известно влияние инсерции глутаминовой кислоты между позициями 304 и 305 на вторичную и третичную структуру домена и каталитическую функцию фермента у человека.

## Библиографические ссылки

1. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 // Nucleic acids research. 2021. Vol. 49, iss. D1. P. D480–D489.
2. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-

specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic acids research*. 1994. Vol. 22, iss. 22. P. 4673–4680.

3. Crystal structure of an active form of BACE1, an enzyme responsible for amyloid  $\beta$  protein production / H. Shimizu [et al.] // *Molecular and cellular biology*. 2008. Vol. 28, iss. 11. P 3663–3671.

4. *Cole S. L., Vassar R.* The Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase enzyme, BACE1 // *Molecular neurodegeneration*. 2007. Vol. 2. P. 1–25.

5. dbSNP: the NCBI database of genetic variation / S. T. Sherry [et al.] // *Nucleic acids research*. 2001. Vol. 29, iss. 1. P. 308–311.

# МОРСКИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БАКТЕРИИ: МОНИТОРИНГ ТОКСИЧНОСТИ СЕЛЕНИТ-ИОНОВ И БИОСИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА

**Н. С. Кудряшева, Е. С. Сушко, А. В. Зеньков**

*Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия  
Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия*

Селен – жизненно важный микроэлемент; он включен в активные центры ферментов и защищает организм от окислительного стресса. Однако в высоких концентрациях селен токсичен. Самыми токсичными формами селена являются его оксоанионы – селенат и селенит. В природе действует полный биогеохимический цикл соединений селена, в котором ключевую роль играют бактерии. При превышении содержания селена в окружающей среде происходит переключение метаболизма бактерий на нейтрализацию оксоанионов селена. Часто восстановленный с помощью бактерий селен образует наночастицы. Способность формировать наночастицы при восстановлении оксоанионов селена перспективна для различных областей биотехнологии, в основном в медицине. Бактериально синтезированные наночастицы селена могут быть использованы в качестве микроэлемента (в составе пищевых добавок), для адресной доставки лекарственных веществ, а также адсорбции и удаления токсикантов в организмах.

Использование бактериальной биолюминесценции является новым направлением, увеличивающим эффективность экологических мероприятий в результате одновременного проведения токсикологического мониторинга природных и сточных вод, биотрансформации оксоанионов и биосинтеза наночастиц элементарного селена.

Для исследований выбраны люминесцентные бактерии *Photobacterium phoshporeum*, широко используемые в практике экологического биотестирования, благодаря удобству и высокой скорости регистрации физиологической функции – интенсивности свечения. Исследовано влияние селенита натрия  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  на интенсивность биолюминесценции бактерии, получены зависимости от времени и от концентрации  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Выявлены фазы активации и ингибирования биолюминесценции, продемонстрировано, что зависимости соответствуют модели гормезиса. Токсический эффект  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  охарактеризовали эффективной концентрацией  $\text{EC}_{50}=10^{-3}$  М. Для исследования механизмов воздействия  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  изучали его влияние на содержание активных форм кислорода (АФК) в бактериальной суспензии и на бактериальные ферментативные реакции. Выявлены высокие положительные корреляции между интенсивностью биолюминесценции и содержанием АФК, что указывает на определяющую роль АФК и сопутствующих редокс-процессов в биоэффектах селенит-ионов. Продemonстрировано участие ферментативных реакций в биоэффектах  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .

С помощью методов сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии выявлено наличие наноразмерных структур в бактериях, инкубированных в растворах  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Энерго-дисперсионный спектр элементарного состава наночастиц и их окружения выявил высокое содержание элементарного селена. Распределение частиц по размерам соответствует ненормальному распределению и зависит от концентрации исходного селенита натрия. Средний размер наночастиц соответствует 50–60 нм. Таким образом, показана возможность использования морских люминесцентных бактерий в перспективном биотехнологическом процессе – биосинтезе наночастиц селена.

## МУТАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ КЕТОАЦИЛ[АСР]СИНТАЗ В ИЗУЧЕНИИ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ *IN SILICO*

Ф. Ф. Лахвич, О. Н. Ринейская

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

Ривароксабан широко используется в протоколах лечения пациентов с патологией сердечно-сосудистой системы. Туберкулёз является фактором риска развития осложнений, связанных с венозной тромбоэмболией и в настоящее время обсуждается применение прямых ингибиторов фактора Ха для профилактики вышеуказанных осложнений [1]. Проведенные нами ранее опыты *in vitro* показали, что раствор фармацевтической субстанции Ривароксабана в ДМСО ингибировал развитие клеток культуры *Micobacterium Terrae* [2]. Целью данной работы является поиск эффективных моделей для скрининговых исследований *in silico* аффинности лекарственных средств (ЛС) и кандидатов к биологическим мишеням, ответственным за развитие микобактерий.

Ферменты синтаз жирных кислот, которые участвуют в биосинтезе компонентов клеточной стенки *Mycobacterium* и при этом отсутствуют в организме человека, являются потенциальными мишенями в процессе рационального драг-дизайна новых ЛС и изучения дополнительной активности препаратов. Нами изучена *in silico* аффинность Ривароксабана к  $\beta$ -кетоацил[АСР]синтазам I и III. Первоначально в качестве моделей протеина были взяты нативные варианты синтаз 2WGD (цепь A) и 1HZP (цепь A) для кетоацил[АСР]синтазы I и кетоацил[АСР]синтазы III соответственно. Однако полученные невысокие значения аффинности не смогли подтвердить роль фермента в ингибировании роста микобактерий. Известно, что в переносе лиганда принимает участие открытая конформация, которая образуется в результате введения ацильного фрагмента в остаток цистеина. Поэтому мы предложили использовать в эксперименте мутантные варианты ферментов, в которых произведены замены цистеина на остатки глутамина для кетоацил[АСР]синтазы I и аланина кетоацил[АСР]синтазы III; последние моделируют топологию открытой конформации. Высокая аффинность лиганда к ферменту в открытой конформации позволяет прогнозировать высокую противотуберкулезную активность при скрининге большего числа кандидатов лекарственных средств. Это отвечает конечной цели нашего исследования – поиску ингибиторов  $\beta$ -кетоацилсинтаз. Установлено, что молекула Ривароксабана имеет высокую аффинность к мутантным вариантам протеинов (-10,46 и -10,19 ккал/моль), при этом лиганд находится в пределах кармана, ответственного за транспорт предшественников жирных кислот. Однако его суперпозиция не обеспечивает связывание с аминокислотными остатками каталитической триады, что соответствует опытам *in vitro*, где Ривароксабан тормозил развитие микобактерий.

Результаты исследования подтверждают возможность реализации механизма антибактериального действия Ривароксабана через ингибирование синтеза миколовых кислот на различных этапах их биосинтеза. При проведении скрининговых исследований для поиска веществ, ингибирующих данные стадии биосинтеза, целесообразно использовать мутантные варианты кетоацилсинтаз Cys171Gln (для KAS I) Cys112Ala (для KAS III), которые моделируют открытую конформацию ферментов.

### Библиографические ссылки

1. Is anticoagulation with novel oral anticoagulants an effective treatment for tuberculosis patients not achieving a therapeutic range with vitamin K antagonists? / M. Fiore [et al.] // *Cardiovasc. Hematol. Disord. – drug targets*. 2017. Vol. 17. P. 105–110.
2. Противотуберкулезная активность Ривароксабана *in silico* и *in vitro* / Ф. Ф. Лахвич [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. 2023. Т. 67, № 3. С. 207–213.

## ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИТОХРОМА *c* С КАРДИОЛИПИНОМ И ФОСФАТИДНОЙ КИСЛОТОЙ

**А. Ю. Макаров, Г. О. Степанов, А. Н. Осипов**

*ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия*

Апоптоз играет ключевую роль в патогенезе множества заболеваний [1]. Одним из инициаторов апоптоза по митохондриальному пути является цитохром *c*, который способен образовывать комплексы с мембранными анионными фосфолипидами за счёт ряда взаимодействий, включая электростатические и гидрофобные силы [2]. При этом взаимодействии увеличивается пероксидазная активность цитохрома *c*, что приводит к образованию пор в мембране и выходу белка из митохондрий, необходимому для запуска апоптоза [3]. Нашей целью было изучение молекулярных механизмов действия цитохрома *c* в комплексах с анионными фосфолипидами, и первым шагом для этого стало изучение образования комплексов цитохрома *c* с тетраолеилкардиолипином (TOCL) и диолеилфосфатидной кислотой (DOPA).

Для этого использовались 2,5 мМ липосомальные мембраны на основе диолеилфосфатидилхолина (DOPC) с добавкой TOCL или DOPA, а также флуоресцентной метки NBD-PC: 89,9% DOPC; 10% TOCL или DOPA или DOPC; 0,1% NBD-PC. К ним добавлялся цитохром *c* в различных концентрациях от 0 до 25 мкМ. Выраженность белок-липидных взаимодействий оценивались по тушению флуоресценции NBD-PC. Для снижения электростатической составляющей белок-липидных взаимодействий увеличивали концентрацию фосфатного буфера (PB) с 10 мМ до 100 мМ.

Полученные кривые снижения интенсивности флуоресценции аппроксимировались по модели Ленгмюра, и по ним рассчитывались равновесные константы диссоциации ( $K_d$ ). Так для ионной силы, соответствующей концентрации PB 10 мМ и PB 100 мМ, значения  $K_d$  составили: для TOCL –  $9,37 \pm 0,18$  и  $18,39 \pm 2,45$  мкМ, для DOPA –  $14,77 \pm 3,24$  и  $36,88 \pm 3,7$  мкМ, для DOPC –  $113,72 \pm 32,95$  и  $52,19 \pm 10,49$  мкМ. Статистическая значимость ( $p < 0,05$ ) показана при сравнении  $K_d$  цитохрома *c* с TOCL, DOPA и DOPC при разных концентрациях PB, между образцами, содержащими TOCL, DOPA и DOPC в PB 10 мМ, а также между образцами содержащими TOCL и DOPA в PB 100 мМ.

Полученные результаты говорят о существенном вкладе электростатических сил в образовании данных комплексов. Показано, что увеличение концентрации PB приводит к увеличению  $K_d$  комплексов цитохрома *c* с кардиолипином или фосфатидной кислотой. Кроме того,  $K_d$  комплексов с TOCL оказалась больше, чем для комплексов с DOPA, что объясняется меньшим отрицательным зарядом последней. С другой стороны, увеличение концентрации PB в образцах с незаряженным DOPC приводит к уменьшению константы диссоциации. Полученные сведения полезны для лучшего понимания процессов регуляции образования проапоптотических комплексов цитохрома *c* с фосфолипидами и их действия на ряд субстратов, таких как пероксид водорода и липидные гидроперекиси.

### **Библиографические ссылки**

1. Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease / A. R. Bogdan [et al.] // *Trends in Biochemical Sciences*. 2016. Vol. 41, iss. 3. P. 274–286.
2. Regulation of cytochrome C peroxidase activity by nitric oxide and laser irradiation / A. N. Osipov [et al.] // *Biochemistry (Mosc)*. 2006. Vol. 71, iss. 10. P. 1128–1132.
3. Cytochrome c produces pores in cardiolipin-containing planar bilayer lipid membranes in the presence of hydrogen peroxide / M. N. Puchkov [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2013. Vol. 1828, iss. 2. P. 208–212.

# ВЛИЯНИЕ НИТРОПРОИЗВОДНЫХ ИМИДАЗОЛА И 1,2,4-ТРИАЗОЛА НА ОБРАЗОВАНИЕ ПРОДУКТОВ РАДИАЦИОННО-ХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ЭТАНОЛА В ДЕАЭРИРОВАННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

А. Я. Малиборский<sup>1</sup>, С. Д. Бринкевич<sup>1</sup>, Р. Л. Свердлов<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химических проблем, Минск, Беларусь

Нитропроизводные имидазола и 1,2,4-триазола являются перспективными веществами для поиска новых химиотерапевтических средств [1]. Их биологическое действие может быть обусловлено реакциями с органическими и неорганическими радикалами, образование которых происходит при возникновении и течении ряда заболеваний [2]. В настоящей работе методом стационарного радиолиза исследуется реакционная способность ряда известных и синтезированных новых нитропроизводных 1,2,4-триазола и имидазола по отношению к углеродцентрированным радикалам – аналогам структурных участков биомолекул – образующимся при действии ионизирующего излучения на водные растворы этанола.

Для приготовления растворов этанола с концентрацией 1 моль/л спирт растворяли в 50 мМ фосфатном буфере (рН=7,0±0,1). Концентрация нитропроизводных имидазола и 1,2,4-триазола составляла  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л. Полученные растворы разливали по 1,0 мл в предварительно продутые аргоном стеклянные ампулы и проводили деаэрирование барботированием аргоном в течение 60 мин, после чего ампулы запаивали. Для инициирования радиационно-индуцированных процессов в изучаемых системах использовали  $\gamma$ -излучение изотопа <sup>60</sup>Со. Интервал поглощенных доз составлял 80–1200 Гр.

Установлено, что 1,2,4-триазол практически не влияет на соотношение радиационно-химических выходов продуктов радиолиза деаэрированного этанола, в то время как в присутствии имидазола незначительно увеличивается радиационно-химический выход ацетальдегида. Нитропроизводные этих азотсодержащих гетероциклов количественно окисляют  $\alpha$ -гидроксиэтильные радикалы, что проявляется в увеличении выхода ацетальдегида более чем в 10 раз по сравнению с контролем, при этом образование бутандиола-2,3 не наблюдается. Введение второй нитрогруппы в 1,2,4-триазольный цикл не приводит к изменениям характера взаимодействия тестируемых нитропроизводных с  $\alpha$ -гидроксиэтильными радикалами.

Результаты исследования позволяют предполагать проявления нитроазолами окислительных свойств в отношении органических углеродцентрированных радикалов в живых организмах. Наличие корреляции между радикалрегуляторными свойствами исследуемых веществ и возможной биологической активностью требует дальнейших исследований.

## Библиографические ссылки

1. Cancer radiosensitizers / H. Wang [et al.] // Trends in pharmacological sciences. 2018. Vol. 39, iss. 1. P. 24–48.
2. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford university press, 2015. – 905 p.

## МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ЦИННАМАТОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙТРОФИЛОВ

Е. А. Мельникова<sup>1</sup>, К. А. Лукьянова<sup>1</sup>, О. В. Орешко<sup>1</sup>, Н. В. Амазгбери<sup>1</sup>,  
Г. Н. Семенкова<sup>2</sup>

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

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

Активные формы кислорода и хлора (АФКХ) образуются в клетках, как побочные продукты многих метаболических реакций и играют важную роль в процессах внутри- и межклеточной сигнализации. Гиперпродукция этих интермедиатов приводит к оксидативному стрессу и развитию различных патологий (сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, онкологических и др.). Для профилактики и лечения заболеваний, сопряженных с оксидативным стрессом, актуальным является использование веществ, обладающих антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Такими соединениями являются циннаматы (коричная, кофейная, феруловая, синаповая кислоты), проявляющие широкий спектр биологической активности *in vitro* и *in vivo* [1]. Несмотря на хорошо исследованные антиоксидантные свойства этих соединений, их роль в формировании оксидативного стресса не изучена. Поскольку нейтрофилы являются одним из наиболее значимых источников АФКХ в организме, целесообразно исследовать влияние циннаматов на функции этих клеток.

Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной крови в градиенте плотности гистопак-1077 по стандартной методике. Генерацию нейтрофилами АФКХ исследовали методом люминолзависимой хемилюминесценции на биохимилюминометре БХЛ-1 (Беларусь). Пероксидазную активность МПО определяли по скорости окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензида пероксидом водорода. Секреторную дегрануляцию определяли по выходу лизоцима из клеток. Активность лизоцима оценивали по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus* спектрофотометрически ( $\lambda=450$  нм). Величину митохондриального мембранного потенциала определяли с помощью флуоресцентного красителя JC-1 ( $\lambda_{\text{возб}}=490$  нм,  $\lambda_{\text{рег}}=530$  нм, 590 нм). Концентрацию несвязанных ионов кальция изучали с помощью флуоресцентного зонда Fura 2-AM ( $\lambda_{\text{возб}}=340, 380$  нм,  $\lambda_{\text{рег}}=510$  нм). Измерения проводили на спектрофлуориметре СМ 2203 «Солар» (Беларусь).

Методом люминолзависимой хемилюминесценции показано, что коричная, феруловая и синаповая кислоты дозозависимо оказывают анти- или прооксидантное действие на стимулированные нейтрофилы, путём модификации многочисленных процессов внутриклеточной сигнализации, вовлечённых в формирование «респираторного взрыва» в этих клетках. Исследуемые соединения не оказывают влияния на процесс секреторной дегрануляции нейтрофилов. Установлено, что снижение продукции АФКХ клетками при действии кофейной, феруловой и синаповой кислот связано с их способностью ингибировать миелопероксидазу. Воздействие коричной, кофейной и феруловой кислот приводит к увеличению концентрации несвязанных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме нейтрофилов. В зависимости от концентрации,

исследуемые циннаматы способны снижать величину митохондриального мембранного потенциала нейтрофилов.

Таким образом, исследуемые циннаматы модифицируют функциональную активность нейтрофилов и являются регуляторами свободнорадикальных процессов в этих клетках.

### **Библиографические ссылки**

1. *Ruwizhi N., Atim A. B. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21. P. 1–34.*

## ОЦЕНКА РЕДОКС-АКТИВНОСТИ 2-ОКСО-3-(ЭТИЛОКСАЛИЛ)-1,4-ОКСАТИАНА НА ПРИМЕРЕ НЕФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ NADH В ПРИСУТСТВИИ 1,4-БЕНЗОХИНОНА

**Я. В. Панада, Н. С. Фролова, Я. В. Фалетров**

*Научно-исследовательский институт физико-химических проблем, Минск, Беларусь*

Нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза приводит к повреждениям компонентов клетки, в том числе окислению липидов и белков и фрагментации ДНК. Некоторые из продуктов модификации нестабильны и подвергаются быстрому устранению за счет физиологической репарации либо деградации. В то же время, некоторые поврежденные белки могут стабилизироваться за счет перестраивания структуры, что может приводить к аномальному свертыванию, самоагрегации и накоплению неактивных белков. В частности, данный процесс вносит вклад в патогенез аутоиммунных, опухолевых, нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний. К потенциально токсичным оксидантам относятся хиноны, способные вступать в круговой редокс-процесс, состоящий из NADH-зависимого восстановления до семихинона и регенерации хинона после передачи электрона на O<sub>2</sub> [1, 2]. Токсичность хинонов может быть нейтрализована серосодержащими тиолами и дисульфидами, способными ковалентно связываться с хинонами и захватывать активные формы кислорода с образованием сульфоксидов, соответственно [2].

Целью данной работы было исследование влияния 2-оксо-3-(этилоксалил)-1,4-оксатиана на химическое и фотохимическое окисление NADH 1,4-бензохиноном.

2-оксо-3-(этилоксалил)-1,4-оксатиан (**1**) был получен путем последовательного бромирования диэтилоксалоацетата и конденсацией продукта с 2-меркаптоэтанолом. Реакцию проводили путем добавления **1** (10–40 мкМ) и/или 1,4-бензохинона (от 40 до 60 мкМ) к раствору NADH (150 мкМ) в буферной смеси Tris-HCl (pH=7,4). В качестве редокс-индикатора использовали дифениламин (30 мкМ). Смесь инкубировали при 37 °С на протяжении 2,5 ч. Степень реакции оценивали по убыванию оптической плотности при 340 нм на приборе Solar PB2201. Для оценки влияния **1** на фотоокисление NADH образцы облучали ультрафиолетовой лампой среднего давления (365 нм, 22 Вт) на протяжении 2 ч.

Было обнаружено, что **1** не вызывал значимого замедления либо ускорения окисления NADH (27±4% в присутствии 40 мкМ **1** против 30±2% в контрольном образце) либо окисления дифениламина как в темноте, так и при облучении. Предположительно, низкая антиоксидантная активность **1** связана с его устойчивостью к окислению за счет стабилизированного промежуточного тиильного катион-радикала, прилегающего к C=O связи. Близость атома серы и карбонильной группы позволяет делокализовать заряд и снизить активность S-центрированного катион-радикала по отношению к O<sub>2</sub> [3].

Данная работа была выполнена в рамках задания ГПНИ 2.2.04.01 (программа "Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия", подпрограмма "Биорегуляторы", № гос. регистрации 20210560).

### Библиографические ссылки

1. *Scherbak N., Strid Å., Eriksson L. A.* Non-enzymatic oxidation of NADH by quinones // *Chemical Physics Letters*. 2005. Vol. 14. P. 243–247.
2. *Rajendran M.* Quinones as photosensitizer for photodynamic therapy: ROS generation, mechanism and detection methods // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2016. Vol. 13. P. 175–187.
3. Photochemical aerobic oxidation of sulfides to sulfoxides: the crucial role of wavelength irradiation / E. Skolla [et al.] // *Green Chemistry*. 2022. Vol. 24, iss. 10. P. 4108–4118.

## ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА Zn-ПРОТОПОРФИРИНОМ, ВСТРОЕННЫМ В БЕЛКОВУЮ МАТРИЦУ ГЕМОГЛОБИНА

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

<sup>1</sup>*Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

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

В настоящее время разработка систем доставки лекарственных препаратов в опухолевые клетки является одной из актуальных задач, с решением которой связывают дальнейший прогресс в лечении онкологических заболеваний. Использование в качестве систем доставки наночастиц и других наноразмерных носителей позволяет преодолевать основные недостатки противоопухолевых лекарственных препаратов, связанные с их недостаточной селективностью накопления в опухолевых клетках и низкой водорастворимостью. Несмотря на большое число работ по разработке и синтезу наночастиц для биомедицины, лишь небольшое их количество нашло применение в клинической практике. Это связано, прежде всего, с тем, что при попадании наночастиц в кровь на их поверхности образуется так называемая “белковая корона”, которая модифицирует их поверхность и приводит к изменению фармакокинетики, биораспределения, устойчивости и других параметров разрабатываемых наноносителей. Кроме того, иммунная система обладает мощными механизмами, которые распознают наночастицы как чужеродные и быстро выводят их из кровотока. В качестве систем лишенных этих недостатков рассматриваются носители на основе белковых молекул. Среди белковых носителей можно выделить группу гембелков, таких как гемоглобин и миоглобин, которые рассматриваются не только в качестве пассивной системы доставки лекарственных препаратов в опухолевые клетки, но также в качестве переносчиков молекулярного кислорода, позволяющих увеличить его концентрацию в гипоксических областях опухоли. Этот фактор является наиболее существенным при лечении опухолей методом фотодинамической терапии, основанной на использовании фотосенсибилизатора (ФС), который под воздействием света запускает цепь фотохимических реакций, приводящих к образованию активных форм кислорода (в том числе синглетного кислорода), разрушающих опухолевые клетки.

В данной работе в качестве системы доставки использовался апогемоглобин, в белковую матрицу которого был встроен Zn-протопорфирин IX (ZnPP), являющийся эффективным ФС. Для получения Zn-замещенного гемоглобина (ZnHb) был использован модифицированный кислотнo-бутанонный метод. В работе представлены результаты исследования фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода Zn-замещенным Hb. Люминесценция синглетного кислорода регистрировалась на созданном в Институте физики НАН Беларуси высокочувствительном лазерном флуорометре для ближнего ИК-диапазона. Исследования проводились в 1 мМ Tris-HCl буфере, pH 7.2. Показано, что ZnPP, в составе Zn-замещенного гемоглобина, не теряет способности генерировать синглетный кислород, однако кинетика люминесценции синглетного кислорода приобретает более сложный вид, характерный для неоднородной среды. Время жизни триплетного состояния ФС в составе гемоглобина увеличивается более чем в 10 раз, что свидетельствует о внедрении ZnPP внутрь белковой матрицы. Установлено, что фотостабильность ZnHb уменьшается при изменении температуры раствора с 15 °С до 35 °С. Наблюдаемая при этом фотодеструкция ZnPP не приводит к выходу порфирина из гемового кармана гемоглобина. Обнаружено, что выход ZnPP из белковой матрицы происходит при понижении pH раствора менее 2.0, что приводит к существенному падению интенсивности люминесценции синглетного кислорода, обусловленному агрегацией порфирина в водном окружении.

# **$\pi$ – ПОВОРОТЫ ГАЙКИ ДЖАНИБЕКОВА ОБЕСПЕЧИВАЮТ ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ПЕРЕНОС СПИНОВОГО ИЗОМЕРА ОРТО-Н<sub>2</sub>O ЧЕРЕЗ АКВАПОРИНОВЫЕ КАНАЛЫ**

**С. М. Першин<sup>1</sup>, В. А. Орлович<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт общей физики им. А.М. Прохорова, РАН, Москва, Россия*

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

Наиболее критическим местом транспорта воды в организме являются мембраны с аквапориновыми каналами [1, 2], которые пропускают только мономеры Н<sub>2</sub>O со скоростью  $3 \cdot 10^9$  молекул/с. Открытие аквапориновых каналов (Peter Agre) отмечено нобелевской премией 2003 г. [1]. Заметим, что аквапориновый канал имеет дипольный ключ в середине при диаметре  $\sim 0.3$  нм. Физически ясно, что этот ключ будет тормозить не вращающиеся мономеры Н<sub>2</sub>O. Поскольку каналы мембраны почек человека может пропустить до 200 литров воды за сутки [1], следует полагать, что мономеры Н<sub>2</sub>O должны всегда вращаться. Причём диполь Н<sub>2</sub>O, направленный по биссектрисе угла между протонами, должен вращаться вокруг оси, которая лежит в плоскости протонов. Есть ли механизм такого предпочтения? Такой механизм есть и известен как «гайка Джанибекова» (см. интернет). Если смотреть на гайку Джанибекова и мономер Н<sub>2</sub>O, то каждый может увидеть подобие двух несимметричных волчков с тремя подобными инерционными осями вращения. Поскольку предпочтительное вращение этот волчок будет совершать вокруг оси по биссектрисе (минимальный момент инерции и энергии вращения), как гайка Джанибекова в его опыте, то мономер Н<sub>2</sub>O должен также совершать  $\pi$ -повороты вместе с вектором диполя и проходить дипольный ключ аквапоринового канала быстрее, чем Н<sub>2</sub>O без вращения. Отметим здесь, спиновый изомер орто-Н<sub>2</sub>O с магнитным моментом не имеет нулевого вращательного уровня в соответствии с законами квантовой механики, т.е. этот мономер всегда вращается. Скорее всего, именно поэтому, обогащение дистиллированной воды орто-Н<sub>2</sub>O изомерами всего на 10–15% обеспечивает растворимость почечных камней (оксалаты кальция) [3]. Более того, употребление такой водыкратно повышает скорость выведения мочевины из клеток и очищение всего организма (пример опыта будет показан в докладе). Несомненно, здесь стабилизирующим фактором является магнитный момент орто-Н<sub>2</sub>O, поскольку он ориентирован по магнитному полю Земли и, поэтому, трансмембранный перенос орто-Н<sub>2</sub>O и свойства воды зависят от наличия или экранировки магнитного поля.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №23-42-10019 и №Ф23РФ-40 Белорусского Республиканского Фонда Фундаментальных Исследований.

## **Библиографические ссылки**

1. Agre P. Нобелевская лекция. 2003. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2003/agre/lecture/> (дата обращения: 30.05.2024).
2. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1 / K. Murata [et al.] // Nature. 2000. Vol. 407, iss. 6804. P. 599–605.
3. Atomic force microscopy of growth and dissolution of calcium oxalate monohydrate (COM) crystals / N. V. Gvozdev [et. al.] // Journal of Crystal Growth. 2004. Vol. 261, iss. 4. P. 539–548.

## ФОСФОРЕСЦЕНЦИЯ ИНДИЕВОГО КОМПЛЕКСА ЭТИОПОРФИРИНА-I ПРИ НИЗКОЙ И КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРАХ

П. П. Першукевич<sup>1</sup>, С. М. Арабей<sup>2</sup>, Е. Д. Рычихина<sup>3</sup>, П. А. Стужин<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup>Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново,  
Россия

Порфирины и фталоцианины в триплетном состоянии очень эффективно реагируют с кислородом в растворах и полимерах при атмосферном давлении, что проявляется по сокращению времени жизни  $T_1$ -состояния и уменьшению квантового выхода фосфоресценции. Тушение и изменение длительности фосфоресценции красителей под действием кислорода уже используется для количественного определения содержания  $O_2$  в различных средах, применяется для диагностики и клинической оценки различных заболеваний [1, 2]. В качестве фосфоресцирующих зондов чаще всего выбираются комплексы планарных бензо- или нафтозамещенных порфиринов с Pd и Pt, которые при 298 К в системах *in vitro* с малым содержанием  $O_2$  (или в средах, содержащих анионные ПАВ для удаления кислорода) обладают надежно регистрируемым сигналом фосфоресценции. В системах *in vivo*, для которых трудно обеспечить деоксигенирование, фосфоресценция большинства красителей при комнатной температуре полностью потушена. Поэтому актуальным является поиск фосфоресцирующих при атмосферном давлении и 298 К молекулярных зондов, способных обеспечить измерения содержания молекулярного кислорода в биологических системах по методикам [1, 2].

В работе [3] обнаружена и исследована фосфоресценция комплекса этиопорфирина-I с индием (In-EtioP-I) в чистых и смешанных толуольных растворах. Установлено, что интегральная интенсивность фосфоресценции In-EtioP-I в смеси толуола с диэтиловым эфиром при 77 К, превышает интегральную интенсивность флуоресценции в 26,1 раза, что является максимальным значением для комплексов данного типа. При 298 К наблюдается высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода (до ~60%), указывая на эффективный процесс заселения  $T_1$ -состояния In-EtioP-I и последующий перенос энергии на кислород, с полным тушением фосфоресценции. При внедрении In-EtioP-I в полимерную пленку поливинилбутираля, где скорость диффузии кислорода в объеме полимера более замедленная, чем в растворах, а структура используемого полимера близка к структуре линейных полимеров молекул белков, при 298 К обнаружена слабая фосфоресценция индиевого комплекса этиопорфирина-I с максимумом при ~710 нм (возбуждение в полосе Soret). Спектральные данные при комнатной температуре демонстрируют принципиальную возможность использования In-EtioP-I для непосредственного определения содержания кислорода в биотканях, основанную на способности  $O_2$  тушить фосфоресценцию экзогенных зондов [1, 2, 4].

### Библиографические ссылки

1. *Wilson D. F., Vinogradov S. A.* Tissue oxygen measurements using phosphorescence quenching. Handbook of Biomedical Fluorescence. Ed. by Mycek M.-A., Pogue B.W. Biochemistry, Boca Raton: SRC, Taylor & Francis Group, 2003. – P. 637–662.
2. *Apreleva S. V., Wilson D. F., Vinogradov S. A.* Tomographic imaging of oxygen by phosphorescence lifetime // *Applied Optics*. 2006. Vol. 45, iss. 33. P. 8547–8559.
3. Luminescence of In(III)Cl-etioporphyrin-I / A. I. Koptyaev [et al.] // *Int. J. Molec. Sciences*. 2023. Vol. 24, iss. 20. P. 15168.
4. *Dunphy I., Vinogradov S. A., Wilson D. F.* Oxyphor R2 and G2: phosphors for measuring oxygen by oxygen-dependent quenching of phosphorescence // *Analytical Biochemistry*. 2002. Vol. 310, iss. 2. P. 191–198.

# ДНК ДИАГНОСТИКА И ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИИ СВЯЗАННОЙ С ДЕГЕНЕРАТИВНОЙ МИЕЛОПАТИЕЙ У СОБАК НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

А. В. Песняк, Ю. З. Максимчик

*Отраслевая научно-исследовательская лаборатория «ДНК технологий»  
УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, Беларусь*

Дегенеративная миелопатия (ДМ) собак является тяжелым нейродегенеративным заболеванием при котором клинические проявления болезни значительно варьируют и, как следствие, приводят к летальному исходу [1].

Современные методы клинической диагностики, включая компьютерную томографию и миелографию, как правило, не позволяют поставить точный диагноз при развитии ДМ собак, что обусловлено схожестью клинических проявлений большинства заболеваний спинного мозга. Разработка метода ДНК-тестирования ДМ, основанного на распознавании точечной мутации в рамках гена *SOD1*, позволяет поставить окончательный диагноз болезни, который ранее был возможен лишь после гистологического исследовании образцов тканей животных при аутопсии [2].

В рамках данной работы проводилась ДНК диагностика ДМ, и оценена частота встречаемости мутантного аллеля гена *SOD1*, связанного с развитием ДМ, у различных пород собак Республики Беларусь (196 пород).

Для генотипирования ДМ использовали метод конкурентной аллель-специфичной цепной полимеразной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с зондами TaqMan [3]. Амплификацию фрагмента ДНК, заключающего в себе мутацию, проводили с помощью следующей пары праймеров:

5'-GTGGGCCTGTTGTGGTATCA-3'

5'-CAAACSTGATGGACGTGGAATCC-3'

Для дифференциации аллелей использовали аллель-специфические праймеры с прикрепленными к ним флюоресцентным репортером и тушителем флюоресценции:

5'-[FAM]-CGCCTTCAGTCAGC-[BHQ]-3' (аллель G, дикий тип)

5'-[HEX]-CTCGCCTTTAGTCAGC-[BHQ]-3' (аллель A, мутантный тип)

Анализ кинетических кривых полученных с использованием флюоресцентных красителей позволил выявить следующие генотипы: GG – здоровое животное, AG – носитель заболевания, AA – животное с ДМ. Полученные результаты показывают, что в исследуемой выборке собак большинство животных являются носителями генотипа GG (97,45% животных), в то время как носители заболевания и больные животные составляют 1,53% и 1,02% соответственно. Таким образом, авторы приходят к выводу, что популяция породистых собак Республики Беларусь характеризуется низкой частотой встречаемости мутантного аллеля гена *SOD1*, связанного с развитием ДМ.

## Библиографические ссылки

1. Practical guide to canine and feline neurology. 3rd edition. Ed. by Dewey C.W., Da Costa R.C. John Wiley & Sons, 2015. – 672 p.
2. Lorenz M. D., Coates J., Kent M. Handbook of veterinary neurology-e-book. 5th Edition. Elsevier Health Sciences, 2010. – 545 p.
3. Morgan B. R., Coates J. R., Johnson G. C. Characterization of intercostal muscle pathology in canine degenerative myelopathy: A disease model for amyotrophic lateral sclerosis // Journal of Neuroscience Research. 2013. Vol. 91, iss. 12. P. 1639–1650.

# ИНДУКТИВНО-РЕЗОНАНСНЫЙ ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ МЕЖДУ ТИОФЛАВИНОМ Т И ЕГО СТИРИЛОВЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ПРИ ИХ ВСТРАИВАНИИ В АМИЛОИДНЫЕ ФИБРИЛЛЫ

Е. И. Плигин<sup>1</sup>, А. А. Луговский<sup>2</sup>, Е. С. Воропай<sup>2</sup>, А. А. Маскевич<sup>1</sup>

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

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

Изучены спектрально-люминесцентные свойства стироловой производной тиофлавина Т (ThT) — тозилат 2- $\{(1E,3E)-4-[4-(\text{диметиламино})-2,6\text{-диметилфенил}]бута-1,3\text{-диен-1-ил}\}-3\text{-этил-1,3-бензтиазолия-3}$  (Th-C23). Кинетика затухания флуоресценции Th-C23, интеркаллированного в амилоидные фибриллы (АФ), является не экспоненциальной и может быть представлена в виде одномодального распределения флуорофоров по длительности  $\alpha(\tau)$ , что указывает на наличие одной моды встраивания молекул красителя в структуру амилоидных фибрилл.

Th-C23 при встраивании в АФ имеет длинноволновое положение спектра поглощения, максимум которого соответствует длине волны 560 нм. Краситель совместно с ThT образует удобную донорно-акцепторную (Д-А) пару, где ThT выступает в качестве донора, а Th-C23 – в качестве акцептора энергии электронного возбуждения. Установлено, что степень поляризации акцептора имеет высокое значение ( $\sim 0,4$ ) в пределах всего спектра флуоресценции. Это позволило предположить, что оба красителя при встраивании в бороздки фибрилл имеют параллельную либо антипараллельную взаимную ориентацию.

На основании измерения спектра флуоресценции донора (ThT) и спектра поглощения акцептора (Th-C23) рассчитан критический радиус переноса энергии  $R_0$ , который может принимать значения от 54 до 68 Å в зависимости от взаимной ориентации и квантового выхода Д и А.

Выполненные исследования подтверждают сделанное ранее предположение о том, что ThT и его стироловые производные встраиваются в бороздки АФ главным образом вдоль их длинной оси [1, 2] и показывают возможность использования индуктивно-резонансного переноса энергии для изучения структуры и механизма образования амилоидных фибрилл.

Работа выполнена при финансовой поддержке МО РБ, ГПНИ «Фотоника и электроника для инноваций», задание 1.5.

## Библиографические ссылки

1. Krebs M. R., Bromley E. H., Donald A. M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications // J. Str. Biology. 2005. Vol. 149, iss. 1. P. 30–37.
2. Спектры ГКР тиофлавина Т: проявление электромагнитных и молекулярных механизмов усиления / А. А. Маскевич [и др.] // Журн. прикл. спектр. 2015. Т. 82, № 4. С. 497–504.

# ИЗОТОПНЫЙ $^2\text{H}/^1\text{H}$ СОСТАВ ВОДНОГО ОКРУЖЕНИЯ МОЖЕТ ИЗМЕНЯТЬ ВЕРОЯТНОСТЬ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ЗОН ОТКРЫТЫХ СОСТОЯНИЙ В МОЛЕКУЛЕ ДНК

Н. С. Рукояткин, К. Р. Беспалко, О. В. Решетникова, В. А. Бражко, С. С. Джима

*Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия*

В физиологическом диапазоне температур самопроизвольное возникновение открытых состояний (разрывов водородных связей между парами азотистых оснований), а также пузырей (областей с несколькими открытыми состояниями (ОС) подряд) происходит редко. В основном эти процессы инициируют специализированные ферменты в момент, когда генетический код доступен для молекулярных механизмов считывания информации. Возникновение зон ОС происходит во время транскрипции, репликации, рекомбинации, восстановления или связывания любого фермента на отдельных цепях.

Известно, что изменение содержания дейтерия в живых системах оказывает влияние на метаболические процессы в них [1]. Причем, это касается как повышенных [2], так и пониженных концентраций дейтерия относительно природного уровня [1].

С учетом вышесказанного, попадание атома дейтерия в водородные связи между парами азотистых оснований ДНК может оказывать влияние на термодинамические характеристики как в месте его локализации, так и на отдаленных участках [3]. Произвести оценку этих изменений можно только с использованием методов математического моделирования.

С помощью угловой математической модели ДНК [3] установлено, что вероятность образования пузырей определенной длины (от 12 до 27 нуклеотидов) зависит от локализации атома дейтерия в молекуле ДНК и может существенно отличаться от вероятности возникновения открытых состояний в целом. При этом необходимо отметить, что, хотя в большинстве случаев различия в возникновении открытых состояний в бездейтериевой ДНК в сравнении с той же молекулой, включающей единичную  $^2\text{H}/^1\text{H}$  замену, составляет при воздействии  $E_{\text{кр}}$  (в диапазоне от 270 до  $290 \cdot 10^{-25}$  Н·м) достаточно невысокую величину: максимальное возрастание количества открытых состояний было около 2.8% (при замене изотопов водорода в 20-й паре азотистых оснований), наибольшее уменьшение количества открытых состояний наблюдалось менее чем на 2.9% (при замене изотопов водорода в 353-й паре азотистых оснований); изменение частоты возникновения пузырей ДНК различной длины в свою очередь составило уже существенно более значимую величину: снижение на 36.3% и возрастание на 250.4% при замене изотопов водорода в 353-й и 376-й парах азотистых оснований соответственно (при  $E_{\text{кр}}$  равном  $290 \cdot 10^{-25}$  Н·м).

## Библиографические ссылки

1. Possible mechanisms of biological effects observed in living systems during  $^2\text{H}/^1\text{H}$  isotope fractionation and deuterium interactions with other biogenic isotopes / A. Basov [et al.] // Molecules. 2019. Vol. 24, iss. 22. P. 4101.

2. Смещение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме лабораторных животных при пятикратном повышении концентрации дейтерия в питьевом рационе / С. В. Козин [и др.] // Биофизика. 2023. Т. 68, № 2. С. 369–375.

3. Inequality in the frequency of the open states occurrence depends on single  $^2\text{H}/^1\text{H}$  replacement in DNA / A. Basov [et al.] // Molecules. 2020. Vol. 25, iss. 16. P. 3753.

## ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ ПРИРОДНОГО И СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ПИЩЕВЫХ МАСЕЛ

А. А. Русакович, А. С. Белозор, В. В. Демидчик

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

На сегодняшний день пищевые растительные масла составляют неотъемлемую часть рациона человека. Однако в процессе хранения, под действием температурных и световых факторов, в маслах происходят окислительные процессы, приводящие к изменению их вкусовых качеств и снижению полезных свойств. В основе этих окислительных процессов лежит генерация активных форм кислорода [1]. Накопление АФК в маслах инициирует радикализацию жирных кислот [2]. Для исследования механизмов свободнорадикального окисления на сегодняшний день широко применяется метод ЭПР-спектроскопии. Для более эффективного анализа короткоживущих свободных радикалов в исследуемые системы вводят спиновые ловушки, формирующие с радикалами долгоживущие, стабильные парамагнитные аддукты [3].

Окислительная стабильность продукта зависит от его способности предотвращать образование свободных радикалов, и в значительной степени определяется содержанием в нем антиоксидантов. Для оценки окислительной стабильности масел методом ЭПР-спектроскопии проводится определение уровня его эндогенного антиоксидантного потенциала (ЕАР) [4]. Значение ЕАР рассчитывается по точке перегиба кинетической кривой накопления спинового аддукта в образце при его нагревании. Определение антиоксидантного потенциала позволяет оценить влияние отдельных компонентов, стадий производства, типов упаковки и условий хранения на устойчивость продукта к окислению.

Методом ЭПР-спектроскопии с применением спиновых ловушек была проведена оценка окислительной стабильности ряда широко употребляемых в пищу растительных масел. Среди протестированных образцов наименьшую стабильность продемонстрировало подсолнечное. Его эндогенный антиоксидантный потенциал составил 20 мин, интенсивность сигнала в значительной степени превышала этот же показатель в других образцах. ЕАР рапсового масла составил 40 мин. Наиболее стабильным оказалось льняное масло (ЕАР=50 мин). Дальнейшие исследования по оценке воздействия антиоксидантов на окислительную стабильность масел проводились на подсолнечном масле. При добавлении к нему спиртового экстракта розмарина интенсивность ЭПР-сигнала снижалась, по сравнению с контрольным образцом, а значение ЕАР составляло 70 мин, при ЕАР контрольного образца – 50 мин. Значение ЕАР для образца подсолнечного масла с добавлением синтетического аскорбата составило 115 мин, при добавлении экстракта шиповника с эквивалентной концентрацией аскорбиновой кислоты – 125 мин. Эндогенный антиоксидантный потенциал контрольного образца составлял 20 мин. Таким образом, аскорбиновая кислота из экстракта шиповника продемонстрировала наибольшую эффективность по увеличению окислительной стабильности подсолнечного масла.

### Библиографические ссылки

1. *Halliwell B., Gutteridge J. M. C.* Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford university press, 2015. – P. 22–24.
2. *Kostik V., Memeti S., Bauer B.* Fatty acid composition of edible oils and fats // Journal of Hygienic Engineering and Design. 2013. Vol. 4. P. 112–116.
3. *Davies M. J.* Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods / Methods. 2016. Vol. 109. P. 21–30.
4. *Andersen M. L., Skibsted L. H.* ESR spectroscopy for the study of oxidative processes in food and beverages. Modern magnetic resonance. Dordrecht : Springer Netherlands, 2006. – P. 1861–1866.

## ВЛИЯНИЕ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ АТМОСФЕРНОГО РАЗРЯДА НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

**В. В. Самохина<sup>1</sup>, А. А. Русакович<sup>1</sup>, В. С. Мацкевич<sup>1</sup>, И. В. Змитрович<sup>1</sup>,  
А. В. Аксютин<sup>2</sup>, К. Т. Логунов<sup>2</sup>, Н. Л. Пшибытко<sup>1</sup>, Д. А. Котов<sup>2</sup>, В. В. Демидчик<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники,  
Минск, Беларусь

Холодная плазма атмосферного разряда представляет собой смесь нейтральных и метастабильных атомов и молекул газа, которая обеспечивает нагрев обрабатываемого объекта до температуры не более 40 °С. Обработка плазмой приводит к модификации поверхности, повышая ее адгезионные и гидрофильные свойства. Кроме того, холодная плазма индуцирует образование свободных радикалов и химически активного поверхностного слоя. Плазма ионизирует триплетный кислород воздуха, формируя гидроксильные радикалы в газообразной форме. Весьма актуальным представляется исследование влияния холодной плазмы на функциональное состояние, ростовые и сигнальные процессы высших растений с целью разработки методов повышения их продуктивности и устойчивости. В данной работе использовался экспериментальный комплекс, разработанный Белорусским государственным университетом информатики и радиоэлектроники, генерирующий холодную (21–27 °С) плазму диффузного разряда. С использованием метода электронного парамагнитного резонанса со спиновой ловушкой 5,5-диметилпирролин-N-оксид была показана генерация активных форм кислорода, включая гидроксильные радикалы, в растворах, имитирующих биологические среды, при их обработке данной холодной плазмой. Амплитуда ЭПР сигнала, индуцируемого холодной плазмой, линейно возрастала с увеличением времени ее воздействия. В качестве растительных тест-объектов воздействия холодной плазмы использовались семена и проростки ряда высших растений (*Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.), *Triticum aestivum* L.), выращенные *in vitro* и *in vivo*. Обработка семян и проростков проводилась на расстоянии стримеобразования (25–75 мм), время воздействия составляло 1–5 с. Показано, что обработка семян *Arabidopsis thaliana* L. и *Triticum aestivum* L. холодной плазмой стимулировала ростовые процессы, приводила к увеличению скорости роста корней. В то же время, воздействие холодной плазмы на проростки арабидопсиса и пшеницы подавляло рост корней. Обработка плазмой в течение 3 с вызывала увеличение флуоресценции дигидроэтидиума в зоне деления корня на 40% по сравнению с контролем, что свидетельствовало о генерации АФК. Зона всасывания не была чувствительной к плазме. Добавление антиоксидантов (1 мМ тиомочевина и 600 ед. супероксиддисмутазы) снижало уровень флуоресценции дигидроэтидиума в зоне деления корня до уровня контроля, уменьшая токсическое действие плазмы на рост корней. С увеличением времени воздействия холодной плазмы подавление ростовых процессов усиливалось, а увеличение расстояния до обрабатываемого объекта снижало ее ингибирующий эффект.

Работа выполнена в рамках проектов ГПНИ «Закономерности воздействия холодной плазмы на процессы клеточной сигнализации у высших растений» (№ госрегистрации 20211734).

# ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДИАМИНОКАРБЕНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ПАЛЛАДИЯ(II) И ПЛАТИНЫ(II) С ТИМУСНОЙ ДНК

**Т. В. Серебрянская<sup>1</sup>, М. А. Кинжалов<sup>2</sup>, Н. А. Касьяненко<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>НИИ физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Комплексы палладия(II) и платины(II) с ациклическими диаминокарбенами представляют собой новый класс металлосодержащих антипролиферативных агентов, проявляющих высокую цитотоксическую активность и селективность в отношении опухолевых клеточных линий с измененным метаболизмом (в частности, выраженным эффектом Варбурга) [1]. Антипролиферативная активность данных комплексов варьируется в зависимости от природы центрального атома, а также строения диаминокарбенового лиганда [1, 2] и в ряде случаев достигает наномолярных значений концентрации 50%-ного ингибирования пролиферации опухолевых клеток. Известно, что каспаза 3/9-опосредованная гибель опухолевых клеток под действием диаминокарбеновых комплексов палладия(II) сопровождается существенной деполяризацией внешних митохондриальных мембран и перекисным окислением липидов [1], однако детальный механизм их антипролиферативного действия к настоящему времени не установлен.

В рамках данной работы взаимодействие двух изоструктурных диаминокарбеновых комплексов палладия(II) и платины(II) с тимусной ДНК как одной из потенциальных биологических мишеней изучено с использованием ряда спектральных и гидродинамических методов, включая электронную спектроскопию, вискозиметрию, двойное лучепреломление, динамическое светорассеяние, а также атомно-силовой микроскопии. Установлено, что, несмотря на близкое химическое строение, исследованные комплексы характеризуются существенно разным способом связывания с ДНК. Взаимодействие комплекса палладия(II) с ДНК носит преимущественно электростатический характер и не приводит к значимому изменению вторичной структуры макромолекулы, в то время как связывание комплекса платины(II) сопровождается существенной дестабилизацией двойной спирали, на что указывает значительное снижение температуры плавления тимусной ДНК в растворе ( $\Delta T_{пл} = -13$  °C).

Таким образом, исследуемые комплексы взаимодействуют с ДНК *in vitro*, однако макромолекула, вероятнее всего, не является основной биологической мишенью диаминокарбеновых комплексов палладия(II), а связывание их платиновых аналогов с ДНК может служить причиной наблюдаемых в эксперименте различий в спектре антипролиферативной активности диаминокарбеновых комплексов платины(II) и палладия(II).

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант № X24MC-004).

## Библиографические ссылки

1. Metal-(acyclic diaminocarbene) complexes demonstrate nanomolar antiproliferative activity against triple-negative breast cancer / S. A. Katkova [et al.] // Chem.–A Eur. J. 2024. Vol. 30, iss. 28. P. e202400101.

2. Water soluble palladium(II) and platinum(II) acyclic diaminocarbene complexes: solution behavior, DNA binding, and antiproliferative activity / T. V. Serebryanskaya [et al.] // New J. Chem. 2020. Vol. 44, iss. 15. P. 5762–5773.

## КВАНТОВО-МОЛЕКУЛЯРНОЕ, МОЛЕКУЛЯРНОЕ И КЛЕТОЧНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ РАДИОИЗЛУЧЕНИЯ СВЕРХВЫСОКИХ РАЗВЕДЕНИЙ АНТИТЕЛ К ИНТЕРФЕРОНУ ГАММА

**Г. О. Степанов<sup>1</sup>, Н. Н. Родионова<sup>1</sup>, А. О. Петрова<sup>1</sup>, А. А. Кухнинова<sup>1</sup>,  
И. В. Молодцова<sup>1</sup>, В. С. Борискин<sup>1</sup>, В. В. Новиков<sup>2</sup>, Е. В. Яблокова<sup>2</sup>,  
М. В. Снастин<sup>3</sup>, С. А. Тарасов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ООО «НПФ «Материа Медика Холдинг», Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт биофизики клетки РАН ПНЦБИ, Пущино, Россия

<sup>3</sup>Московский авиационный институт, Москва, Россия

В последнее время активно проводятся исследования физико-химических характеристик образцов, подготовленных с использованием технологии сверхвысоких разбавлений (СВР) в сочетании с механическим воздействием (вибрационной обработкой) [1]. СВР образцы характеризуется изменением параметров сетки водородных связей, способностью вызывать конформационные изменения в белках, могут бесконтактно влиять на растворы активаторов выработки АФК нейтрофилами, излучать в радиодиапазоне от 50 до 3500 МГц и пр. [2–4].

Целью данной работы является исследование способности СВР антител к интерферону гамма (СВР АТ к ИФНг) излучать в радиодиапазоне до 30 ГГц (радиоспектрометрия в безэховой камере), бесконтактно модифицировать свойства сетки водородных связей воды (терагерцовая спектроскопия), а также белок-белковые взаимодействия (ИФА), влиять на активность нейтрофилов (клеточная хемилюминесценция).

Показано, что интенсивность излучения лактозы, насыщенной СВР АТ к ИФНг, в диапазоне 10-20 ГГц выше ( $p < 0.05$ ), чем лактозы, насыщенной СВР растворителя (контроль). Постановка СВР АТ к ИФНг вплотную к флакону с водой (1 класса чистоты) с применением вибрационной обработки изменяет ее способность модифицировать ИФНг, что оценивалось при помощи терагерцовой спектроскопии (13 % уменьшался  $\Delta\epsilon_1$  ( $p < 0.05$ ) и на 29% увеличивался  $\Delta\epsilon_2$  ( $p < 0,05$ ). Данные ТГц параметры отображают степень связывания молекул воды в растворе). Также модификация ИФНг, в похожей постановке оценивалась методом ИФА, где его связывание с АТ к ИФНг изменялось от 25% до 10% ( $p < 0.1$ ) для концентраций антител от 12,5 нг/мл до 100 нг/мл, соответственно. Кроме того, способность нейтрофилов к выработке АФК увеличивается примерно в 3 раза при их бесконтактной инкубации с пробиркой с раствором СВР АТ к ИФНг.

Таким образом, показана способность СВР АТ к ИФНг накапливать и излучать энергию. Полученные результаты не только детализирует понимание фундаментальных механизмов действия образцов полученных по технологии последовательных разбавлений, но и расширяют круг методических подходов для контроля подлинности и качества препаратов приготовленных на основе технологически обработанных растворов.

### Библиографические ссылки

1. *Epstein O.* The supramolecular matrix concept // *Symmetry*. 2023. Vol. 15, iss. 10. P. 1914.
2. *Woods K. N.* Modeling of protein hydration dynamics is supported by THz spectroscopy of highly diluted solutions // *Front. Chem.* 2023. Vol. 11. P. 1131935.
3. *Novikov V. V., Yablokova E. V.* Interaction between highly diluted samples, protein solutions and water in a controlled magnetic field // *Applied Sciences*. 2022. Vol. 12, iss. 10. P. 5185.
4. The effect of aqueous solutions processed using gradual technology on the emission of a carbohydrate (lactose) in the RF range / G. O. Stepanov [et al.] // *Phys. Wave Phen.* 2024. Vol. 32, iss. 1. P. 43–47.

## ОЦЕНКА СТЕХИОМЕТРИИ И КОНСТАНТЫ ДИССОЦИАЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАРДИОЛИПИНА И ФОСФАТИДНОЙ КИСЛОТЫ С ЦИТОХРОМОМ С

А. А. Стручкова, Г. О. Степанов, А. Н. Осипов

*ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова" Минздрава Российской Федерации, Москва, Россия*

Процессы регулируемой клеточной гибели, в том числе и апоптоза, играют значительную роль в развитии заболеваний различных этиологий, включая онкологические заболевания [1]. При изучении данных процессов немаловажно понимание механизмов взаимодействия цитохрома С (CytC) с анионными фосфолипидами клеточных мембран. При данном взаимодействии увеличивается пероксидазная активность CytC, что приводит к формированию пор в мембране, обеспечивающих его выход из митохондрий [2]. Роль тетраолеилкардиолипина (TOCL) в данном процессе хорошо известен [3], однако, остаются менее изученными механизм молекулярного взаимодействия CytC и диолеилфосфатидной кислоты (DOPA), а также константы диссоциации и стехиометрия данных белок-липидных взаимодействий.

В данной работе выполнена оценка стехиометрии и констант диссоциации взаимодействия CytC с фосфолипидными липосомальными мембранами, содержащими TOCL и DOPA, а также диолеилфосфатидилхолин (DOPC). Данное взаимодействие оценивалось по тушению интенсивности флуоресценции фосфатидилхолина, меченого NBD (NBD-PC) при их титровании возрастающими концентрациями CytC. Количество NBD-PC во всех липосомах составляло 0.5%.

На основе полученных кривых титрования по модели Ленгмюра были рассчитаны равновесные константы диссоциации TOCL-, DOPA-, и DOPC-содержащих липосом с CytC, которые составили, соответственно,  $K_d=8.32 \cdot 10^{-6}$  М ( $R_2=0.984$ );  $4.98 \cdot 10^{-6}$  М ( $R_2=0.986$ ) и  $0.80 \cdot 10^{-6}$  М ( $R_2=0.705$ ). Стехиометрия взаимодействия для комплексов липид-белок составила TOCL/CytC=18.19; DOPA/CytC=7.42; DOPC/CytC=0.68.

Таким образом, данное исследование показало, что связывательная способность CytC зависит от вида фосфолипидов, входящих в состав мембран, при этом, его химическое взаимодействие с ранее изученным кардиолипином (TOCL) сравнимо со взаимодействием с фосфатидной кислотой (DOPA). Кроме того, связывание CytC с фосфатидилхолин (DOPC)-содержащими мембранами оказалось незначимым.

Сравнительно близкие стехиометрические показатели и значения константы диссоциации фосфатидной кислоты и кардиолипина свидетельствуют о том, что фосфатидная кислота обладает схожей связывательной способностью к CytC, что и кардиолипин. Следовательно, изучение механизмов влияния фосфатидной кислоты имеет значение при исследовании молекулярных механизмов развития апоптоза и особенности патологической физиологии ряда заболеваний, связанных с данным процессом.

### Библиографические ссылки

1. *Yılmaz M. B., Muz D.* Apoptosis in cancer: 2 // *Turk. J. Vet. Res.* 2022. Vol. 6, iss. 2. P. 85–95.
2. Release of cytochrome C from Bax pores at the mitochondrial membrane / *M. Zhang [et al.]* // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, iss. 1. P. 2635.
3. Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome c / *J. Hanske [et al.]* // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012. Vol. 109, iss. 1. P. 125–130.

## ***IN SILICO* АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА**

**Г. Г. Султанова, Р. А. Ганиева, С. Б. Дадашева, Х. Х. Мамедова,  
В. Х. Гасимова, Н. Б. Гусейнова**

*Институт ботаники министерства науки и образования АР, Азербайджанский  
медицинский университет, Баку, Азербайджан*

Нами исследовано сродство некоторых веществ (-галантамин, стандартный лекарственный препарат, пентахлорнитробензол, пентахлорфенат натрия, рогор (диметоат), трихлоруксусная кислота, трихлорфон, тритерпеноид, сапонин и стероидный алкалоид)) к рекомбинантной ацетилхолинэстеразе человека (PDB ID: 4EY6). Ацетилхолинэстераза (АХЭ), катализируя расщепление ацетилхолина, является важным ферментом, который способствует прекращению передачи нервных импульсов, в частности, при болезни Паркинсона и Альцгеймера, относящихся к неврологическим заболеваниям, приводящим к нарушению регуляции активности АХЭ. Исследования с использованием молекулярного докинга *in silico* предлагают экономичный метод создания лекарств, поскольку позволяют получить важную информацию о взаимодействиях между предполагаемыми лигандами и белками-мишенями.

Для анализа молекулярного взаимодействия использовалось программное обеспечение Biovia Discovery Studio 2023. Рекомбинантная АХЭ человека в комплексе с рентгенокристаллическими структурами белка (-)галантамина (PDB ID: 4EY6) были получены из Банка данных о белках. После добавления водорода к белку 4EY6 с использованием алгоритма force field энергия белка была снижена с помощью силового поля CHARMM. SDF-файлы молекул изученных соединений были получены из базы данных PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Показано, что галантамин обладает высокой склонностью к связыванию с активным участком АХЭ, где он образует жизненно важные контакты с важными остатками. В силу большого размера такие вещества, как стероидные алкалоиды и сапонин, не вступают в значимые взаимодействия с активным центром АХЭ. В тоже время пентахлорфенат натрия, пентахлорнитробензол, рогор (диметоат), трихлоруксусная кислота, трихлорфон и тритерпеноид, продемонстрировали различную степень сродства к АХЭ, что указывает на их потенциал в качестве модуляторов или ингибиторов АХЭ.

Полученные результаты характеризуют фармакологическое воздействие соединений и предоставляют полезную информацию о молекулярных взаимодействиях между АХЭ и другими веществами. Высокая степень связывания соединений с АХЭ может предложить их для дополнительного тестирования и разработки лекарств с учетом размера и формы молекул для взаимодействия лиганд-белок.

Наши исследования проливает свет на возможные фармакологические действие соединений на рекомбинантную АХЭ человека и предоставляет важную информацию для создания новых методов лечения нейродегенеративных заболеваний.

### Библиографические ссылки

1. *In vitro* and *in silico* acetylcholinesterase inhibitory activity of thalictricavine and canadine and their predicted penetration across the blood-brain barrier / J. Chlebek [et al.] // *Molecules*. 2019. Vol. 24, iss. 7. P. 1340.

2. Identification of natural compounds of the apple as inhibitors against cholinesterase for the treatment of Alzheimer's disease: An *in silico* molecular docking simulation and ADMET study / Q. M. S. Jamal [et al.] // *Nutrients*. 2023. Vol. 15, iss. 7. P. 1579.

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА БЕЛКОВ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ АРХЕЙ

М. С. Тарасик, В. В. Хрусталёв, О. В. Хрусталёва, В. В. Побойнев,  
А. Н. Стожаров

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Многие виды архей приспособились к жизни при высоких температурах: их белки не подвергаются денатурации при 80–100 °С. Одним из методов, позволяющих оценить степень конформационной изменчивости белка, является молекулярная динамика. При проведении симуляции можно задавать такой исходный параметр, как температура. Интегральным показателем, который показывает, насколько термодинамически наиболее выгодная конформация белка при данных параметрах отличается от исходной, является величина среднего квадратического отклонения позиций всех атомов (RMSD) при стабилизации траектории.

Цель работы – выяснить, существуют ли достоверные различия в величине RMSD для белков термостабильных и мезофильных архей в симуляциях молекулярной динамики при 300 К и при 373 К.

Симуляции проводили с помощью программы MyPresto [1], содержащей алгоритм GROMACS [2]. Ограничением для этой программы, запустить которую можно с любого компьютера, является размер белка – не более 25000 атомов. Это ограничение позволяет сократить время симуляции до 10 нс. Нами были изучены 17 белков мезофильной археи *Metanosarcina mazei* и 39 белков термофильных архей: *Metanopyrus kandleri* (5), *Pyrococcus furiosus* (12), *Saccharolobus solfataricus* (22). Статистический анализ проводили с помощью программы PAST. Распределение показателя RMSD не было нормальным согласно критерию Шапиро-Уилка.

Симуляции при 300 К для белков мезофильных архей проходили с RMSD (0,28; 0,24–0,35 нм), который достоверно не отличался от такового для белков термофильных архей (0,27; 0,20–0,35 нм), согласно критерию Манна-Уитни ( $P=0,45$ ). Не было достоверных различий в этом показателе ( $P=0,09$ ) и при симуляциях, проведенных при 373 К: RMSD составлял 0,46 нм (0,34–0,6) для белков мезофильных архей и 0,35 нм (0,26–0,48) для белков термофильных архей. Разброс RMSD среди разных белков достаточно широк, однако ни один из них не терял свою структуру полностью в результате симуляции.

Повышение температуры, тем не менее, достоверно увеличивало RMSD как для белков мезофильных архей ( $P<0,001$  в парном тесте Вилкоксона), так и для белков термофильных архей ( $P<0,001$ ). Интересно отметить, что для нескольких белков (для одного белка мезофильной археи и 4 белков термофильных архей) RMSD при 373 К был ниже, чем при 300 К. Величина разности между RMSD при 373 К и 300 К при этом достоверно не отличалась ( $P=0,27$ ) в выборках белков мезофильных и термофильных архей.

Полученные данные говорят о том, что по результатам симуляции молекулярной динамики при использованных в данной работе параметрах очень сложно судить о степени устойчивости структуры белка к повышению температуры.

### Библиографические ссылки

1. MyPresto/omegagene 2020: a molecular dynamics simulation engine for virtual-system coupled sampling / К. Kasahara [et al.] // Biophys. Physicobiol. 2020. Vol. 17. P. 140–146.
2. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers / M. J. Abraham [et al.] // SoftwareX 2015. Vol 1–2. P. 19–25.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИГНИНСОДЕРЖАЩИХ ГИДРОГЕЛЕЙ

Д. А. Тарасова, И. С. Черепанов, И. А. Черенков

*ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия*

Гидрогелевые среды имитируют естественное окружение клеток, не нарушая их обмен веществами с окружающей средой. Конструкты из гелеобразующих материалов с иммобилизованными клетками имеют перспективы для использования в системах биодegradации органических веществ. При этом остается актуальным вопрос о поиске оптимального состава гелеобразующей среды, сочетающей в себе биосовместимость, хорошие механические и регулируемые биодegradационные свойства. Целью работы стало исследование физико-химических свойств биосовместимых гидрогелей на основе поливинилового спирта (ПВС), альгината натрия (АН) и лигнина (Л).

Гидрогели получали путем сшивания синтетической полимерной матрицы из ПВС в сочетании АН и Л. Для этого компоненты растворяли в дистиллированной воде при постоянном перемешивании. Полученную смесь вводили в водный раствор  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , формируя сферические конструкты, и оставляли на сутки для сшивания. Затем конструкты переносили в раствор сульфата натрия для стабилизации [1].

Обнаружено, что лигнин хорошо комбинируется с гелеобразователями в исследованных пропорциях. Являясь трудно расщепляемым субстратом [2], он призван обеспечить более длительную дegradацию конструктов, а его сорбционные свойства позволят стабилизировать биомассу и обеспечить захват органических загрязнителей для последующей утилизации клетками.

Были исследованы гидратационные свойства полученных носителей. Дегидратация наиболее интенсивно происходит в первые сутки. При регидратации в первые часы происходит резкий рост значений массы с дальнейшим выходом на постоянные значения, что говорит о быстрой абсорбции воды композитом.

Сорбционные свойства композитных гидрогелей ПВС/Л/АН были изучены на растворе метиленового голубого. Наибольшую адекватность представления сорбционных характеристик конструктов с лигнином показала математическая модель Фрейндлиха, согласно которой адсорбция происходит на гетерогенном слое сорбента с неопределенным количеством активных центров связывания.

На ИК-спектрах твердая фаза полученных гидрогелей характеризуется полосами, указывающими на сочетание в структуре сорбента фрагментов ПВС ( $1643 \text{ см}^{-1}$ ), АН ( $1035 \text{ см}^{-1}$ ) и Л ( $1516 \text{ см}^{-1}$ ), несколько смещенных от своих положений в исходных спектрах, что подтверждает образование межмолекулярных связей между компонентами композита. В последствии ИК-спектры будут анализироваться для контроля биодegradации конструктов.

Таким образом экспериментально обоснована возможность получения гидрогелевых носителей на основе ПВС и АН с включением в их состав лигнина и изучены их физико-химические свойства. Такие материалы имеют перспективы для формирования конструкций различной геометрии для иммобилизации биомассы и конструирования искусственного неклеточного матрикса-имитатора биопленок.

### Библиографические ссылки

1. *Wang P. H., Chang Y. R., Lee D. J.* Shape stable poly(vinyl alcohol) hydrogels with immobilized activated sludge at repeated dry-rewet cycles // *Bioresour. Technol.* 2019. Vol. 289. P. 121662.

2. Физическая химия лигнина. Под ред. Боголицына К.Г., Лунина В.В., Москва: Академкнига, 2010. – 489 с.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНГИБИРОВАНИЯ Т-КЛЕТОК БЕЛКОМ LAG-3, ЭКСПРЕССИРУЕМЫМ НА РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТКАХ

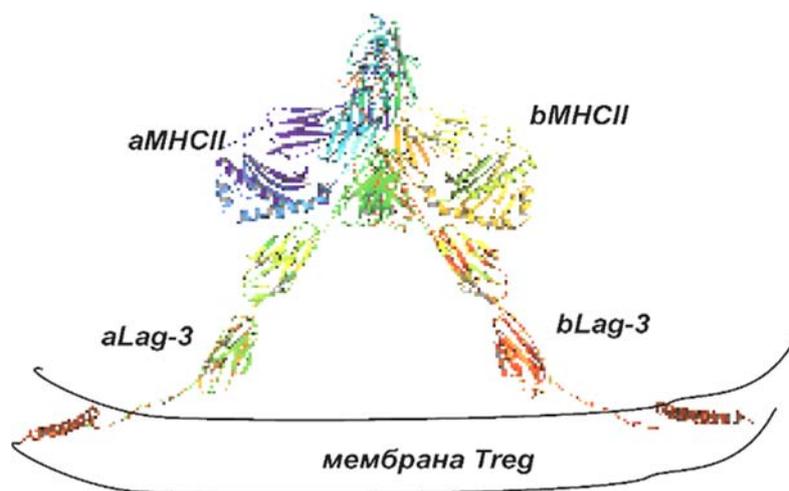
**В. А. Урбан, Ф. О. Константинов, В. Г. Вересов**

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

**Введение.** LAG-3 (lymphocyte activation gene 3) является ингибиторным рецептором, конститутивно и в высоком количестве экспрессируемым на регуляторных Т-клетках. Установлено, что Lag-3 играет важную роль в ингибировании эффекторных клеток и Treg-опосредованной иммуносупрессии, однако механизмы, которые использует Lag-3 для этого остаются неясными. Было высказано предположение, что Lag-3 на регуляторных клетках взаимодействует с МНСII на дендритных клетках, препятствуя созреванию CD4-Т-клеток.

**Цель работы** – используя атомистическое структурное моделирование транс-комплекса МНСII/Lag-3 установить механизмы иммуносупрессивного действия белка Lag-3, экспрессируемого на поверхности регуляторных Т-клетках.

**Методы исследования.** С использованием программ I-TASSER, GalaxyRefine, FG-MD и DEMO осуществлено моделирование атомистических полноцепочечных 3D-структур комплекса рМНСII и белка Lag-3. С использованием комбинаций программ PIPER, GRAMM-X, HDOCK, GalaxyRefineComplex, ROSETTADOCK было осуществлено моделирование транс-комплекса между мономером рМНСII, находящимся на поверхности антиген-презентирующей клетки, и мономером Lag-3, находящимся на поверхности регуляторной Т-клетки, после чего было осуществлено моделирование атомистической структуры тетрамерного комплекса рМНСII-Lag-3-Lag-3-рМНСII. Анализ интерфейсов осуществляли с помощью сервиса PPCheck и программы Rosetta3 InterfaceAnalyzer.



Комплекс димера Lag-3, экспрессируемого на мембране регуляторной Т-клетки с мономерами aMHCII и bMHCII, экспрессируемыми на мембране антиген-презентирующей клетки

**Результаты.** Наше исследование показало, что молекулы Lag-3 связываются с мономерами рМНСII вблизи интерфейса связывания рМНСII с Т-клеточным рецептором, тем самым препятствуя механизму узнавания антигенов и активации эффекторной Т-клетки.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (гранты Б23М-094, Б24-034).

#### **Библиографические ссылки**

1. Binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity / T. Maruhashi [et al.] // Immunity. 2022. Vol. 55, iss. 5. P. 912–924.

## ПРИРОДНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ ПЕКТИН И ФУКОИДАН СНИЖАЮТ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ СИСТЕМЫ ЛЮЦИФЕРИН-ЛЮЦИФЕРАЗА

Р. Х. Фирова<sup>1</sup>, Д. В. Мосиевич<sup>1,2</sup>, Н. Г. Балабушевич<sup>2</sup>, О. М. Панасенко<sup>1</sup>,  
Е. В. Михальчик<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Люциферазу используют непосредственно для измерения уровня АТФ, а ее ген встраивают в качестве репортерного в геном клеток растений, бактерий и млекопитающих. Активность люциферазы в клеточных лизатах удобно измерять методом хемилюминесценции (ХЛ). Для правильной интерпретации результатов важно исключать эффекты, связанные с воздействием на фермент компонентов, содержащихся в среде измерений. Пектин и фукоидан входят в состав клеток растений и водорослей, а их биологическая активность, в том числе, при включении в нано- и микроносители для доставки белков и других препаратов, служит объектом многочисленных исследований.

Целью нашей работы была оценка эффектов природных полисахаридов – коммерческих пектина из яблок и фукоидана из *Fucus vesiculosus* на активность люциферазы светляков *Luciόla mingrelica* («Люмтек», Россия) в модельной бесклеточной системе *in vitro*. К раствору смеси люциферин-люцифераза в 0,05 М Трис буферном растворе (рН 7,8), содержащему 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, добавляли полисахариды в разных концентрациях, регистрировали кинетику ХЛ и оценивали их эффекты по степени снижения ХЛ относительно контроля. В параллельных экспериментах индуцировали ХЛ ответ добавкой АТФ к раствору смеси люциферин-люцифераза, а затем вносили полисахариды и оценивали снижение ХЛ за 5 мин относительно исходного уровня, что позволило получать более воспроизводимые результаты. Независимо от схемы анализа, было зарегистрировано снижение ХЛ под действием пектина (C<sub>50</sub>≈0.5 мг/мл) и фукоидана (C<sub>50</sub>≈0.05 мг/мл). При добавлении в пробы с полисахаридами 5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА, рI 4,9) или лактоферрина (рI 8,0–8,5) ингибирующие эффекты полисахаридов проявлялись в меньшей степени и зависели от концентрации белка. Лактоферрин сильнее, чем БСА, препятствовал ингибирующему действию полисахаридов. Следует отметить, что для уменьшения ингибирующего эффекта фукоидана требовались более высокие концентрации БСА и лактоферрина, чем для пектина. По-видимому, ингибирование люциферазы (рI 6,2–6,3) анионными полисахаридами происходит вследствие полиэлектролитных взаимодействий и зависит от природы полисахарида, поскольку эффекты фукоидана были выражены значительно сильнее, чем эффекты пектина. Фукоидан относится к сульфатированным полисахаридам и имеет ζ-потенциал равный -56 мВ, тогда как пектин содержит карбоксильные группы, и его ζ-потенциал составляет -20 мВ. Эти особенности могут в значительной степени обуславливать выявленные в настоящей работе различия в реакции этих полисахаридов с белками (люциферазой, БСА и лактоферрином). Полученные результаты впервые показали возможность ингибирования люциферин-люциферазной реакции структурными полисахаридами клеток растений и водорослей, предположительно, в результате белково-полисахаридного взаимодействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-45-10026), с использованием оборудования, приобретенного на средства Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова и средств по регистрационной теме 121041500039-8.

## ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕССА ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ ДЛЯ КОМПЛЕКСОВ МЕТАЛЛОПОРФИРИНОВ С КУРКУМИНАМИ И АМИНОПАРТЕРФЕНИЛАМИ

В. С. Шершень, А. С. Старухин, Т. А. Павич

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

Химически связанные мультихрофорные комплексы с порфириновыми макроциклами является перспективными для применения в различных областях науки, техники и медицины. Известно, что порфириновые макроциклы применяются в качестве эффективных фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии онкологических заболеваний.

В данной работе были синтезированы следующие соединения: Zn-5,10,15,20-(тетра-4-аминофенил) порфирин (Zn-TAPP) и Zn-5,10,15,20-(тетра-N-куркумин-4-аминофенил) порфирин (Zn-TAPP-(Curc)<sub>4</sub>). Также были синтезированы комплексы Zn-5,10,15,20-(тетра-карбоксифенил)порфирин (Zn-TCPP) и комплекс Zn-TCPP с аминокпаратерфенилом (АТР) – Zn-TCPP-(АТР)<sub>4</sub>. Для синтезированных соединений были зарегистрированы спектры флуоресценции, возбуждения флуоресценции и фосфоресценции при температурах 290 и 77 К. Все спектральные измерения были выполнены на флуоресцентном спектрометре FluoroLog 3.

При возбуждении Zn-TAPP-(Curc)<sub>4</sub> в область полосы Core ( $\lambda_{\text{возб.}}=433$  нм) в спектрах флуоресценции проявляются полосы на 473 и 503 нм, которые относятся к свечению куркумина, а также полосы на 619 и 677 нм, соответствующие свечению Zn-TAPP. При создании комплекса Zn-TAPP-(Curc)<sub>4</sub> установлено, что в спектре флуоресценции Zn-TAPP-(Curc)<sub>4</sub> наблюдается батохромный сдвиг полос куркумина (около 10 нм) по сравнению со спектрами Zn-TAPP, тогда как в спектрах поглощения аналогичный сдвиг составляет около 5 нм. Следует отметить, что полоса поглощения куркумина проявляется около 420 нм и перекрывается с интенсивной полосой Core Zn-TAPP с максимумом около 433 нм. Показано, что при возбуждении Zn-TAPP-(Curc)<sub>4</sub> на длине волны около 433 нм в основном проявляется свечение Zn-TAPP. При возбуждении Zn-TAPP-(Curc)<sub>4</sub> излучением около 420 нм уже более интенсивным является свечение молекул куркумина. Сопоставление фотофизических данных для Zn-TAPP и Zn-TAPP-(Curc)<sub>4</sub> позволяет установить наличие индуктивно-резонансного переноса энергии с куркуминового фрагмента на порфириновый макроцикл с эффективностью не выше чем в 25% при фотовозбуждении бихромофора в области полосы поглощения куркумина.

При создании комплекса Zn-TCPP-(АТР)<sub>4</sub> спектральные характеристики Zn-TCPP изменяются. При возбуждении флуоресценции в области полосы поглощения АТР ( $\lambda_{\text{возб.}}=280$  нм) в спектре флуоресценции проявляются три полосы в интервале от 400 до 700 нм. При регистрации отдельно спектров для АТР и Zn-TCPP полоса в спектре около 430 нм относится к свечению АТР, тогда как полосы при 606 и 660 нм соответствуют свечению Zn-TCPP. Наличие полос флуоресценции при 606 и 660 нм указывает на наличие процесса переноса энергии между АТР и порфириновым хромофором с эффективностью около 20%.

## СИНТЕЗ И *IN SILICO* ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ ДВУХ 9-АЛКИЛ-6-ГИДРОКСИ-3Н-КСАНТЕН-3-ОНОВ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АФФИННЫХ ЛИГАНДОВ ЦИТОХРОМОВ P450

П. С. Яковец<sup>1,2</sup>, А. О. Колчина<sup>1</sup>, Н. В. Ерёмин<sup>1</sup>, Н. С. Фролова<sup>1</sup>, Я. В. Фалетров<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>НИИ физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь

Флуоресцирующие молекулярные зонды (ФМЗ) являются удобными средствами изучения белок-лигандных взаимодействий. Несмотря на большое разнообразие флуоресцентных веществ, исследованных и коммерциализированных как ФМЗ, по разным причинам синтез и выяснение возможности их взаимодействия с конкретной группой белков являются актуальными задачами и по сей день, особенно в связи с тенденцией импортозамещения. 9-замещенные производные 6-гидрокси-3н-ксантен-3-она, к которым относится и широко известный флуоресцеин, могут быть получены путем конденсации резорцина и соответствующей карбоновой кислоты при нагревании в присутствии серной кислоты, т.е. из доступных реагентов. С другой стороны, ферменты суперсемейства цитохромов P450 в связи с их способностью катализировать окисление различных ксенобиотиков и эндогенных соединений представляют собой объекты для поиска специфических и универсальных ФМЗ для целей эффективного скрининга ингибиторов или выявления фундаментальных структурно функциональных взаимодействий. Ранее нами были исследованы взаимодействия ряда цитохромов P450 с Нильским красным [1] и 22-NBD-холестерином [2], а также, с другой стороны, имеется опыт получения производного флуоресцеина [3].

В данной работе мы сообщаем о синтезе 9-метил- и 9-гептадецил-6-гидрокси-3н-ксантен-3-онов (Resac и ResC18, соответственно), а также *in silico* оценке их применимости как потенциальных субстратов цитохромов P450 бактерий. Так, вещества были получены по вышеуказанной схеме с умеренными выходами; получение целевых продуктов подтверждено по наличию у них максимума флуоресценции при 540 нм (зеленый) и масс-спектрометрически. Отметим, что структура Resac известна и соответствует коду CID292387 базы данных Pubchem, тогда как ResC18, согласно нашим данным, является оригинальным соединением. *In silico* виртуальный скрининг был организован с использованием программ Autodock Vina, MGL Tools и FYTdock, а также множества структур цитохромов P450 из базы данных PDB. Показано, что Resac способен аффинно связываться в активном центре P450 EryK из *Saccharopolyspora erythraea* (код структуры по базе PDB 2jjp; рассчитываемая программой Autodock Vina энергия связывания, E = -9 ккал/моль). Аналогично, показана способность ResC18 связываться вблизи гема цитохрома P450 CYP158A2 из *Streptomyces Coelicolor* (PDB 1T93) с такой же энергией.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ (№ Г.Р. 20210560).

### Библиографические ссылки

1. Evaluation of the fluorescent probes Nile Red and 25-NBD-cholesterol as substrates for steroid-converting oxidoreductases using pure enzymes and microorganisms / Y. V. Faletrov [et al.] // FEBS J. 2013. Vol. 280, iss. 13. P. 3109–3119.
2. 22-NBD-cholesterol as a novel fluorescent substrate for cholesterol-converting oxidoreductases / Y. V. Faletrov [et al.] // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2013. Vol. 134. P. 59–66
3. Флуоресцеина дигексаноат как профлуоресцентный маркер для мониторинга гидролитической деструкции полилактидных материалов / Д. А. Белов [и др.] // Журнал БГУ. Химия. 2022. Т. 1. С. 53–60.

# **КЛЕТОЧНАЯ БИОФИЗИКА**

# THE EFFECT OF POLYPHENOL EXTRACT ISOLATED FROM *KARELINIA CASPIA* PLANT ON MITO<sub>K</sub>ATP CHANNEL OF LIVER MITOCHONDRIA

N. N. Soliyev<sup>1</sup>, G. T. Abdullayeva<sup>2</sup>, G. H. Lutpillayev<sup>3</sup>, M. I. Asrarov<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Namangan State University. Namangan, Uzbekistan

<sup>2</sup>Tashkent state technical university named after Islam Karimov, DSc. Tashkent, Uzbekistan

<sup>3</sup>Institute of Bioorganic Chemistry of the UzRAS. Tashkent, Uzbekistan

<sup>4</sup>Institute of Biophysics and Biochemistry at the National University of Uzbekistan, DSc.  
Tashkent, Uzbekistan

**Introduction:** The modern approach to the study of the mechanism of action of new types of bioactive substances on the body and the evaluation of medicinal properties is based on screening studies conducted directly on the basis of *in vitro* experiments. In this regard, cellular mitochondria serve as a potential "target" and are considered a convenient object.

It is known that the functional activity of mitochondria mainly determines the vital activity of cells and the whole organism. Experimental studies have shown the importance of mitochondrial dysfunction in the development of various pathological conditions [1, 2]. One of the most studied mitochondrial factors that regulate the metabolic and functional activity of the cell is the mitochondrial ATP-dependent potassium channel (mitoK<sub>ATP</sub>) [3]. Taking into account that mitochondria is an organoid that mainly supplies the cell with energy, there are studies that show that one of the main factors determining mitochondrial dysfunction is the amount of ATP in the cell [4]. Approximately 80–90% of ATP in the cell is produced in the mitochondria during oxidative phosphorylation. The intensity of the process directly depends on the amount of oxygen, and a significant decrease in oxygen will gradually reduce the concentration of ATP [5]. These events lead to a decrease in the amount of energy in the cell and the formation of free radicals, reactive oxygen species [6, 7] (ROS), which derails energy metabolism in mitochondria and causes various pathological conditions such as ischemia and hypoxia.

Currently, treatment of various diseases with natural biologically active substances remains one of the most effective methods in the world. Biological natural compounds are usually isolated from medicinal plants. In the flora of Uzbekistan, it is possible to count some plants as an example which are famous for their medicinal properties (namatak, incense, mint, zupturum, saffron). Among them, BASs isolated from the natural growing (*Karelinia caspia*) plant in Uzbekistan are attracting the interest of many scientists due to their effective influence on various diseases. Scientists of the Institute of Bioorganic Chemistry of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan (Rahimov R.N., Mahmudov R.R. and Lutpillayev G.H.) have proven in experiments that the bioactive substances isolated from the white-headed plant (*Karelinia caspia*) are effective in neurodegenerative diseases. For this reason, the study of polyphenol extracts isolated from *Karelinia caspia* plant at the level of cells and cell organoids is an important factor in the identification of new types of bioactive substances.

**Methods and materials:** We used white male rats (180–220 g) during the experiments. Liver mitochondria were separated by differential centrifugation and protein content was determined by Lowry's method. Mitochondria were examined in an open cell in a spectrophotometer at a wavelength of 540 nm.

**Results and discussion:** The mitochondrial channel belongs to the family of ATP-dependent potassium channels, and all channels of this type are inhibited under the influence of a certain physiological concentration of ATP. Subsequently, the mitoK<sub>ATP</sub>-channel is considered as a potential "target" for pathogens and BASs. Dysfunction of the mitoK<sub>ATP</sub> channel in various pathologies can be corrected with pharmacological agents. During our experiments, the effect of 5, 10, 15, 20 µg/ml of PF-1 extracts isolated from the *Karelinia caspia* plant on the activity of mito K<sub>ATP</sub> channel of rat liver mitochondria was studied.

Addition of 200 µM of ATP to the incubation inhibited the permeability of the mitoK<sub>ATP</sub>-channel for K<sup>+</sup> ions by 76,8±2,07% compared to the control (no ATF added). Addition of PF-1 extract in the amount of 5 µg/ml to the cuvette had an activating effect on the mitoK<sub>ATP</sub>-channel, that is, it increased the permeability of the mitoK<sub>ATP</sub>-channel by 13.1±2.9% compared to the indicator inhibited by ATP. During the experiment, increasing the concentration of PF-1 extract, i.e. 10, 15, 20 µg/ml, increased the permeability of the mitoK<sub>ATP</sub>-channel by 29,4±3,8%, 47,7±3,1%, 60±2,08% respectively, compared to the index inhibited by ATP. So, from the above data, we can see the activating effect of PF-1 extract on mitoK<sub>ATP</sub> channel.

In conclusion, the fact that PF-1 extract isolated from *Karelinia caspia* plant has mitoK<sub>ATP</sub>-channel activating properties and this can be the basis for the production of hypoprotective and cardioprotective agents from PF-1 extract in the future.

## References

1. Пожилова Е. В., Новиков В. Е., Левченкова О. С. Регуляторная роль митохондриальной поры и возможности её фармакологической модуляции // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2014. Т. 12, № 3. С. 13–19.
2. Новиков В. Е. Возможности фармакологической нейропротекции при черепно-мозговой травме // *Психофармакология и биологическая наркология*. 2007. Т. 7, № 2. С. 1500–1509.
3. Пожилова Е. В., Новиков В. Е., Левченкова О. С. Митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал и его фармакологические модуляторы // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2016. Т. 14, № 1. С. 29–36.
4. Mitochondria and energetic depression in cell pathophysiology / E. Seppet [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* 2009. Vol. 10. P. 2252–2303.
5. Di Lisa F., Bernardi P. Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury // *Mol. Cell. Biochem.* 1998. Vol. 184. P. 379–391.
6. Free radical damage in ischemia-reperfusion injury: an obstacle in acute ischemic stroke after revascularization therapy/ M. S. Sun et al. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018. P. 3804979.
7. Chan P. H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001. Vol. 21. P. 2–14.

## ВЛИЯНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ НА ПРОДУКЦИЮ ГИДРОКСИЛЬНОГО РАДИКАЛА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

**К. И. Арзамазкина, А. Д. Герман, К. И. Губаревич, В. С. Мацкевич**

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь*

Среди активных форм кислорода гидроксильный радикал (НО<sup>•</sup>) обладает наивысшей реакционной способностью и является наиболее опасным для живых систем [1]. За счет высокого редокс-потенциала ( $E_0 = +2,32$  В, рН 7) гидроксильный радикал может окислять практически любое химическое соединение, включая ДНК, белки и липиды [2], опосредуя большинство цитотоксических эффектов в аэробных организмах. Один из путей образования НО<sup>•</sup> в живых системах – это восстановление H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, катализируемое ионами переходных металлов (Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup> и др.). В связи с этим, данная реакция часто используется для количественной оценки антиоксидантной способности растительных экстрактов и биологически активных веществ. Известно, что пул свободных аминокислот играет важную роль в росте и развитии растений, сигнальных явлениях, а также участвует в реакции растения на стресс [3]. Цель данной работы – оценить способность важнейших аминокислот влиять на продукцию НО<sup>•</sup> в условиях *in vitro* и *in vivo*.

С использованием ЭПР-спектрометрии было показано, что смесь 1 ммоль/л CuCl<sub>2</sub>, 1 ммоль/л L-аскорбата, 1 ммоль/л H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, рН 6 (Cu/a) с добавлением 100 ммоль/л диметилпирролиноксид (ДМПО) генерирует характерный четырехпиковый сигнал аддуктов ДМПО-НО<sup>•</sup>. Интенсивность данного ЭПР-сигнала была в 70 раз выше по сравнению с контролем (буферный раствор: 0,1 ммоль/л KCl, 0,1 ммоль/л CaCl<sub>2</sub>, 1 ммоль/л ТРИС, 2 ммоль/л МЕС). Было продемонстрировано, что интенсивность ЭПР-сигнала ДМПО-НО<sup>•</sup> значительно снижалась в присутствии свободных аминокислот (1 ммоль/л гистидина, аланина, аспарагина и пролина). Сами аминокислоты не модифицировали сигнал ДМПО, т.е. не обладали редокс-активностью. В случае добавления гистидина в Cu/a ЭПР-сигнал уменьшался приблизительно на 80%, аланина – на 95%, аспарагина – на 90%. Добавление пролина не воздействовало на ЭПР-сигнал, вызываемый аддуктами ДМПО-НО<sup>•</sup>. Результаты также были подтверждены с использованием эпифлуоресцентной микроскопии и зонда дигидроэтидиум в интактных корнях *Arabidopsis thaliana*, однако в данном случае эффекты были ниже. Таким образом, в работе было продемонстрировано, что свободные аминокислоты могут снижать ферментативную продукцию НО<sup>•</sup> в водных растворах и оказывать умеренное протекторное влияние на генерацию активных форм кислорода в интактных корнях растений при окислительном стрессе.

Работа была выполнена в рамках задания ГПНИ «Исследование функционального взаимодействия сигнально-регуляторных и антиоксидантных систем при стрессе с целью повышения общей стрессоустойчивости высших растений и создания новых биотехнологий» подпрограммы «Молекулярные и клеточные биотехнологии-2» государственной программы научных исследований «Биотехнологии-2» на 2021–2025 годы.

### Библиографические ссылки

1. *Halliwell H., Gutteridge J. M. C.* Free radicals in biology and medicine. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 2015. – 905 p.
2. *Sanna D., Fadda A.* Role of the hydroxyl radical-generating system in the estimation of the antioxidant activity of plant extracts by electron paramagnetic resonance (EPR) // *Molecules*. 2022. Vol. 27, iss. 14. P. 4560.
3. Editorial: amino acids in plants: regulation and functions in development and stress defense / M. Trovato [et al.] // *Front Plant Sci*. 2021. Vol. 12. P. 772810.

## ВОЗДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТОВ ИЗ *ARTEMISIA L.* НА ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

**Г. Х. Бабаева<sup>1</sup>, Н. А. Мусаев<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт Ботаники, Министерство науки и образования Азербайджанской  
Республики, г. Баку, Азербайджан*

<sup>2</sup>*Бакинский государственный университет, г. Баку, Азербайджан*

Азербайджан обладает чрезвычайно богатым разнообразием природных видов ценных растений. Однако возникший экологический дисбаланс, в частности из-за загрязнения окружающей среды, является серьезным поводом для настороженности в отношении фрагментации биоценоза и требует принятия неотложных мер. Несмотря на то, что сохранению биоразнообразия природного населения здесь придается большое значение, до сих пор наблюдается сокращение редких и эндемичных видов растений.

Среди ключевых угроз экосистемам одно из главных мест занимает загрязнение тяжелыми металлами (ТМ) [1, 2].

Вероятно, что биоактивные соединения растений являются модификаторами структурно-функциональных свойств плазматической мембраны клеток при контаминации ТМ. Целью настоящей работы было выявление защитного действия экстрактов из видов *Artemisia L.*, обладающих высоким адаптационным потенциалом к различным почвенным загрязнениям, на электрические свойства клеток водорослей при воздействии ТМ. Экстракты растений полыни выделяли из надземных частей *A. scoparia* и *A. szovitsiana* путем гидролиза ацетоном. С помощью микроэлектродной техники изучены закономерности изменения мембранного потенциала и мембранной резистентности плазмалеммы *Chara gymnophylla* и *Nitella flexilis* под влиянием Cd, Cu, Zn, Pb и экстрактов из видов *Artemisia*. Выявлен статистически достоверный гиперполяризующий эффект экстрактов *A. szovitsiana* и *A. scoparia* по отношению к Zn и Pb соответственно. Устранение экстрактами определяло снижение проводимости мембраны, вызванное Cd и Zn, а также повышение проводимости Cu. Хотя замечено, что высокая способность к накоплению ТМ видов *Artemisia L.* не связана с защитным действием их экстрактов на проводимость мембран, они могут быть потенциальным источником для поиска новых химических соединений, способных индуцировать устойчивость растений к стрессовым воздействиям.

### Библиографические ссылки

1. Исследование процессов миграции кадмия в системе почва-растение / Д. Д. Симеониди [и др.] // Геоэкология. 2023. Т. 12, № 138. С. 1–7.
2. Шергина О. В., Михайлова Т. А. Фитоэкстракция тяжелых металлов травянистыми растениями на техногенных почвах // Химия растительного сырья. 2022. № 4. С. 311–320.

# АРХИТЕКТУРА ХРОМАТИНА, ВЫЯВЛЕННАЯ В МЕХАНИЧЕСКИ ДЕФОРМИРОВАННЫХ ЯДРАХ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

**В. Ю. Байрамуков, Р. А. Ковалев, А. В. Анкудинов, Р. А. Пантина,  
С. В. Григорьев, Е. Ю. Варфоломеева**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

Долгое время полагали, что гетерохроматин находится в конденсированном состоянии, тогда как эухроматин “открыт” и деконденсирован. Недавние исследования показали, что наднуклеосомная структура состоит из гетерогенных кластеров (клатчей), компактизованных в ядерном пространстве. Транскрипционная активность моделирует упаковку хроматина, вызывая ее изменение в макромасштабе. В микромасштабе наблюдаются конденсированные домены транскрипционно активных областей размером 100–300 нм. В то же время, новые данные об архитектуре хроматина, полученные различными методами, чрезвычайно фрагментарны.

Нами предложен новый подход к визуализации внутриядерной архитектуры хроматина, основанный на механической деформации ядер клеток и исследовании полученной морфологии поверхности методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). В механически деформированных ядрах опухолевых клеток выявлены 100–300 нм домены суперспиральной ДНК, однородно распределенные в деформированном ядре. Показаны эффекты изменения морфологии доменов при воздействии на опухолевые клетки ингибитора транскрипции актиномицина Д, ингибиторов топоизомераз I и II, а также ингибиторов гистоновых деацетилаз. В деформированных ядрах нормальных клеток хроматин представлен в виде макроразмерных компартментов, базовой единицей которых являлись гетерогенные 15–40 нм нанодомены. Воздействие на ядра нормальных клеток ДНК-интеркалятора индуцировало торсионные напряжения ДНК, что привело к образованию ~ 100 нм доменов, аналогичных суперспиральным доменам ДНК в ядрах опухолевых клеток. Представленные данные указывают, что базовыми единицами хроматина являются конденсированные домены. На основании данных АСМ делается предположение о механических характеристиках транскрипционно активного и неактивного хроматина.

Работа поддержана грантом РНФ 20–12-00188.

## **Библиографические ссылки**

1. AFM imaging of the transcriptionally active chromatin in mammalian cells nuclei / V. Y. Bairamukov [et al.] // *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2022. Vol. 1866. P. 130234.
2. Пространственная модель организации хроматина в ядре биологической клетки по данным малоуглового рассеяния / Е. Г. Яшина [и др.] // *Письма в ЖЭТФ*. 2023. Т. 118, № 9–10. С. 776–781.
3. Alterations in the chromatin packaging, driven by transcriptional activity, revealed by AFM / V. Y. Bairamukov [et al.] // *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2024. Vol. 1868. P. 130568.

## КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЛИЦИНА И КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ НА МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ХАРОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

А. Н. Баланчук, Е. Н. Крытынская

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Наряду с природным глицином (Gly) существуют химические вещества, которые могут пополнять его содержание в водных источниках. Gly – распространенная аминокислота и часто используется в качестве модельной аминокислоты из-за ее низкой молекулярной массы [1]. Известный аналог Gly – глифосат (N-(фосфометил)-глицин), является действующим веществом десикантов, гербицидов (Буран Макс, Глифос, Пилараунд, Раундап) и коммерчески доступен в различных формах солей: изопропиламин, аммониевая, калиевая и тримезиевая соль. Несмотря на положительные оценки эффективности борьбы с сорняками экологические риски от его использования возрастают. Ряд наблюдений предполагает связь между обширным применением глифосата и неблагоприятными нецелевыми эффектами в агроэкосистемах. Исследование [2] демонстрирует, что до 70% глифосата попадает в водоемы в результате стока с полей и воздействует на водные экосистемы. В то же время карбоновые кислоты являются привлекательным биовозобновляемым химическим веществом с точки зрения их гибкости и возможности использования в качестве прекурсоров для различных промышленных химикатов, в составе косметической и фармацевтической продукции [3].

В этой связи интерес к мембранотропным свойствам Gly и его комбинациям возрастает. Мембранный потенциал – фундаментальный биофизический параметр, он влияет на многие клеточные процессы, начиная от высвобождения гормонов и заканчивая контролем клеточного цикла и формированием паттерна в тканях. Традиционный метод измерения мембранного потенциала – применение инвазивных электродов. При тщательном микроманипулировании нарушение мембраны минимально, и поэтому информация, полученная в результате этих измерений, представляет ситуацию *in vivo*. В работе с использованием стандартной микроэлектродной установки исследовано одиночное и комбинированное мембранотропное действия Gly. Добавление извне которого в концентрациях  $10^{-4}$  –  $10^{-2}$  М (на базе ИПВ) вызывало гиперполяризацию мембранного потенциала междуузлий *Nitella flexilis*. Эти отклонения в среднем составляли 3–14 мВ соответственно концентрациям  $10^{-4}$ – $10^{-2}$  М Gly. Комбинированное действие  $10^{-5}$  –  $10^{-3}$  М Gly и карбоновых кислот (салициловой, янтарной) индуцировало сдвиги мембранного потенциала в обратную сторону, деполяризации, на 7–68 мВ, соответственно концентрациям  $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М. Отмеченные в работе антогонизм действия Gly и карбоновых кислот, а также обратимость индуцированных кислотами мембранотропных эффектов, хорошо выражены при  $10^{-3}$  М Gly в среде. Полученные доза-эффект зависимости комбинированного действия кислот (центральных метаболитов растительной клетки и одного из наиболее распространенных видов азота) демонстрируют слабые различия с понижением уровня Gly до  $10^{-6}$  М.

### Библиографические ссылки

1. *Qin P. H., Zhang W., Lu W. C.* Theoretical study of hydrated  $\text{Ca}^{2+}$ -amino acids (glycine, threonine and phenylalanine) clusters // *Computational and Theoretical Chemistry*. 2013. Vol. 1021, P. 164–170.
2. Critical review of the effects of glyphosate exposure to the environment and humans through the food supply chain / V. Torretta [et al.] // *Sustainability*. 2018. Vol. 10, iss. 4. P. 950.
3. *Jarboe L. R., Royce L. A., Liu P.* Understanding biocatalyst inhibition by carboxylic acids // *Front Microbiol*. 2013. Vol. 4. P. 272.

## РЕГУЛЯЦИЯ ДИНАМИКИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ СЕТИ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

**А. В. Бережнов, Е. И. Федотова, К. А. Крицкая, А. Д. Надеев**

*Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»», Пушкино, Россия*

Митохондрии (МХ) играют ключевую роль в обеспечении клеток энергией и выполняют иные функции, такие как поддержание гомеостаза  $Ca^{2+}$ , активация процессов апоптоза и др. В клетках МХ связаны в митохондриальный ретикулум и подвергаются постоянным превращениям в процессах слияния и деления (митохондриальная динамика), внутриклеточного транспорта МХ, а также биогенеза МХ и их селективной аутофагии – митофагии (МФ). Митохондриальный гомеостаз поддерживается системой «контроля качества» МХ. Очевидно, что нарушения в указанных процессах (вследствие мутаций или при действии токсинов и др.) могут приводить к неблагоприятным последствиям, и, в конечном итоге к клеточной гибели. Одним из основных повреждающих факторов при этом является сверхпродукция активных форм кислорода дисфункциональными МХ. На организменном уровне проявлениями таких нарушений являются различные патологии. Среди них – нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона (БП) и др. Нормальное функционирование МХ критически важно для нейронов – клеток, которые имеют высокую потребность в энергии. Накопление патологических белковых агрегатов, характерных для ряда НДЗ, затрудняет аксональный транспорт МХ. Нарушения процессов деления МХ (fission) может приводить к затруднению их деградации по пути МФ. Известны мутации, приводящие к нарушению процессов МФ, деления/слияния и биогенеза МХ. Наличие таких мутаций сопряжено с развитием ряда НДЗ.

В нашей работе мы детально рассмотрели возможность умеренной активации МФ в токсических и наследственных моделях БП и оценили нейропротекторный потенциал такой активации. Было показано, что закисление цитозоля способно активировать МФ в модельных клетках. Причем кратковременное закисление вызывало усиление МФ не по «каноническому» PINK1/Parkin-зависимому пути, а по альтернативному. Кратковременное закисление лактатом или пируватом натрия обладало защитным эффектом в клеточных токсических моделях БП [1]. На уровне целого организма – в мышинной ротеноновой модели БП – защита от нейродегенерации была достигнута при периодическом кратковременном закислении, вызванном вдыханием воздуха с избытком  $CO_2$  (гиперкапния) [2].

Работа выполнена в рамках госзадания 075-01512-22-03 по теме: «Нейропротекторные препараты нового поколения» № 1022080100047-5-1.6.4.

### Библиографические ссылки

1. Lactate and pyruvate activate autophagy and mitophagy that protect cells in toxic model of Parkinson's disease / E. I. Fedotova [et al.] // Mol. Neurobiol. 2022. Vol. 59, iss. 1. P. 177–190.
2. «One Small Step for Mouse»: High  $CO_2$  inhalation as a new therapeutic strategy for Parkinson's disease / A. D. Nadeev [et al.] // Biomedicines. 2022. Vol. 10, iss. 11. P. 2832.

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ИЗМЕРЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ВОДОРОДНОГО ПОКАЗАТЕЛЯ К УСЛОВИЯМ МАКРОСКОПИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ДЛЯ ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК

**В. С. Бурдаков<sup>1,2</sup>, Н. А. Верлов<sup>1,2</sup>, Ан. А. Богданов<sup>2</sup>, А. А. Богданов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина,  
Российская Федерация

<sup>2</sup>ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический) им. Н.П. Напалкова», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Внутриклеточный рН (рН<sub>i</sub>) играет решающую роль в прогрессировании рака. Раковые клетки демонстрируют обратный градиент рН, характеризующийся внеклеточным ацидозом (низкий рН вне клетки) и внутриклеточным алкалозом (высокий рН внутри клетки). Обратный градиент рН является отличительной чертой метаболизма опухолевых клеток, позволяя им эффективно размножаться и метастазировать. Внутриклеточное подщелачивание достигается посредством различных механизмов, включая повышенную экспрессию и/или активацию переносчиков плазматической мембраны и белков оттока кислоты, которые контролируют гомеостаз рН. Внутриклеточное подщелачивание раковых клеток также связано с метаболической адаптацией, характеризующейся повышенным поглощением глюкозы и питательных веществ, а также выработкой молочной кислоты даже в аэробных условиях (эффектом Варбурга). Считается, что этот метаболический сдвиг является ключевым фактором в развитии и прогрессировании рака [1]. В представленной работе мы оптимизировали процедуру определения внутриклеточного водородного показателя с помощью клеточного красителя cFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidylester). Сам по себе, cFSE не является флуоресцентным, но обладает высокой проницаемостью через мембраны живых клеток, где от него эстеразами отщепляются ацетатные группы, в результате чего, он превращается во флуоресцентный carboxyfluorescein. С помощью автоматического мультифункционального планшетного сканера EnSpireMultilabelPlate Reader (PerkinElmer, США) мы исследовали флуоресцентные свойства соединения, получившегося в результате клеточного метаболизма cFSE (Bd-pharmigen, США). Было установлено, что оно имеет рН-зависимый и рН-независимый режимы флуоресценции при длинах волн возбуждения/эмиссии – 490 нм/520 нм и 440 нм/535 нм, соответственно. Таким образом, расчёт рН<sub>i</sub> проводили на базе оценки отношения уровней флуоресценции в двух режимах по предварительно построенной калибровочной кривой  $pH_i = f(I_{490/520}/I_{440/535})$ . Для определения рН<sub>i</sub> прикрепленных к поверхности 96-луночного планшета клеток, снятие сигналов флуоресценции производили в режиме чтения снизу, фокусное расстояние – 3 мм от основания планшета. Для каждого режима возбуждения/эмиссии сигнал снимали в 21 точке лунки, затем, усредняли и, по заранее построенной калибровочной кривой  $pH_i = f(I_{490/520}/I_{440/535})$ , возвращали значение рН<sub>i</sub> для клеток в этой лунке.

Описанный подход позволил нам наблюдать динамику изменения рН<sub>i</sub> при добавлении алкилирующего агента – гидрокарбоната в концентрации 40 мМ, для клеток линии карциномы толстой кишки мыши СТ26WT. Для клеток, культивируемых в нормальных условиях рН среды=7,2, рН<sub>i</sub> составил  $7,1 \pm 0,2$ , при смене среды на содержащую гидрокарбонат с рН=7,8, внутриклеточный рН<sub>i</sub> вырос до значений  $7,5 \pm 0,3$ .

#### **Библиографические ссылки**

1. Persi E., Duran-Frigola M., Damaghi M. et al. Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy // Nat. Commun. 2018. Vol. 9, iss. 1. P. 2997.

## ВЛИЯНИЕ «КОЛЛОСТ» ГЕЛЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

**А. В. Бутенко, С. В. Пинчук, И. Д. Волотовский**

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

В настоящее время для восстановления дефектов кожи, лечения ожогов и трофических язв применяются различные биомедицинские клеточные продукты (БМКП) на основе культивированных фибробластов дермы. В качестве носителя для клеток часто используют коллагеновый препарат «Коллост». «Коллост» гель (ЗАО «БиоФармхолдинг», Россия) получают из кожи телят, содержит коллаген I типа, который по биохимическому составу и структуре близок к человеческому коллагену с полностью сохраненной нативной структурой.

Целью данного исследования было изучение влияния времени инкубации фибробластов с «Коллост» гелем на метаболические и функционально-структурные показатели клеток.

Фибробласты дермы человека 3 пассажа инкубировали в 1% «Коллост» геле 30 мин, 1 и 4 ч при температуре +28 °С. Митохондриальный мембранный потенциал фибробластов измеряли с помощью флуоресцентного зонда тетраметилродамина метилового эфира перхлората (TMRM<sup>+</sup>EP). В качестве положительного контроля к суспензии клеток добавляли разобщитель дыхательной цепи митохондрий – карбонилцианид 4-(трифлуорометокси)фенилгидразона (FCCP). Внутриклеточное содержание ионизированного кальция определяли с использованием флуоресцентного зонда Fluo-3AM, активных форм кислорода – 2,7-дихлорфлуоресцеин ацетат зонда на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США). Микровязкость липидного бислоя мембран определяли по поляризации флуоресценции дифенилгексатриена.

При нормальном функционировании клетки в ней поддерживается оптимальный уровень параметров внутриклеточных систем. Митохондрии играют при этом ключевую роль как производители энергии. Важное значение имеют также кальциевый гомеостаз, определенное содержание в клетке активных форм кислорода и вязкость липидного бислоя мембран. Установлено, что инкубация фибробластов дермы в геле «Коллост» в течение 30 мин, 1 и 4 ч не приводила к изменению величины мембранного потенциала митохондрий, уровень которого соответствовал контролю, сохранялась жизнеспособность клеток. «Коллост» гель не влиял на микровязкость липидного бислоя мембран клеток, уровни содержания внутриклеточного кальция и активных форм кислорода в фибробластах.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что не изменяется структурно-функциональное состояние фибробластов иммобилизованных в «Коллост» геле в составе БМКП в течение 4 часов.

## БЕЛКИ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ МОДИФИЦИРУЮТ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ И БИОМЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

**Е. Ю. Варфоломеева<sup>1</sup>, Н. Д. Федорова<sup>1</sup>, В. С. Колмогоров<sup>2</sup>, С. В. Горелов<sup>1,3</sup>,  
А. В. Швецов<sup>1,3</sup>, П. В. Горелкин<sup>2</sup>, А. С. Ерофеев<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> НИЦ “Курчатовский институт” – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup> НИТУ МИСиС, Москва, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
Санкт-Петербург, Россия

Нейтрофилы – наиболее многочисленные клетки системы врожденного иммунитета, мигрирующие из русла крови в ткани к очагу воспаления. Эти клетки крайне чувствительны к составу плазмы крови и клеточному микроокружению. Мы предположили, что белки острой фазы воспаления, постоянно присутствующие в плазме крови и значительно меняющие концентрацию в течение патологических и некоторых физиологических процессов, могут быть вовлечены в модификацию функциональной активности нейтрофилов. То, что церулоплазмин и фибриноген могут влиять на способность нейтрофилов периферической крови к генерации активных форм кислорода, было продемонстрировано в наших более ранних работах [1, 2]. Мембранный характер взаимодействия церулоплазмينا и фибриногена с нейтрофилами был показан с использованием конфокальной микроскопии [3].

Целью данной работы было исследование влияния церулоплазмينا и фибриногена на подвижность нейтрофилов периферической крови и их биомеханические характеристики. Пробоподготовка осуществлялась в соответствии с ранее опубликованной нами методикой [4]. Оценка подвижности нейтрофилов производилась с использованием конфокального микроскопа. Показано, что взаимодействие нейтрофилов периферической крови с фибриногеном приводит к увеличению подвижности клеток на подложке относительно контрольного образца, в то время как взаимодействие с церулоплазмином снижает подвижность нейтрофилов. Мы впервые исследовали влияние церулоплазмينا и фибриногена на биомеханические характеристики нейтрофилов периферической крови с использованием сканирующей ион-проводящей микроскопии, совмещенной с конфокальной и зарегистрировали изменения в жёсткости мембраны нейтрофила при взаимодействии с церулоплазмином и фибриногеном.

### Библиографические ссылки

1. Ceruloplasmin decreases respiratory burst reaction during pregnancy / E. Y. Varfolomeeva [et al.] // Free Radic Res. 2016. Vol. 50, iss. 8. P. 909–919.

2. Вирусные инфекции влияют на функциональную активность нейтрофилов периферической крови / Н. Д. Федорова [и др.] // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2021. Т. 6, № 1. С. 115–123.

3. Влияние белков острой фазы воспаления на активность нейтрофилов периферической крови / Н. Д. Федорова [и др.] // Биофизика. 2023. Т. 68, № 3. С. 522–528.

4. The preparation of samples for studying neutrophils without their isolation / N. Fedorova [et al.] // Bio. Comm. 2023. Vol. 68, iss. 3. P. 145–150.

## МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ВЛИЯНИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОДУКТОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ФИБРОБЛАСТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ВОЗРАСТА

**Д. А. Войтенко<sup>1</sup>, Е. В. Ивановская<sup>2</sup>, М. А. Пантелеев<sup>1,2</sup>, А. Н. Свешникова<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия

Фибробласты являются основными продуцентами полисахарида межклеточного матрикса – гиалуроновой кислоты (ГК) [1]. Однако по мере старения фибробластов, их способность продуцировать ГК снижается, что корректируется подкожной инъекцией продуктов ГК. Для определения верной концентрации вводимого препарата необходимо учитывать возраст фибробластов, их способность продуцировать ГК, а также способность ГК и ее продуктов диффундировать и разлагаться в дерме [2].

Целью работы является экспериментальное и теоретическое исследование влияния ГК и ее продуктов на пролиферацию фибробластов и их продукцию коллагена и ГК в зависимости от возраста фибробластов. В рамках выполнения работы были поставлены эксперименты по пролиферации фибробластов человека в присутствии ГК и ее продуктов. Культивирование фибробластов проводилось стандартными методами в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и 37 °С. Оценка пролиферации проводилась методом МТТ-теста, либо с помощью гистологической окраски, также применялся стандартный протокол электрофореза для определения содержания коллагена. Теоретическое исследование проводилось путем математического моделирования в программе VCell путем интегрирования системы дифференциальных уравнений в частных производных.

В ходе работы была получена зависимость скорости деления фибробластов и экспрессии рецепторов ГК от концентрации продуктов ГК в зависимости от возраста фибробластов, отсюда оценили величину омолаживающего эффекта, оказываемого при введении препарата. Данная математическая модель может быть применена для расчетов концентраций инъекции препарата в зависимости от индивидуальных особенностей пациента.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-00057.

### Библиографические ссылки

1. Tokita Y., Okamoto A. Hydrolytic degradation of hyaluronic acid // Polymer Degradation and Stability. 1995. Vol. 48, iss. 2. P. 269–273.
2. Enzymic pathways of hyaluronan catabolism / L. Roden [et al.] // Ciba Found Symp. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 1989. – P. 60–76.

## ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКТИНОСОДЕРЖАЩИХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ФЕРРИТИНА К ОПУХОЛЕВЫМ КЛЕТКАМ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Ю. М. Гармаза<sup>1</sup>, О. Л. Пашкова<sup>1</sup>, В. К. Гаспарян<sup>2</sup>, А. В. Тамашевский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Институт биохимии им. Г. Бунятына НАН Республики Армения, Ереван, Армения

**Актуальность.** Для достижения наиболее эффективных терапевтических результатов при лечении опухолевых заболеваний представляется актуальным селективная доставка лекарственных препаратов в клетку, что позволяет снизить риски смертности во время химиотерапии. В последние годы растет интерес к разработке эффективных и селективных систем доставки на основе различных наноносителей. Известно, что полые белковые наночастицы занимают центральное место в качестве подобных систем доставки лекарственных препаратов в опухолевые клетки. Ферритины являются классическим типом белковых наночастиц благодаря хорошей биоразлагаемости, способности накапливаться в сильно васкуляризированных опухолях и интернализации опухолевыми клетками благодаря рецептору трансферрина 1. Также, такие системы должны быть снабжены мишень-узнающим компонентом и адресно высвободить химиопрепарат при связывании с клетками-мишенями. Известно, что одна из главных особенностей опухолевых клеток – это aberrантное гликозилирование, а типичными углеводными изменениями, которые отличают опухолевые клетки от нормальных, являются процессы фукозилирования и сиализации. **Целью данной работы** явилась оценка эффективности транспортных наносистем на основе апоферритина (молекула ферритина, лишённая железа, А) и лектинов, специфичных к фукозе (Tulipa, T) и сиаловой кислоте (WGA, W), при доставке лекарственных препаратов, используемых в клинике (дексаметазон (D) и винкристин (V)), к опухолевым клеткам крови человека.

**Результаты.** Исследовано влияние наноконструктов “апоферритин-WGA/Tulipa”, содержащих винкристин (AWV/ATV) и дексаметазон (AWD/ATD), на опухолевые клеточные линии крови человека IM-9 (B-лимфоциты)/MOLT-4 (T-лимфоциты) и периферические мононуклеары условно здоровых доноров *in vitro*. Установлено, что транспортные системы с винкристином (AWV/ATV) способны выступать в качестве апоптоз-индуцирующих факторов для опухолевых T-лимфоцитов, в то время как наноконструкты AWD, ATD и ATV эффективно снижают жизнеспособность патологических B-лимфоцитов, по сравнению с обычными лекарственными препаратами, при этом не затрагивая нормальные клетки. Выявлен сдвиг редокс-баланса в исследуемых клетках IM9/MOLT-4 при действии на них наноносителей на основе апоферритина и лектинов. Причем, все исследованные наноконструкты не оказывали влияния на структурно-функциональное состояние липидного бислоя в плазматических мембранах клеточных линий IM-9/MOLT-4.

**Заключение.** Таким образом, выявлены конъюгаты, которые обладают высокой эффективностью загрузки и свойствами контролируемого высвобождения лекарственного препарата. Сделано предположение, что процесс слияния транспортной системы на основе апоферритина с клеткой происходит по типичному пути эндоцитоза, опосредованного трансферриновым рецептором 1, а в дальнейшем развитии процессов апоптоза в клеточных линиях IM-9/MOLT-4 ключевая роль принадлежит дисбалансу “прооксиданты-антиоксиданты”.

Работа поддержана международным грантом ГКНТ Беларусь-Армения M21APMG-003 (2021–2023 гг.).

## ВЛИЯНИЕ $\text{Ni}^{2+}$ И Ni-ГИСТИДИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ НА РОСТ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК КОРНЕЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

**А. Д. Герман, К. И. Арзамазкина, К. И. Губаревич, С. А. Гордых, В. С. Мацкевич**

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь*

Для растений никель является важным микроэлементом, в первую очередь как компонент уреазы, глиоксалазы, некоторых супероксиддисмутаз и гидрогеназ [1]. Однако потребность растений в данном металле невысока, для большинства видов концентрации  $\text{Ni}^{2+}$  свыше 10–50 мкМ вызывают токсические эффекты. Избыток  $\text{Ni}^{2+}$  индуцирует целый комплекс токсических симптомов у растений, включая ингибирование прорастания семян, замедление роста, подавление фотосинтеза и клеточного дыхания, нарушение транспорта сахаров и микроэлементов, хлороз, некроз и увядание листьев [2]. Тем не менее, механизм влияния токсических уровней никеля на растения изучен недостаточно, в особенности, на чувствительных к избытку  $\text{Ni}^{2+}$  сельскохозяйственных культурах. Целью представленной работы было протестировать влияние  $\text{Ni}^{2+}$  и Ni-гистидиновых комплексов на рост и жизнеспособность клеток корней сельскохозяйственных растений на примере *Hordeum vulgare* и *Pisum sativum*. На первом этапе были проведены ростовые тесты в рулонных гидропонных системах. Было выявлено, что внесение  $\text{Ni}^{2+}$  ингибировало рост корней ячменя и гороха, начиная с концентрации 0,01 мМ (снижение роста на 30–40%), при 10 мМ  $\text{Ni}^{2+}$  рост корней полностью подавлялся. Добавление гистидина, в соотношении 1  $\text{Ni}^{2+}$ :2 гистидин, оказывало протекторное влияние, особенно заметное при 3 и 10 мМ  $\text{Ni}^{2+}$  (ингибирующий эффект снижался на 20–30%). Схожий эффект наблюдался и в случае изменения длины проростков. Накопление биомассы замедлялось при введении  $\text{Ni}^{2+}$  в концентрациях свыше 0,3 мМ (на 40–50%), при этом добавление гистидина также оказывало протекторное воздействие. При помощи эпифлуоресцентной микроскопии и зонда *Evans Blue* было показано, что 15 ч обработка  $\text{Ni}^{2+}$  вызывает гибель клеток корня, при этом зона деления является более чувствительной по сравнению с зоной всасывания. В случае ячменя при 10 мМ  $\text{Ni}^{2+}$  уровень повреждения корня в зоне деления возрастал в 3,4, а в зоне всасывания – в 2,5 раза по сравнению с контролем. В случае гороха жизнеспособность клеток снижалась в зоне деления в 3,1, а в зоне всасывания – в 2,3 раза. Для обеих культур добавление гистидина оказывало протекторное действие. Таким образом, было показано, что  $\text{Ni}^{2+}$  оказывал ингибиторное действие на ростовые процессы растений, особенно заметные в случае прироста длины и биомассы корней. Ячмень был более чувствителен к никелевому стрессу, чем горох, возможно, из-за высокой важности и обильности Ni-содержащего фермента уреазы у бобовых. Добавление гистидина оказывало протекторное действие на все протестированные морфо-физиологические параметры в условиях никелевого стресса, что, вероятно, обусловлено его способностью хелатировать  $\text{Ni}^{2+}$ , а также редокс-активностью образующихся комплексов, которые могут индуцировать синтез АФК и запускать адаптивные реакции в клетках растений.

Работа выполнена в рамках задания ГПНИ «Исследование функционального взаимодействия сигнально-регуляторных и антиоксидантных систем при стрессе с целью повышения общей стрессоустойчивости высших растений и создания новых биотехнологий».

### Библиографические ссылки

1. *Chen C., Huang D., Liu J.* Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects // *Clean*. 2009. Vol. 37. P. 304–313.
2. *Мацкевич В.С., Демидчик В.В.* Механизм трансмембранного и дальнего транспорта никеля в высших растениях // *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023. Т. 2. С. 4–29.

## ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА НИТРАТРЕДУКТАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ И ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ И ПРИ ДЕЙСТВИИ БИОРЕГУЛЯТОРОВ

Р. Г. Гончарик, Т. В. Самович, Т. Г. Курьянчик, Ю. В. Прищепчик, Н. В. Козел,  
Е. М. Кабачевская

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

Одним из наиболее значимых последствий глобального изменения климата является стресс от засухи, негативно влияющий на рост и урожайность большинства сельскохозяйственных культур. Все более частыми засухи становятся и в Беларуси. В этой связи актуальными являются исследования, направленные на разработку новых подходов к повышению устойчивости растений к дефициту воды в почве. Повышение устойчивости к засухе очень сложная задача для таких широко используемых культур как пшеница и ячмень, и необходимы углубленные и разноплановые исследования, чтобы лучше понять механизмы развития этого стресса и разработать пути защиты растений от него. Новые сорта пшеницы и ячменя, обладающие высокой степенью засухоустойчивости, получают путем скрещивания многообещающих засухоустойчивых генотипов и отбора среди их потомства. Засухоустойчивость определяется путем выявления признака, который может быть использован для измерения воздействия засухи на растения. Устойчивость к засухе носит полигенный характер. Следовательно, в любом эксперименте по засухе очень важно определить соответствующие признаки, которые являются засухоустойчивыми. Наряду с выявлением засухоустойчивых признаков, полезных для селекционного процесса, большой интерес и популярность в растениеводстве в последние годы приобретает поиск эффективных экологически чистых регуляторов роста и антистрессоров биологического происхождения. Среди многочисленных потенциальных биорегуляторов перспективными представляются препараты на основе предшественника биосинтеза хлорофилла аминокислоты (АЛК), а также суспензий микроводорослей различных видов.

Данное исследование посвящено изучению активности ключевого фермента азотного обмена растений – нитратредуктазы (НР), а также экспрессии кодирующего его гена, в зеленых проростках ячменя и пшеницы, выращенных в почве в условиях нормального или дефицитного водообеспечения, а также влияния биорегуляторов АЛК (водный раствор, 10 г/л) и суспензий микроводорослей *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acutus* на развитие наблюдаемых реакций.

Показано, что почвенная засуха (растения не поливали с момента посадки) существенно не изменяла на уровне транскрипции экспрессию гена НР, а внекорневая обработка растений суспензиями микроводорослей или раствором АЛК, не оказывала значимого влияния на данный параметр в клетках первого настоящего листа подвергнутых засухе проростков ячменя и пшеницы. Ферментативная активность НР значительно снижалась в условиях засухи, при этом внекорневая обработка изученными биорегуляторами не влияла на наблюдаемое подавление активности НР, что указывает на высокую чувствительность азотного обмена в листьях проростков ячменя и пшеницы к засухе на посттранскрипционном уровне, а также на то, что биорегуляторы роста растений не изменяют эту чувствительность. Выявленные закономерности свидетельствуют о важности снижения анаболических процессов в растениях в условиях стресса и направлении ресурсов растительных клеток на адаптацию к дефициту воды в почве. Тот факт, что снижается только активность НР, но не уровень накопления ее мРНК, указывает на то, что в растениях в условиях стресса засухи сохраняется запасной пул мРНК, позволяющий ему быстро восстановить уровень азотного обмена до дострессовых значений при улучшении условий водообеспечения.

## РОЛЬ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ GORK И АНИОННЫХ КАНАЛОВ ALMT В ОТТОКЕ ЭЛЕКТРОЛИТОВ ИЗ КЛЕТОК КОРНЯ *ARABIDOPSIS THALIANA* L.

**П. В. Гриусевич, Ю. В. Толкачева, Т. Д. Михалева, С. А. Кошель,  
А. Э. Королевич, В. В. Демидчик**

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Отток электролитов из тканей растений – физиологическая реакция, наблюдающаяся в ходе стресса, а также в ряде процессов нормальной физиологии. В биологии стресса утечка электролитов, в том числе ее интенсивность и обратимость, рассматривается в качестве генерализованного индикатора устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. Несмотря на большое количество работ по выходу электролитов из тканей растений, его природа остается малопонятной. Неясно, каковы первичные мембранные механизмы данного явления и не идентифицированы молекулярные мишени, запускающие выход электролитов из клеток. В последние годы показано, что при умеренном стрессе отток электролитов – явление обратимое и блокируется ингибиторами ионных каналов, в частности, калиевых и неселективных катионных каналов: ТЭА<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> и др., то есть регулируемое и не приводящее к гибели клеток растения. Таким образом, вероятно, существуют мембранные механизмы, его опосредующие. Стресс-индуцированный выход электролитов из растительных клеток практически всегда сопровождается генерацией АФК. Данные явления регистрируются одновременно и практически сразу с момента воздействия стрессоров, приводя к потере K<sup>+</sup> и выходу анионов, а также к активации редокс-зависимых сигнальных процессов. В плазматической мембране клеток корня *A. thaliana* доминирующими ионными каналами являются редокс-регулируемый K<sup>+</sup>-канал наружного выпрямления Guard cell Outward-Rectifying K<sup>+</sup> channel (GORK) и ALuminum-activated Malate Transporter 1 (ALMT1). Представленная работа была направлена на выявление и детальное изучение механизма оттока электролитов при стрессе на уровне отдельных ион-транспортных механизмов плазматической мембраны клеток корня высших растений. С использованием электрофизиологических подходов и нокаутных растений, лишенных ионных каналов GORK и ALMT1, впервые показано, что АФК, которые являются неотъемлемой частью стрессовой реакции у высших растений, активируют K<sup>+</sup>-каналы GORK посредством реагирования с редокс-чувствительной группой Цис-151. При этом значительно возрастает выходящий ток K<sup>+</sup>, являющийся основой массивного оттока (утечки) данного катиона при стрессовых воздействиях. Показано, что выход анионов для уравнивания зарядов на плазматической мембране при оттоке K<sup>+</sup> опосредуется анионными каналами ALMT1. Продемонстрировано, что канал ALMT1 способен проводить токи малата, аскорбата и цитрата и плохо проницаем для фумарата, пропионата, глюконата и ионов хлора.

## СОКРАТИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ: РОЛЬ ОБЪЕМ-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИОННОГО ТРАНСПОРТА

**С. В. Гусакова, В. С. Гусакова, М. А. Пшемьский, Л. В. Смаглий, Т. Н. Зайцева**

*ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия*

Исследование проводили на сегментах легочной артерии крыс линии Wistar. Для исследования объем-чувствительного ионного транспорта использовали неселективные блокаторы хлорного транспорта SITS и DIDS, селективный блокатор объем-зависимых хлорных каналов DCPIB, блокатор  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  котранспорта буметанид. Сокращения гладкомышечных клеток (ГМК) в моделях изменения объема получали путем помещения сегментов в гиперосмотический раствор, содержащий 120 мМ сахарозы (гиперосмотически-индуцированное сокращение), гипоосмотический раствор, содержащий сниженную концентрацию NaCl (гипоосмотически-индуцированное сокращение) и сменой гипоосмотической среды на нормоосмотическую (изоосмотически-индуцированное сокращение). Сократительную активность сегментов оценивали методом механографии с использованием четырехканальной механографической установки Myobath II и аппаратно-программного обеспечения LAB-TRAX-4/16 (World Precision Instruments, Германия).

Инкубация сегментов сосудов легочной артерии в гипоосмотической среде приводила к развитию транзиторного сократительного ответа легочной артерии. Восстановление ионного состава среды после длительной инкубации сосудов в гипоосмотическом растворе также приводило к транзиторному сокращению сегментов сосудов. Тогда как при аппликации 120 мМ сахарозы наблюдалось поддерживаемое сокращение.

На фоне DIDS, DCPIB и буметанида происходило снижение амплитуды гипоосмотически-индуцированной сократительной реакции гладкомышечных сегментов легочной артерии. Предобработка неселективным блокатором SITS не приводила к значимым изменениям гипоосмотически-индуцированной сократительной активности ГМК легочной артерии.

На фоне действия как SITS, так и DIDS и DCPIB наблюдалось снижение амплитуды изоосмотически-индуцированного сократительного ответа. Тогда как буметанид вызывал увеличение амплитуды изоосмотически-индуцированного сокращения, а также устранял транзиторный характер сократительного ответа.

Гиперосмотически-индуцированный сократительный ответ легочной артерии не изменялся на фоне SITS и DIDS, однако на фоне действия DCPIB амплитуда гиперосмотически-индуцированного сокращения снижалась. Предобработка буметанидом приводила к повышению амплитуды гиперосмотически-индуцированного сокращения.

Выявлено, что буметанид повышает амплитуду гиперосмотически-индуцированного сокращения, снижает амплитуду гипоосмотически-индуцированного сокращения, тогда как при изоосмотической стрижки клеток буметанид увеличивает амплитуду и устраняет транзиторный характер сократительного ответа. Блокаторы хлорных каналов SITS, DIDS и DCPIB снижают амплитуду сокращений в моделях изменения объема клеток, селективный блокатор объем-зависимых хлорных каналов DCPIB оказывает более выраженный эффект.

## СИСТЕМА ВИЗУАЛИЗАЦИИ И АНАЛИЗА ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ СРЕЗОВ ГИППОКАМПА *IN VITRO*

А. А. Денисов<sup>1,2</sup>, А. В. Никифоров<sup>1</sup>, Ф. Ю. Снопич<sup>1</sup>, М. В. Варивончик<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Регистрация электрической активности нейронов является одним из основных методов исследований биофизических основ межнейронной коммуникации, механизмов функционирования мозга и нервной системы. В последние годы в этой области произошел значительный прогресс в связи с развитием современных технологий и разработкой новых методик исследования на их основе. В лаборатории клеточной инженерии и нанобиотехнологий кафедры биофизики БГУ совместно с лабораторией нейрофизиологии Института физиологии НАН Беларуси разработан комплекс оборудования и методик для исследования биофизических и нейрофизиологических процессов в срезах мозга крысы *in vitro*. Для регистрации получаемых экспериментальных данных, их обработки и визуализации в режиме онлайн и оффлайн создан ряд программных решений.

В разработанной установке обработка, визуализация и запись регистрируемых сигналов, а также генерация последовательностей стимулирующих импульсов осуществляется под управлением микрокомпьютера Raspberry Pi 4. Графический интерфейс системы регистрации создан с использованием пакета Vokeh на языке Python. Программный интерфейс пользователя в режиме онлайн позволяет выводить на экран форму популяционных спайков (ПС) и полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (пВПСП), производить расчет их амплитуды и выводить график зависимости амплитуды ПС и пВПСП от времени в ходе эксперимента. Имплементирован ряд функций по фильтрации сигнала – устранение артефактов стимуляции и сетевой наводки, что позволяет повысить точность расчета амплитуды ПС и пВПСП в режиме онлайн. В интерфейсе реализована возможность проведения ряда экспериментов – построение зависимости амплитуды ПС и пВПСП от амплитуды стимуляции, получение зависимости амплитуды фасилитации (кратковременной синаптической пластичности) от интервала времени между импульсами при парной стимуляции, исследование влияния нейромодулирующих воздействий, индуцирование длительной потенциации – формы синаптической пластичности, вовлеченной в формирование памяти и процессы обучения. Также реализован режим виртуального эксперимента – визуализация процесса получения графиков зависимостей на основе записанных ранее экспериментальных данных, что может применяться как в презентационных целях, так и в учебном процессе.

Для экспериментов по регистрации электрической активности нейронов характерна значительная продолжительность (несколько часов), что сопряжено с большим объемом получаемых экспериментальных данных при многоканальной регистрации. Для их анализа реализован отдельный программный модуль с применением пакета PyQT, который позволяет в режиме оффлайн производить быстрый просмотр и визуализацию записанных данных, а также проводить дополнительную обработку с использованием возможностей высокопроизводительных вычислительных систем.

Использование современной библиотеки интерактивной визуализации Vokeh позволяет проводить гибкую настройку и модификацию возможностей разработанных программ. Так, модуль Vokeh в данном случае функционирует в качестве веб-сервера, а графический интерфейс запускается в веб-браузере, что позволяет производить удаленное подключение к установке, в том числе, с применением мобильных устройств. Данные особенности разработки открывают возможности для создания новых типов лабораторных работ с высокой степенью интерактивности.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЛАВОНОИДОВ С МИТОХОНДРИАЛЬНЫМИ, ЭРИТРОЦИТАРНЫМИ И ИСКУССТВЕННЫМИ МЕМБРАНАМИ

**И. Б. Заводник, А. Г. Вейко, Т. А. Коваленя, Т. В. Ильич, А. И. Савко,  
Е. А. Лапшина**

*Гродненский государственный университет им. Янки Купалы,  
Гродно, Беларусь*

Флавоноиды, вторичные метаболиты растений, представляют наиболее распространенную гетерогенную группу фитохимических веществ. Флавоноиды имеют общий углеродный скелет С6-С3-С6 (бензо-γ-пирон), в то же время существует широкий спектр структурного разнообразия флавоноидов, что связано с различной степени гидроксирования, метоксилирования, гликозилирования, глюкуронирования, обладают высокой физиологической и биохимической активностью как в растениях, их синтезирующих, так и в тканях животных и человека. На сегодняшний день идентифицировано более 10 000 соединений, принадлежащих семейству флавоноидов. Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование антиоксидантной активности и регуляторных свойств ряда флавоноидов, принадлежащих различным классам, флавонолов физетина (fisetin, 7,3',4'-flavon-3-ol) и кемпферола (kaempferol, 3,4',5,7-tetrahydroxyflavone), флавонола апигенина (apigenin, 4',5,7-trihydroxyflavone), флаванона нарингенина (naringenin, 4',5,7-trihydroxyflavan-4-one) и его гликозида нарингина (naringin, flavanone-7-O-glycoside), используя в качестве объектов воздействия флавоноидов митохондрии печени и эритроциты крыс, липосомальные мембраны. С помощью флуоресцентных зондов мы показали, что флавоноиды (5–25 мкМ) уменьшали микротекучесть липидного бислоя липосомальных мембран на различной глубине, одновременно повышали степень гидратации мембран в области полярных группировок, увеличивали гетерогенность упаковки липидного бислоя. Флавоноиды в диапазоне концентраций 2,5–25 мкМ дозозависимо предотвращали окислительные повреждения эритроцитов: накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окисление глутатиона GSH, индуцируемое терт-бутил гидропероксидом, аналогом гидроперекисей липидов, эффективно восстанавливали стабильный DPPH радикал в бесклеточной системе, предотвращали лизис эритроцитов, индуцируемый гипохлорной (хлорноватистой) кислотой. Оцененные нами значения IC<sub>50</sub> ингибирования флавоноидами на 50% процесса ПОЛ в мембранах эритроцитов, равны, соответственно, 3,9±1,0 мкМ в случае физетина, 6,5±2,3 мкМ в случае кемпферола, 8,1±2,6 мкМ в случае апигенина, 37,8±4,4 мкМ и 47,3±5,6 мкМ в случае нарингина. Антиоксидантная эффективность уменьшалась в ряду физетин > кемпферол = апигенин > нарингенин > нарингин. Антиоксидантный эффект флавоноидов был значительно выше в мембранных структурах по сравнению с цитоплазматической клеткой. Флавоноиды (8–16 мкМ) эффективно ингибировали респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс и, за исключением кемпферола, стимулировали Ca<sup>2+</sup>-индуцируемую диссипацию мембранного потенциала митохондрий. Циклоспорин А и Рутений красный ингибировали стимулируемую флавоноидами Ca<sup>2+</sup>-зависимую деполяризацию мембран митохондрий, что указывает на участие в эффекте флавоноидов митохондриального кальциевого унипортера и процесса открытия пор высокой проницаемости. В экспериментальной модели диабетической кардиомиопатии у крыс флавоноид нарингин (40 мг/кг) предотвращал развитие митохондриальной дисфункции кардиомиоцитов. Флавоноиды как редокс-активные соединения, обладающие антиоксидантными свойствами и способные регулировать митохондриальный потенциал и респираторную активность, предотвращать митохондриальный окислительный стресс, можно рассматривать в качестве эффективных фармакологических агентов или нутрицевтиков.

# БИОМИНЕРАЛИЗАЦИЯ CaCO<sub>3</sub>: ЭВОЛЮЦИЯ СТРУКТУРЫ ОСАДКОВ И ЗАВИСИМОСТЬ ИХ СТРУКТУРНЫХ ПАРАМЕТРОВ ОТ СОСТАВА БАКТЕРИАЛЬНОГО МАТРИКСА

Л. А. Иванова<sup>1,2</sup>, Г. П. Копица<sup>1</sup>, А. Д. Япрынцев<sup>3</sup>, А. Е. Баранчиков<sup>3</sup>,  
Д. В. Лебедев<sup>1</sup>, А. А. Кульминская<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ПИЯФ им. Б.П. Константинова НИЦ “Курчатовский институт”, Гатчина, Россия

<sup>2</sup>Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>3</sup>Институт общей и неорганической химии им. Курнакова РАН, Москва, Россия

Биоминерализация (БМ) – явление образования минералов живыми организмами – широко распространено в природе. Так во время метаболических реакций с окружающей средой бактерии с уреалитической активностью могут вызывать осаждение CaCO<sub>3</sub> в почве и горных породах, в то время как другие подобные микроорганизмы могут осаждают CaCO<sub>3</sub> с образованием инкрустированных биопленок, которые закупоривают мочевые катетеры, создавая серьезные проблемы в клинической практике [1]. Исследования механизмов БМ важны как для поиска путей ее торможения при решении клинических задач, так и для ее стимулирования при создании новых экологических инженерных технологий [2]. Известно, что кристаллизация CaCO<sub>3</sub> протекает в несколько стадий, в ходе которых аморфная (АКК) фаза последовательно модифицируется в ватерит, затем в кальцит/аргонит, как показано методом FTIR в экспериментах *in situ* без участия бактерий [3]. Однако, можно предположить, что кристаллическая и надмолекулярная структура CaCO<sub>3</sub>, осажденного в системе, состоящей не только из бактериальных клеток, но и синтезируемого ими внеклеточного матрикса (ВКМ), может существенно отличаться от системы абиогенной. В нашей работе методами SANS, SAXS, FTIR, XRD, SEM и конфокальной микроскопии изучена эволюция структуры осадков CaCO<sub>3</sub>, образующихся при биоинтерализации, индуцированной планктонной культурой *Bacillus cereus*. Биоинтералы, содержащие аморфный CaCO<sub>3</sub> в виде фрактальных агрегатов, обнаруживались уже через 24 ч роста бактерий на среде, богатой Ca<sup>2+</sup> и мочевиной. В осадке были обнаружены фрактальные кластеры размером в сотни ангстрем и фрактальной размерностью около 2,7. Трансформация полиморфов CaCO<sub>3</sub> проходила по пути АКК-ватерит-кальцит в течение 14 суток и сопровождалась значительным увеличением характерных размеров фрактальных кластеров, а также уплотнением их структуры. Совместная локализация преципитатов CaCO<sub>3</sub> с компонентами ВКМ (вДНК) была показана с помощью конфокальной микроскопии. Было показано влияние ДНК-компоненты ВКМ на структуру осажденных биоинтералов в системе с бактериальными клетками на надмолекулярном уровне (SAXS) и в полиморфном составе осадка (FTIR), такое влияние отсутствовало в бесклеточной системе.

## Библиографические ссылки

1. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* in catheter-associated urinary tract infections / F. Yuan [et al.] // *Urologia internationalis*. 2021. Vol. 105, iss. 5–6. P. 354–361.
2. Dhami N. K., Reddy M. S., Mukherjee A. Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages // *Front Microbiol*. 2014. Vol. 5. P. 93118.
3. Cheng M., Sun S., Wu P. Microdynamic changes of moisture-induced crystallization of amorphous calcium carbonate revealed via *in situ* FTIR spectroscopy // *Phys. Chem*. 2019. Vol. 21, iss. 39. P. 21882–21889.

## ОСОБЕННОСТИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ ТОЛУИДИНОВОГО СИНЕГО В ГИДРОГЕЛЕВОЙ СРЕДЕ, СОДЕРЖАЩЕЙ ЛЕЙКОЦИТЫ

**М. М. Игнатъева, В. Г. Сергеев, И. А. Черенков**

*ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия*

Электрохимические методы широко применяются для исследования клеток. Представляют интерес биоэлектрохимические модели с иммобилизованными в гидрогеле клетками и свободно диффундирующим медиатором, способным как к биокаталитическим, так и электрохимическим окислительно-восстановительным превращениям, что обеспечивает сопряжение клеточной активности с электрохимическим сигналом. Толуидиновый синий (ТС) как медиатор ранее рассмотрен нами в бесклеточных гидрогелевых средах, содержащих ферменты. Он продемонстрировал хорошо воспроизводимое электрохимическое поведение, контролируемое диффузией и эффективное сопряжение пероксидазного катализа с электродными процессами [1, 2].

Целью настоящей работы стал анализ возможности применения ТС в биоэлектрохимических моделях с лейкоцитами, иммобилизованными в гидрогеле.

Для моделирования гидрогелевой среды использовали альгинат натрия в виде 3% раствора на фосфатно-солевом буфере. На рабочий электрод наносили 1 мкл гелеобразователя (контроль) или гелеобразователь с клеточной взвесью (клетки перитонельного смыва мыши) (опыт). Гели полимеризовали раствором хлорида кальция непосредственно на поверхности рабочего электрода. Измерения проводили методом циклической вольтамперометрии (ЦВА) (диапазон  $-450 \dots 0$  мВ (относительно Ag/AgCl)) со скоростью развертки 90 мВ/с. Для оценки диффузии ТС измерения проводились в течение 45 мин с интервалом 5 мин. Концентрация ТС в экспериментах составляла 0,1 мМ.

Диффузия красителя в среде гидрогеля альгината приводила к нарастанию катодных и анодных пиковых токов в ходе эксперимента. В присутствии клеток нарастание токов было более заметным, чем в бесклеточной системе, что может свидетельствовать об участии лейкоцитов в окислительно-восстановительных превращениях ТС. На 45-й минуте эксперимента достоверные отличия выявлены для значений силы тока соответствующих восстановлению ТС, что можно трактовать как накопление у электродной поверхности окисленной формы ТС, обусловленное биокатализом. Лейкоциты выступили в качестве окислителя ТС, что повлияло на характер вольтамперных кривых. Сходный эффект ранее был обнаружен нами при пероксидажном окислении ТС на электроде [1]. Степень выраженности каталитического эффекта на вольтамперограммах ЦВА в присутствии лейкоцитов была заметно ниже, чем при использовании пероксидазы.

Таким образом, использование ТС в качестве электрохимического медиатора в системе «лейкоциты-альгинатный гидрогель» позволяет оценить диффузионные свойства гидрогелевой среды и окислительно-восстановительную активность клеток в отношении ТС.

### **Библиографические ссылки**

1. Биоэлектрохимическое моделирование диффузии толуидинового синего в гидрогеле в присутствии пероксидазы и трипсина / И. А. Черенков [и др.] // Биофизика. 2021. Т. 66, № 5. С. 865–870.

2. Диффузия толуидинового синего в альгинат-желатиновом гидрогеле при воздействии пепсина / И. А. Черенков [и др.] // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2020. Т. 5, № 3. С. 481–485.

## ВЛИЯНИЕ НИТРАТА КОБАЛЬТА *IN VIVO* НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГОМОГЕНАТОВ *SPIRULINA PLATENSIS*

И. А. Ильючик, В. Н. Никандров, В. А. Новикова

Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь

Спирулина (*Spirulina platensis*) – филаментная планктонная цианобактерия, обладающая высокой адсорбирующей способностью, в том числе и вредных веществ. Благодаря уникальному составу (белки, витамины, микроэлементы) она широко используется в различных отраслях народного хозяйства.

Кобальт является истинным биоэлементом, выполняющим ряд специфических функций: участвует во многих ферментативных реакциях, входит в состав цианкобаламина, кобамидных коэнзимов, метилкорриноидов. В литературе практически отсутствуют данные о влиянии кобальта питательной среды на протеолитическую активность спирулины.

Цель работы – раскрыть особенности влияния уровня  $\text{Co}^{2+}$  в питательной среде на протеолитическую активность *Spirulina platensis* штамма IBCE S-2.

Водоросль выращивали в среде Заррука [1] с добавлением  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  в концентрациях  $1,5 \cdot 10^{-11}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-9}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-7}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-3}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-1}$  М. Контрольный вариант № 1 солей кобальта не содержал, в контроле № 2 (среда Зарука) концентрация  $\text{Co}^{2+}$  составляла  $1,5 \cdot 10^{-7}$  М. На 7-е и 11-е сут культивирования отбирали аликвоты биомассы цианобактерии 0,25 г и гомогенизировали в 0,5 мл бидистиллированной воды. Протеолитическую активность гомогената определяли при pH 7,4, 9,0 и 12,0 методом лизиса белок-агаровых пластин по лизису желатина или казеина по Гаммерстену. В качестве растворителей использовали 0,05 М трис-НСI-буфер и 0,2 М раствор NaCl-KCl. Исследования выполнены четырехкратно.

Установлено, что во всех вариантах среды гомогенаты *S. platensis* способны расщеплять казеин лишь при pH 12,0, а желатин при pH 7,4, 9,0 и 12,0.

Уровень желатинолитической активности при избранных величинах pH составил: pH 12,0 > 9,0 > 7,4. На 11-е сут в сравнении с 7-ми сут в контроле № 1 она снижалась на 23% (pH 7,4) и 14% (pH 12,0), а в контроле № 2 – на 20% (pH 7,4) и 17% (pH 9,0) соответственно. При концентрациях  $\text{Co}^{2+}$   $1,5 \cdot 10^{-9}$  М и  $1,5 \cdot 10^{-11}$  М в данный период времени наблюдался рост этой активности в средах на 14–67% (максимум – 67% при 12,0) и 34–78% (максимум – 78% при 9,0). В сравнении с контролем № 1 на 7-е сут лизис желатина в вариантах с эффектом угнетался на 22–92% ( $P \leq 0,05$ ), за исключением концентраций  $1,5 \cdot 10^{-7}$  М при pH 9,0 (активность выросла на 21%) и  $1,5 \cdot 10^{-11}$  М при pH 12,0 (прирост составил 17%). На 11-е сут при концентрации  $\text{Co}^{2+}$   $1,5 \cdot 10^{-11}$  М в сравнении с контролем № 1 желатинолитическая активность возросла при pH 7,4, 9,0 и 12,0 на 31, 55 и 38% соответственно.

Казеинолитическая активность на 11-е сут увеличивалась во всех исследуемых вариантах в сравнении с 7-ми сут. Так, в сравнении с контролем № 1 в контроле № 2 эта активность увеличилась на 16%, а при концентрациях  $\text{Co}^{2+}$   $1,5 \cdot 10^{-9}$  М и  $1,5 \cdot 10^{-11}$  М на 35% и 20% соответственно. В сравнении с контролем № 1 на 7-е и 11-е сут казеинолитическая активность при концентрации  $\text{Co}^{2+}$   $1,5 \cdot 10^{-11}$  М была выше на 34% и 51%, тогда как при концентрации соли кобальта  $1,5 \cdot 10^{-9}$  М лишь на 11-е сут – на 29%.

### Библиографические ссылки

1. Геворгуз Р. Г., Меметиаева О. А., Романова Д. Ю. Методика выделения *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordstedt) Gomont в альгологически чистую культуру // Вопросы современной альгологии. 2018. № 1. С. 16.

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГИПОХЛОРИТА НАТРИЯ

**З. Б. Квачева<sup>1</sup>, Г. Н. Семенкова<sup>2</sup>, Н. В. Осташева<sup>2</sup>, А. Г. Полешко<sup>1</sup>,  
И. Б. Василевич<sup>1</sup>, С. В. Пинчук<sup>1</sup>**

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

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

Хлорноватистая кислота (НОСl) является сильным окислителем, предшественником свободных радикалов, важным участником бактерицидной системы, а также регулятором процессов метаболизма. В норме концентрация НОСl в клетках невысока, однако при воспалении происходит активация нейтрофилов и локальная продукция хлорноватистой кислоты миелопероксидазой этих клеток возрастает в десятки раз, что приводит к индуцированию оксидативного стресса. Усиление образования НОСl активированными нейтрофилами при воспалительных заболеваниях кожи может существенно влиять на структуру и метаболизм фибробластов, и, как следствие, на состояние кожи. Целью работы явилось исследование влияния гипохлорита натрия (NaOCl) в микромолярных концентрациях на морфофункциональные характеристики дермальных фибробластов *in vitro*.

Культуры фибробластов готовили методом эксплантов из биоптата кожи донора с использованием ростовой среды DMEM/F12 с 10% телячьей эмбриональной сывороткой. Объектом исследования была культура фибробластов 2–3 пассажей в логарифмической фазе роста. Культуры инкубировали в течение 24 ч в термостате при +37 °С с NaOCl (10 – 100 мкМ). Использовали методы фазово-контрастной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Пролиферативную активность клеток оценивали по приросту клеток в среде культивирования. Генерацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> регистрировали с помощью флуоресцентного зонда H<sub>2</sub>DCFDA. Апоптоз клеток анализировали с помощью набора Annexin V-FITC. Уровень несвязанных ионов цитозольного кальция измеряли с помощью флуоресцентного зонда Fluo-3 AM.

Установлено, что при культивировании в течение 24 ч фибробластов с NaOCl в концентрации 10, 20 и 30 мкМ снижается пролиферативная активность в 1,3; 1,6 и 1,9 раза соответственно. Монослой и форма клеток при этом сохраняются. При культивировании фибробластов с NaOCl в концентрации 50 мкМ и более гипохлорит натрия оказывает цитотоксическое действие: вызывает цитодеструкцию, изменяет адгезивность клеток. На начальных стадиях воздействия гипохлорита (30 мин инкубации) выявлено кратковременное повышение образования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и увеличение концентрации несвязанных ионов цитозольного кальция. Это свидетельствует об активации гипохлоритом редокс-систем фибробластов с участием Ca<sup>2+</sup>-зависимой сигнализации. Показано, что NaOCl в концентрации 10 и 30 мкМ индуцирует апоптоз фибробластов: после инкубации с препаратом в буферном растворе при комнатной температуре в течение 4 ч количество клеток в состоянии апоптоза в 1,28 и 1,4 раза соответственно выше по сравнению с контролем (инкубация без препарата).

Таким образом, можно заключить, что гипохлорит натрия в микромолярных концентрациях способен модифицировать структурно-функциональные показатели дермальных фибробластов.

## МЕХАНИЗМ ИСТОЩЕНИЯ ТРИПЛЕТНОГО КИСЛОРОДА В ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДАХ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

**В. В. Клименко, В. М. Моисеенко, А. А. Богданов**

*ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр  
специализированных видов медицинской помощи (онкологический)  
им. Н.П. Напалкова», г. Санкт-Петербург, Россия*

Фотодинамическая терапия является эффективным дополнением традиционным методам лечения рака, таким как хирургия, химиотерапия и лучевая терапия. Однако метаболические особенности опухолевых клеток делают некоторые типы рака менее восприимчивыми к фотодинамическому воздействию (ФВ) и изменяют микроокружение опухоли в пользу выживания. В частности, метаболическое потребление триплетного кислорода ( $^3\text{O}_2$ ) в опухоли приводит к формированию гипоксических зон, в которых клетки способны выживать при низких концентрациях  $^3\text{O}_2$ . Гипоксия и кислородная гетерогенность опухоли является одной из проблем, которая влияет на противоопухолевую эффективность ФВ. В работе рассмотрено влияние метаболического потребления  $^3\text{O}_2$  в сфероидах, сформированных из клеток колоректального рака мыши СТ26, на формирование гипоксических зон и на эффективность ФВ с фотосенсибилизатором Фотодитазин (хлорин е6). Проведено моделирование концентрации  $^3\text{O}_2$  для 3D модели опухолевого сфероида диаметром 650 мкм с использованием программного пакета COMSOL Multiphysics с учетом метаболического потребления  $^3\text{O}_2$  в клетках. Использована макроскопическая модель генерации синглетного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ) для оценки фотохимического потребления  $^3\text{O}_2$  во время облучения при ФВ. Проведен расчет генерации  $^1\text{O}_2$ . Было установлено, что метаболическое потребление  $^3\text{O}_2$  в опухолевых сфероидах диаметром 650 мкм приводит к снижению его концентрации у поверхности сфероида до 70–80 мкМ и формированию гипоксических зон (концентрация  $^3\text{O}_2$  менее 1 мкМ) в центре сфероида диаметром 100–150 мкм. При ФВ на сфероиды происходит снижение концентрации  $^3\text{O}_2$  у поверхности сфероида до 40 мкМ и уменьшение глубины проникновения  $^3\text{O}_2$  вглубь сфероида. В экспериментальных исследованиях было показано, что гипоксические зоны опухолевых клеток были защищены от воздействия ФВ при дозе облучения 15 Дж/см<sup>2</sup>, плотности мощности 50 мВт/см<sup>2</sup> (662 нм) и концентрации фотодитазина 10 мкг/мл, что приводило к продолженному росту сфероидов. Моделирование генерации  $^1\text{O}_2$  показало ограниченную область генерации  $^1\text{O}_2$  по глубине от поверхности к центру сфероида. Экспериментальные результаты ФВ на сфероидах при облучении с плотностью мощности 50 мВт/см<sup>2</sup> показали глубину повреждения 50–60 мкм, а при плотности мощности 12.5 мВт/см<sup>2</sup> глубина повреждения составила 120–150 мкм. Размер области повреждения сфероидов обратно пропорционален интенсивности облучения и скорости фотохимического потребления  $^3\text{O}_2$  при сохранении дозы облучения. Таким образом, механизм истощения  $^3\text{O}_2$  обусловлен метаболическим потреблением кислорода опухолевыми клетками. Цитотоксическое действие ФВ на сфероидах 650 мкм при плотности мощности 50 мВт/см<sup>2</sup> демонстрирует ограниченную область повреждения у поверхности сфероидов с сохранением живых клеток внутри сфероидов из-за ограниченной диффузией  $^3\text{O}_2$  в клеточной среде. Для повышения эффективности ФВ необходимо корректировать режимы облучения за счет снижения скорости фотохимического потребления  $^3\text{O}_2$  и уменьшения гипоксических зон.

Работа выполнена в рамках государственного задания Комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга для ГБУЗ «СПб КНпЦСВМП(о) имени Н.П. Напалкова».

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ PIEZO1 ТРОМБОЦИТОВ МЕТОДОМ ПЭТЧ-КЛАМП

**А. Ю. Кохан<sup>1</sup>, И. И. Прокофьев<sup>1,2</sup>, В. В. Долговечная<sup>2</sup>, Е. В. Шамова<sup>1,2</sup>**

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

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

Механорецепция играет важную роль в процессе функционального ответа тромбоцитов. Примерами механочувствительных механизмов являются индуцированное большими напряжениями сдвига потока (более  $3500 \text{ c}^{-1}$ ) активация фактора фон Виллебранда и его связывание с механочувствительным рецептором тромбоцитов GPIb, приводящее к запуску процессов внутриклеточной сигнализации. Мало изученным является механизм, связанный с активацией механочувствительных ионных каналов. В тромбоцитах и клетках предшественниках мегакариоцитах методами протеомики и транскриптомики обнаружено наличие каналов Piezo1, а также показано их участие в адгезии тромбоцитов к коллагену [1]. Однако прямого исследования данного канала в тромбоцитах проведено не было. Поэтому целью данной работы явилось исследование каналов Piezo1 тромбоцитов методом пэтч-кламп.

Тромбоциты выделяли из стабилизированной цитратом натрия венозной донорской крови последовательным центрифугированием. Механочувствительные ионные каналы тромбоцитов исследовали методом пэтч-кламп в конфигурации «на клетке» с модификациями [2]. В качестве внеклеточного раствора использовали HEPES-буфер с превалирующим содержанием KCl (pH 7.35) для деполяризации мембраны клеток, в качестве пипеточного раствора использовали HEPES-буфер, содержащий  $\text{CaCl}_2$ , с превалирующим содержанием NaCl (pH 7.2). Для активации каналов Piezo1 перед измерением в пипеточный буфер добавляли  $10 \text{ мкмоль/л}$  специфического агониста Yoda1. Кинетики тока регистрировали с частотой дискретизации  $5 \text{ кГц}$  при фильтрации сигнала с частотой отсечки  $1 \text{ кГц}$ . Далее строили гистограммы распределения полученных значений тока, и вольт-амперные характеристики зарегистрированных каналов.

Обнаружено, что внесение в пипеточный раствор агониста механочувствительных ионных каналов Yoda1 в концентрации  $10 \text{ мкмоль/л}$  приводило к регистрации тока от одиночных ионных каналов со средней проводимостью  $21 \text{ пСм}$ . Ионный ток с данными характеристиками был зарегистрирован в 50% исследованных клеток ( $n=30$ ). В условиях отсутствия агониста в пипеточном растворе событий зарегистрировано не было. Исходя из данных литературы [2], полученное значение проводимости для ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  при добавлении Yoda1 в пипеточный раствор подтверждает, что зарегистрированный канал является Piezo1. Стоит отметить, что попытки активировать данный канал подачей отрицательного давления к мембране в 90% случаев приводило к потере гигаомного контакта.

Таким образом, в результате выполнения данной работы получено прямое подтверждение существования ионного канала Piezo1 на тромбоцитах, а также вычислены его биофизические характеристики.

### **Библиографические ссылки**

1. Evidence for shear-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry through mechanosensitive cation channels in human platelets and a megakaryocytic cell line / Z. Ilkan [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. 2017. Vol. 292, iss. 22. P. 9204–9217.
2. Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry contributes to piezo1-induced  $\text{Ca}^{2+}$  increase in human endometrial stem cells / V. Chubinskiy-Nadezhdin [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23, iss. 7. P. 3763.

# РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ АНАЛИЗА СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

А. Ю. Кохан<sup>1</sup>, А. Д. Шумко<sup>2</sup>, Е. В. Шамова<sup>1,2</sup>

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

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

Микрофлюидика представляет собой самостоятельное научное направление, изучающее поведение жидкостей в небольших объемах (на микро и наноуровнях). Количество задач, решаемых с помощью микрофлюидных систем, огромно [1]. Одним из быстро развивающихся и широко востребованных направлений микрофлюидики является исследование системы гемостаза в условиях потока при наличии физиологического и патофизиологического окружения. Методы микрофлюидики, совмещенные с методами флуоресцентной микроскопии дают возможность изучать механизмы тромбообразования, при этом контролируя геометрию каналов, моделирующих сосуды, потоки сдвига, влияние различных биохимических факторов, приближая тестирование системы гемостаза к условиям *in vivo*. Целью данной работы явилось разработка и компьютерное моделирование различных дизайнов микрофлюидных систем для анализа системы гемостаза.

Модели микрофлюидных систем (МФС) создавали в системе автоматизированного проектирования SOLIDWORKS 2022. Моделирование тока крови в трехмерных моделях созданных камер проводили в COMSOL Multiphysics, используя пакет «creeping flow». Кровь моделировали как неньютоновскую жидкость с учетом ее реологических свойств, используя модель Каро [2]. Моделирование заключалось в решении системы уравнений Навье-Стокса для случая низких значений чисел Рейнолдса, что соответствует ламинарному потоку в узких каналах МФС. Анализ проводили, исследуя распределение напряжений сдвига в области наблюдения за адгезией тромбоцитов при различных задаваемых скоростях потока.

Трехмерные компьютерные модели МФС создавали с учетом технологического процесса их производства методами литографии и мягкой литографии, а именно толщины слоя фоторезиста (50–100 мкм) и минимальной необходимой ширины канала (100–200 мкм). Контроль за скоростью потока производили добавлением пассивного резистора потока. Разработано 2 основных группы МФС – с входом только для крови, и с дополнительным входом для смеси агонистов активации или других растворов молекул. В каждой группе также разработаны системы с резким сужением просвета канала – модели стеноза. Моделирование тока жидкости показало возможность достижения напряжений сдвига в широком диапазоне (50–1000 с<sup>-1</sup>) при использовании небольших выходных скоростей (около 10 мкл/мин). В моделях стеноза получены скорости сдвига, значительно превышающие 1000 с<sup>-1</sup> при уровне стеноза более 50%. Получены зависимости напряжений сдвига от выходных скоростей тока крови. Результаты будут использованы для производства МФС и исследования системы гемостаза в условиях, приближенных к *in vivo*.

## Библиографические ссылки

1. Lei K. F. Microfluidic systems for diagnostic applications: A review // Journal of laboratory automation. 2012. Vol. 17, iss. 5. P. 330–347.
2. Cho Y. I., Kensey K. R. Effects of the non-Newtonian viscosity of blood on flows in a diseased arterial vessel. Part 1: Steady flows // Biorheology. 1991. Vol. 28, iss. 3–4. P. 241–262.

# ХЕМОМЕХАНИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ МОРФОГЕНЕЗА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ЛИСТОВ

**И. В. Красняков, К. В. Костарев, Д. А. Брацун**

*Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь,  
Россия*

В работе представлена двумерная многоуровневая математическая модель морфогенеза эпителиальной ткани. Эпителиальная ткань – это совокупность полярных дифференцированных клеток, тесно прилегающих друг к другу в виде пласта, лежащего на базальной мембране. В разрабатываемой модели в качестве элементарной единицы, клетки, представлен многоугольник с шестью сторонами. Выбор такого типа многоугольника обусловлен тем, что его форма наиболее близко описывает форму реальной клетки – окружность и заполняет плоскость без просветов. Так в нашей модели клетки плотно примыкают друг к другу, образуя сплошную двумерную поверхность эпителия. Также модель обладает целым набором свойств, позволяющих имитировать поведение реальной эпителиальной ткани, а именно: наличие индивидуальной динамики всех элементов системы; рост общего количества клеток посредством их деления; возможность перемещения клеток в общей массе эпителиальной ткани; учёт механизма интеркаляции; обмен химическими сигналами; обмен механическими сигналами; учёт смены фенотипа клетки в зависимости от условий микро- и макроокружения.

С помощью разрабатываемой хемомеханической модели нами исследованы процессы роста инвазивной карциномы [1], рост ткани в порах скаффолдов [2], ранние процессы морфогенеза [3]. В данной работе, используя разработанную математическую модель, мы продолжаем исследовать процессы морфогенеза. Модель была модернизирована на случай развития отдельных стадий, которые возникают в эпителиальной ткани при морфогенезе, а именно: переупаковка клеток, установление контактов между ранее разобщёнными зачатками, последовательные стадии изгибов, агрегация подвижных клеток.

В работе будут представлены результаты по анализу параметров и клеточных структур, что позволяет получить представление о формировании морфологии тканей, форме клеток и их общей стабильности. Модель демонстрирует структурную устойчивость при большом числе взаимодействующих элементов системы. Качественное сравнение получаемых результатов хорошо согласуется с результатами клинических наблюдений. Работа ведёт к пониманию развития морфогенетических процессов, что в свою очередь может быть полезно для разработки новых методов лечения заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-71-01020, <https://rscf.ru/project/23-71-01020/>.

## **Библиографические ссылки**

1. *Bratsun D. A., Krasnyakov I. V., Pismen L. M.* Biomechanical modeling of invasive breast carcinoma under a dynamic change in cell phenotype: collective migration of large groups of cells // *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. 2020. Vol. 19. P. 723–743.
2. *Krasnyakov I., Bratsun D.* Cell-based modeling of tissue developing in the scaffold pores of varying cross-sections // *Biomimetics*. 2023. Vol. 8. P. 562.
3. *Krasnyakov I. V., Kostarev K. V., Bratsun D. A.* Mathematical modeling of early processes of morphogenesis of epithelial tissues // *Russian Journal of Biomechanics*. 2024. Vol. 28, iss. 1. P. 76–86.

## ВЛИЯНИЕ БИЛИРУБИНА И ЭНДОГЕННЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА ФОТОГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ

Ю. В. Крученюк, О. Н. Дудинова, В. Ю. Плавский

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

Фототерапия широко используется для лечения неонатальной гипербилирубинемии; однако наиболее важным, до конца не выясненным вопросом является определение оптимального спектрального диапазона света, обеспечивающего эффективное снижение уровня билирубина в крови новорожденного с минимальными побочными эффектами. В данной работе показано, что воздействие излучения светодиодных источников синей ( $\lambda_{\max}=463\pm 20$  нм) или зеленой ( $\lambda_{\max}=517\pm 38$  нм) областей спектра при плотности мощности  $I=12$  мВт/см<sup>2</sup> в течение 20 мин (энергетическая доза  $D=14.4$  Дж/см<sup>2</sup>) на суспензию эритроцитов человека в забуференном физиологическом растворе приводит к фотоповреждению клеточной мембраны, и сопровождается увеличением оптической плотности гемоглобина в супернатанте. Величины фотогемолитических эффектов примерно равнозначны при воздействии излучения синей и зеленой областей спектра. Молекулярно-структурные изменения в мембранах эритроцитов при воздействии света вышеуказанных параметров вероятнее всего обусловлены возбуждением эндогенных порфириновых (протопорфирин IX, цинк-протопорфирин) и флавиновых (флавиномононуклеотид, флавинадениндинуклеотид) фотосенсибилизаторов, присутствующих в эритроцитах в низких концентрациях, но характеризующихся высокой эффективностью генерации активных форм кислорода. Обоснована ведущая роль порфириновых соединений в эффектах сенсибилизации.

При внесении в суспензию эритроцитов билирубина в концентрации 171 мкМ, при которой показана фототерапия новорожденным с синдромом гипербилирубинемии, интенсифицируется спонтанный (темновой) гемолиз эритроцитов, но замедляется (по сравнению с клетками, не содержащими билирубин) светоиндуцированный выход гемоглобина. Фотохимические деструктивные процессы в мембране эритроцитов, инициируемые за счет сенсибилизирующего действия билирубина и его фотоизомеров, протекают с незначительным участием синглетного кислорода, что подтверждается слабым снижением выхода ионов калия и молекул гемоглобина при внесении в суспензию перед облучением тушителя <sup>1</sup>O<sub>2</sub> азида натрия. Характерно разнонаправленное влияние азида на гемолитические эффекты, инициируемые в эритроцитах светом синей и зеленой областей спектра, что указывает на отличающуюся природу фотохимических процессов, лежащих в их основе. В этой связи можно ожидать существенную роль фотоизомеров билирубина в эффектах сенсибилизированного повреждения мембран эритроцитов. Причем вклад различных конфигурационных и структурных изомеров билирубина в общее поглощение света может заметно отличаться при воздействии света с длиной волны  $\lambda_{\max}=463$  нм и  $\lambda_{\max}=517$  нм. Причина тому – зависимость квантового выхода образования фотоизомеров билирубина от длины волны воздействующего излучения, а также их отличающиеся спектры поглощения [1, 2].

### Библиографические ссылки

1. Sensitizing effect of Z, Z-bilirubin IX $\alpha$  and its photoproducts on enzymes in model solutions / Plavskii V. [et al.] // J. Appl. Spectrosc. 2008. Vol. 75, iss. 3. P. 407–419.
2. The effect of light wavelength on *in vitro* bilirubin photodegradation and photoisomer production / H. Vreman [et al.] // Pediatric research. 2019. Vol. 85, iss. 6. P. 865–873.

## БИОМИНЕРАЛИЗАЦИЯ CaCO<sub>3</sub>: О РОЛИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОПЛЕНКИ

А. А. Кульминская<sup>1,2</sup>, Л. А. Иванова<sup>1,2</sup>, Г. П. Копица<sup>1</sup>, А. Д. Япрынцев<sup>3</sup>,  
А. Е. Баранчиков<sup>3</sup>, Д. В. Лебедев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Гатчина, Россия

<sup>2</sup>Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>3</sup>Институт общей и неорганической химии им. Курнакова РАН, Москва, Россия

Биоминерализация – это процесс, в ходе которого живые организмы в результате собственных метаболических реакций способствуют осаждению ионов металлов из окружающей среды с образованием нерастворимых осадков. В последнее десятилетие процессу осаждения карбоната кальция, индуцированного микроорганизмами (МИСР), уделяется большое внимание. Одним из наиболее интенсивно изучаемых применений МИСР является разработка технологий восстановления бетонных конструкций с использованием кальцифицирующих микроорганизмов. МИСР вызывает интерес и в областях, связанных со здоровьем человека: например, для выбора эффективной стратегии борьбы с образованием инкрустированной биопленки, закупоривающей мочевые катетеры, что вызывает несколько заболеваний, или для восстановления микротрещин в зубной эмали.

В своих исследованиях [1, 2] мы проанализировали влияние компонентов среды на индукцию осаждения CaCO<sub>3</sub> клетками *Bacillus cereus* и состав внеклеточного матрикса, образующегося в планктонной культуре. С помощью широкого спектра микроскопических методов было показано, что ДНК, входящая в состав внеклеточного матрикса, служила матрицей осаждения CaCO<sub>3</sub> как в бактериальной, так и в бесклеточной системах. Исключение ДНК-компоненты из бактериальной системы приводило к радикальному замедлению биоминерализации, изменению полиморфного состава осадка, а также его кристаллической и надмолекулярной структур, исследуемых широким спектром биофизических методов. В совокупности, полученные результаты демонстрируют, что ДНК во внеклеточном матриксе является триггером для запуска биоминерализации в планктонной культуре *B. cereus*, расширяя представления о механизмах бактериальной биоминерализации и открывая новые возможности для разработки экологических технологий строительства, создания новых материалов и применения в биотехнологиях и биомедицине.

Работы выполнены при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития ЦГМУ (Соглашение № 075-15-2019-1663) и в рамках гос. задания по теме «Функциональная и структурная организация сложных, мультикомпонентных биологических систем и их динамика» (рег. № 121060200127-6).

### Библиографические ссылки

1. Matrix is everywhere: extracellular DNA is a link between biofilm and mineralization in *Bacillus cereus* planktonic lifestyle / L. A. Ivanova [et al.] // NPJ Biofilms Microbiomes. 2023. Vol. 9, iss. 1. P. 9.
2. Structure evolution of CaCO<sub>3</sub> precipitates formed during the *Bacillus cereus* induced biomineralization / L. A. Ivanova [et al.] // Minerals. 2023. Vol. 13, iss. 6. P. 740.

## ТОПОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАК КЛЮЧ К ПОНИМАНИЮ СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ДИНАМИКИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ СЕТЕЙ

**Д. П. Ларюшкин, С. Г. Гайдин, С. А. Майоров, А. М. Косенков, А. В. Бережнов,  
К. А. Критцкая**

*Институт биофизики клетки РАН - обособленное подразделение ФГБУ науки  
«Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических  
исследований РАН»», Пушкино, Россия*

Митохондрии, критические органеллы клеток эукариот, выполняют функции, необходимые для жизни, включая поддержание энергетического обмена, регулирование апоптотических сигнальных путей и ряд других центральных процессов. Эти динамичные структуры формируют сложные митохондриальные сети (МС), которые играют ключевую роль в эффективном распределении клеточных энергетических ресурсов и передаче сигналов. Сетевая организация митохондрий обеспечивает их адаптацию к меняющимся метаболическим требованиям клетки, поддержание биоэнергетической эффективности и взаимодействие с другими клеточными системами. Динамическое равновесие между процессами слияния и деления митохондрий поддерживает стабильность и функциональность митохондриальных сетей, тогда как дисбаланс в этих процессах может приводить к нарушениям структуры МС и митохондриальной функции. Генетические мутации, токсические воздействия и другие патологические условия могут быть причиной таких структурно-функциональных изменений. Для оценки состояния МС традиционно используются метрики, описывающие структурные и функциональные аспекты митохондриальных сетей: это количественные характеристики связей, площадь сети, число индивидуальных митохондрий, ветвление и наличие аномальных структур. Однако этот методологический подход встречает ряд проблем, включая проблему унимодальных распределений, высокую степень шума и сложность обработки данных. В нашем исследовании мы предполагаем, что топологический анализ данных может преодолеть эти препятствия. Мы разработали алгоритм на языке программирования Python, который анализирует конфокальные изображения МС и выводит набор количественных метрик, включая плотность графа, среднее число узлов, среднее число, количество эссенциальных циклов и т.д. Для валидации алгоритма мы использовали МС с заранее известными характеристиками. В качестве модели применялись фибробласты, которые служили контролем и были подвергнуты воздействию FCCP, разобщителя дыхательной цепи митохондрий. Наблюдаемые различия в метриках между контрольными и обработанными FCCP образцами были статистически подтверждены и согласуются с данными из предыдущих исследований.

Таким образом, использование топологического анализа при исследовании митохондриальных сетей может стать ценным инструментом, который обеспечивает не только автоматизацию процесса сбора и анализа данных, но и открывает новые перспективы для более глубокого понимания структурных особенностей митохондриальных сетей. С помощью топологического анализа удастся расширить понимание механизмов, лежащих в основе структурно-функциональных адаптаций митохондриальных сетей, что открывает новые возможности для разработки терапевтических стратегий в области митохондриальных заболеваний и в целом для улучшения клеточного здоровья.

# РАМАНОВСКАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ ДИНАМИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ИНФЕКЦИОННЫХ АГЕНТОВ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИ ИЗ ГЕТЕРОГЕННОЙ ДИСПЕРСНОЙ ФАЗЫ БИОПРОЦЕССОРНЫМИ ЧИП-ФОРМАТАМИ

**В. А. Лобан, А. И. Драпеза, С. В. Якимчук**

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь*

Для решения актуальных задач, связанных с разработкой информационных технологий в областях молекулярной, клеточной и медицинской биофизики, разработана оптическая система, предназначенная для регистрации комбинационного рассеяния света, используемого при динамической идентификации инфекционных агентов, которые выделяются электрокинетическими технологиями из гетерогенной дисперсной фазы, например, цельной крови человека, специально разработанными для данных целей, биопроцессорными чип-форматами.

Аппаратная часть оптической системы собрана на основе отдельных покупных полуфабрикатов, включая: лазерный узел (532 нм, China), с входным оптоволоконным разъемом, высокостабильный источник питания лазера (OEM LASER MODULE MSL-U-532-50,0 мВт, CNI, China), узел портативной оптической системы измерения спектра в диапазоне  $150\text{--}4500\text{ см}^{-1}$  (SPECTROMETER Sunshine, CNI, China), имеющий выходной разъем USB-интерфейса и входной оптоволоконный разъем, узел регистрации комбинационного рассеяния света (PROBE RPB-532-A, CNI, China), подсоединяемый соответствующим образом к узлам оптической системы и лазера с помощью двух оптических волноводов, а также разработанного и изготовленного, с использованием 3D аддитивных технологий, стыковочного узла, задачей которого является совмещение хода оптического пути к объекту наблюдения с помощью цифрового микроскопа Levenhuk D870T/40030 и оптического пути лазерного облучения наблюдаемого объекта через микроскоп.

Конструкция разработанной и изготовленной оптической системы идентификации представляет собой разборный пластмассовый корпус с переносной ручкой, в котором передняя и задняя панели, а также поддерживающая панель внутри корпуса, изготовлены из алюминия толщиной 2 мм. На передней панели представлены элементы управления и индикации режимом работы лазера, а также оптоволоконные разъемы лазера и оптической системы, а также разъем USB-интерфейса оптической системы для работы с компьютером. На задней панели размещены вентиляторы для поддержания температурного режима работы лазерного узла и оптической системы в диапазоне  $25\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а также разъем подсоединения сетевого шнура, имеющего тумблер включения внешней сети переменного тока 220В (50А). Все покупные узлы размещены в металлических корпусах.

Программное обеспечение разработанной и изготовленной оптической системы для регистрации комбинационного рассеяния света написано на языке C++ и предназначено для работы с операционной системой Windows. С особенностями программного обеспечения, связанными с установкой режимов измерения рамановских спектров, сохранения данных измеренных спектров в формате «txt.» и снятия изображений полученных спектров с экрана в формате «jpeg», можно познакомиться на сайте <http://www.cnilaser.com>.

Разработанная система имеет достаточно широкие функциональные возможности модификации. При незначительных доработках измерительной ячейки появляется возможность регистрировать и флуоресцентные спектры.

## ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ A1 АДЕНОЗИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ И АСТРОЦИТОВ ПРИ ГИПЕРВОЗБУЖДЕНИИ

**С. А. Майоров, С. Г. Гайдин, Д. П. Ларюшкин, П. Е. Рязанцева, К. А. Крицкая, А. М. Косенков**

*Институт биофизики клетки РАН - обособленное подразделение ФГБУ науки «ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН»», Пушкино, Россия*

Гипервозбуждение нейрональных сетей является отличительной особенностью эпилепсии, ишемических и травматических повреждений мозга [1]. Активация A1 аденозиновых рецепторов рассматривается как перспективный подход для торможения нейрональной гипервозбудимости [2]. В работе с использованием кальциевого имиджинга и электрофизиологических методов на нейрон-астроцитарных ко-культурах гиппокампа крыс исследовалось противоэпилептическое действие агонистов A1 рецепторов ССРА и N6-СНА при разных моделях гипервозбуждения нейрональных сетей.

В модели эпилептиформной активности, индуцированной ингибированием ГАМК(А) рецепторов бикуккулином (10 мкМ), агонисты A1 рецепторов дозозависимо снижали частоту синхронных кальциевых колебаний в нейронах, полностью подавляя их при концентрации 100 нМ. Одновременно в астроцитах агонисты вызывали повышение кальциевой активности. При моделировании глутаматной токсичности добавлением 100 мкМ глутамата аппликация N6-СНА после отмывки глутамата восстанавливала кальциевый гомеостаз в нейронах, снижая процент клеток с высоким кальцием с 10% до 5%. В модели гипервозбуждения, индуцированного ионами аммония (8 мМ NH<sub>4</sub>Cl), N6-СНА быстро снижал уровень цитозольного кальция в нейронах, подавляя высокочастотные колебания, и также индуцировал кальциевую активность в астроцитах.

Ингибиторный анализ показал, что эффект агонистов A1 рецепторов снижался в присутствии ингибиторов Gβγ (gallein), PLC (U73122), PKC (Go 6976) и ГАМК(Б) рецепторов (СGR 52432). Присутствие ингибитора PKC уменьшало тормозной эффект агонистов на нейроны, но не влияло на их способность стимулировать кальциевую активность астроцитов, что свидетельствует о роли PKC непосредственно в процессе секреции ГАМК астроцитами.

В электрофизиологических экспериментах аппликация агонистов A1 рецепторов вызывала в нейронах ГАМК(А)-зависимое смещение удерживаемого тока, что, совместно с ингибиторным анализом, указывает на высвобождение ГАМК активированными астроцитами.

Таким образом, реализация противоэпилептического действия агонистов A1 аденозиновых рецепторов в моделях гипервозбуждения нейрональных сетей опосредована не только подавлением нейрональной активности за счет снижения цАМФ, ингибирования кальциевых и активацией калиевых каналов, но и за счет секреции ГАМК астроцитами в результате активации Gβγ-PLC-PKC сигнального пути.

### Библиографические ссылки

1. Traumatic brain injury: Mechanisms, manifestations, and visual sequelae / S. H. Rauchman [et al.] // *Frontiers in neuroscience*. 2023. Vol. 17. P. 1090672.
2. Focusing on adenosine receptors as a potential targeted therapy in human diseases / W. I. Effendi [et al.] // *Cells*. 2020. Vol. 9, iss. 3. P. 785.

## ФОСФОРСОДЕРЖАЩИЕ ПОРФИРИНЫ С ЭТОКСИАКСИАЛЬНЫМИ ГРУППАМИ ВЫЗЫВАЮТ ГИБЕЛЬ *ESCHERICHIA COLI* T-61, НАРУШАЯ ЦЕЛОСТНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ

А. А. Махонько<sup>1,2</sup>, А. Ю. Харитонова<sup>1,2</sup>, А. Е. Смирнова<sup>1,2</sup>, З. Г. Дениева<sup>1</sup>,  
А. Н. Константинова<sup>1</sup>, Е. А. Варламова<sup>1</sup>, О. В. Батищев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия*

<sup>2</sup>*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

Антимикробная фотодинамическая терапия (аФДТ) – эффективный метод борьбы с антибиотикорезистентными бактериальными возбудителями. Основным механизмом аФДТ заключается в генерации активных форм кислорода фотосенсибилизаторами (ФС) под действием света. Одним из перспективных классов ФС являются молекулы порфиринов, однако для достижения клинического эффекта им требуется длительное облучение и высокие концентрации вещества. Поэтому актуальным является поиск химических модификаций молекул порфиринов, обеспечивающих высокую антибактериальную активность при минимальных концентрациях и дозах облучения. Ранее нами была показана антибактериальная активность диэтоксидо(5,10,15,20-тетрафенилпорфиринат)фосфор(V) бромид (TRP(OEt)<sub>2</sub>) против штамма *E.coli* T-61 [1] (MIC=12,5 мкМ) после облучения лазером ( $\lambda=450$  нм, 5 Дж/см<sup>2</sup>) в течение 1 мин. В настоящей работе мы изучали возможные механизмы чувствительности *E.coli* T-61 к TRP(OEt)<sub>2</sub>. Методом атомно-силовой микроскопии нами было показано, что через 3 ч после облучения суспензии бактерий в присутствии 50 мкМ TRP(OEt)<sub>2</sub> происходит нарушение целостности бактериальной мембраны: образуются углубления диаметром более 20 нм. При добавлении витального красителя Annexin V в суспензию бактерий, уже через 5 мин после облучения мы регистрировали флуоресценцию с помощью конфокальной микроскопии в клетках в присутствии TRP(OEt)<sub>2</sub>, но не в контроле, что может свидетельствовать об образовании сквозных пор в бактериальных мембранах. В независимых экспериментах на модельных липидных мембранах было продемонстрировано увеличение проводимости мембраны после адсорбции TRP(OEt)<sub>2</sub>, причем даже в отсутствие освещения. Результаты, полученные в данной работе, позволяют предположить, что в основе антибактериальной активности TRP(OEt)<sub>2</sub> лежит его способность формировать поры, нарушающие целостность как клеточной стенки, так и бактериальной мембраны.

### Библиографические ссылки

1. Antimicrobial activity of photosensitizers: arrangement in bacterial membrane matters / O. V. Batishchev [et al.] // Front. Mol. Biosci. 2023. Vol. 10. P. 1192794.

## ИНДУКЦИЯ ТОКСИЧЕСКИХ И СИГНАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ В КОРНЯХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ В ОТВЕТ НА Ni<sup>2+</sup> И КОМПЛЕКСЫ Ni<sup>2+</sup>-ГИСТИДИН

**В. С. Мацкевич, А. Д. Герман, К. И. Арзамазкина, К. И. Губаревич,  
В. В. Демидчик**

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь*

Никель (Ni) является одновременно важным питательным веществом и экотоксикантом для растений. В ответ на повышение уровня никеля многие растения синтезируют и экскретируют лиганды-хелаторы, такие как гистидин (Гис), связывающие Ni<sup>2+</sup>. С одной стороны, это приводит к выведению Ni<sup>2+</sup> из почвенного раствора, с другой – приводит к накоплению редокс-активных комплексов Ni-гистидин вблизи плазматической мембраны. В настоящей работе тестировалась гипотеза, согласно которой формирование комплексов Ni-гистидин вызывает активацию систем редокс- и Ca<sup>2+</sup>-сигнализации, способствуя распознаванию избытка Ni<sup>2+</sup> в среде. Целью настоящего исследования являлось установление роли взаимодействия Ni<sup>2+</sup> и Гис в индукции токсических и сигнальных реакций в корне высших растений в условиях никелевого стресса. В опытах с регистрацией прорастания модельных растений *Arabidopsis thaliana* L. Heunh. на среде с никелем было показано, что данный тяжелый металл ингибирует формирование и рост корневой системы начиная с концентрации 10 мкМ, в тестовой системе с заменой среды – с 30 мкМ, в гидропонике – с 3 мкМ. Добавление Гис, в соотношении 2 Гис/1 Ni<sup>2+</sup>, значительно понижало токсичность Ni<sup>2+</sup>. При помощи ЭПР-спектроскопии и спиновой ловушки 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксидом (ДМПО) было показано, что 0,01–3 мМ Ni<sup>2+</sup> не вызывает формирования гидроксильных радикалов в стандартных биологических условиях в присутствии 1 мМ L-аскорбата и 1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В то же время, введение никеля на фоне Гис вызывало мощный синтез гидроксильных радикалов. Аналогичный эффект был продемонстрирован в тестах с флуоресцентным зондом дигидроэтидиум (ДГЭ). Даже концентрация 3 мМ Ni<sup>2+</sup> (летальный уровень) не вызывала генерацию АФК в корне. При этом введение Ni<sup>2+</sup> на фоне Гис активировало продукцию АФК, которая достигала максимума на 30 мин. Добавление антиоксидантов (диметилсульфоксида) снижало накопление АФК под действием Ni<sup>2+</sup>-Гис<sub>2</sub>. Люминометрический тест (Ca<sup>2+</sup>/экворин) показал, что добавление 0,01-3 мМ Ni<sup>2+</sup> к корням арабидопсиса не вызывало изменений [Ca<sup>2+</sup>]<sub>цит.</sub>, однако его введение на фоне Гис индуцировало значительный Ca<sup>2+</sup>-сигнал. Таким образом, избыток никеля в присутствии Гис распознавался системой Ca<sup>2+</sup>-сигнализации растительной клетки. С использованием комплекса молекулярных и физиологических подходов выявлены гены-мишени Ni<sup>2+</sup>-Гис<sub>2</sub> в клетке, такие как редокс-чувствительный K<sup>+</sup>-канал GORK, глутатион-редуктаза GR1, Ca<sup>2+</sup>-зависимая протеинкиназа СРК6 и др. Также были проведены опыты с сельскохозяйственными видами. Они продемонстрировали высокую чувствительность к никелю корневой системы пшеницы и подсолнечника и низкую чувствительность гороха (данный вид рос до 10 мМ Ni<sup>2+</sup> в среде). Вероятно, это связано с высокой важностью уреазы (никель-содержащий фермент) для бобовых растений.

Работа была выполнена в рамках задания ГПНИ «Исследование функционального взаимодействия сигнально-регуляторных и антиоксидантных систем при стрессе с целью повышения общей стрессоустойчивости высших растений и создания новых биотехнологий» подпрограммы «Молекулярные и клеточные биотехнологии-2» государственной программы научных исследований «Биотехнологии-2» на 2021–2025 гг.

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ВЕКТОРА ДЛЯ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ИОННОГО КАНАЛА В КЛЕТКАХ НЕК293 ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

А. О. Муравицкая, С. С. Зуёнок, Е. А. Чернявская, В. В. Демидчик

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь*

Установление функциональных особенностей и механизмов регуляции ионных каналов растений является важной задачей биофизики растений. Для исследования ионных каналов применяются различные методы: электрофизиологические, молекулярно-генетические, биохимические. В последнее время все чаще используются подходы, включающие гетерологическую экспрессию ионных каналов, позволяющие исследовать особенности ионных токов через определенный канал в модельной системе [1]. Семейство каналов, активируемых циклическими нуклеотидами (CNGC), является одним из крупнейших семейств ионных каналов растений, однако в настоящее время особенности функционирования данных каналов у растений исследованы фрагментарно. В настоящей работе в качестве объекта исследования был избран ионный канал *A. thaliana* CNGC14, для которого ранее была предложена функция в качестве  $Ca^{2+}$ -опосредуемого триггера сигналов фитогормонов (ауксинов) и регуляции роста корней [2]. Целью работы являлось конструирование вектора для гетерологической экспрессии CNGC14 и других ионных каналов растений в культуре клеток почек эмбриона человека (НЕК 293). За основу был взят плазмидный экспрессионный вектор pcDNA3.1(+) размером 5428 п.о., содержащий сайты начала репликации для клонирования в клетках *E. coli* и в клетках млекопитающих, сильный промотор цитомегаловируса (CMV) и полилинкер в прямой ориентации. В качестве селективных маркеров выступали гены антибиотикорезистентности – *AmpR* (для отбора трансформированных клеток *E. coli* на среде с ампициллином) и *NeoR/KanR* (для отбора трансформантов среди клеток млекопитающих на среде с неомицином, канамицином или G418). В роли целевого гена выступала последовательность кДНК ионного канала CNGC14 *A. thaliana* (GenBank NM\_001335940), слитая с последовательностью кДНК зеленого флуоресцирующего белка (EGFP) через линкер, кодирующий 6 аминокислотных остатков глицина. Флуоресцентная метка необходима для визуализации экспрессии ионного канала и определения его локализации в клетке. Нуклеотидная последовательность растительного ионного канала предварительно была оптимизирована для экспрессии в животных клетках НЕК 293 с помощью сервиса VectorBuilder. Вставка целевой последовательности в вектор осуществлялась по сайтам рестрикции для ферментов *NheI* и *NotI*, расположенным в полилинкере. Данная генетическая конструкция позволяет экспрессировать растительный ионный канал AtCNGC14 в клетках линии НЕК293, что необходимо для проведения электрофизиологических исследований методом пэтч-кламп с целью измерения ионных токов через данный канал.

### Библиографические ссылки

1. Wang Y. Functional characterization of plant ion channels in heterologous expression systems // Plant Electrophysiology. 2012. Vol. 13. P. 301–321.
2. The cyclic nucleotide-gated channel CNGC14 regulates root gravitropism in *Arabidopsis thaliana* / H.-W. Shih [et al.] // Curr. Biol. 2015. Vol. 25, iss. 23. P. 3119–3125.

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ БИОВОДОРОДА И ЦИФРОВОЙ АНАЛИЗ ФЕНОТИПА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *CHLORELLACEAE*

А. О. Муравицкая<sup>1</sup>, В. И. Светлаков<sup>1</sup>, В. Ю. Бондаренко<sup>1</sup>, М. С. Вечерек<sup>1</sup>,  
Т. В. Самович<sup>2</sup>, Н. В. Козел<sup>2</sup>, А. И. Соколик<sup>1</sup>, Л. С. Габриелян<sup>3</sup>, Д. Г. Маноян<sup>3</sup>,  
В. В. Демидчик<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

<sup>3</sup>Ереванский государственный университет, г. Армения, Ереван

Селекция высокопродуктивных штаммов микроводорослей семейства *Chlorellaceae*, способных осуществлять синтез  $H_2$  для промышленных целей, является одной из актуальных задач биотехнологии. Потенциальным решением проблемы отбора продуцентов является применение подходов цифрового фенотипирования. Предполагается, что различия фенотипических характеристик могут коррелировать со способностью микроводорослей к биосинтезу  $H_2$ . Целью данной работы являлись оценка продукции  $H_2$  и цифровой анализ фенотипа водорослей семейства *Chlorellaceae* в связи с  $H_2$ -генерирующей активностью штаммов белорусской и армянских коллекций. В качестве объектов исследования выступали штаммы микроводорослей *Chlorella kessleri* IBCE C-3, *Chlorella vulgaris* IBCE C-19 (Коллекция водорослей, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск) и *Parachlorella kessleri* PA-002 (Центр депонирования микроорганизмов НАН РА, Ереван). Культивирование осуществлялось на средах TAP и Тамия (полноценных либо дефицитных по азоту и/или сере). Для индукции синтеза  $H_2$  культуры на поздней логарифмической фазе роста помещались в анаэробные условия. Количество выделяемого  $H_2$  в культурах определялось с помощью оценки окислительно-восстановительного потенциала и газовой хроматографии. Для фенотипического анализа клеток микроводорослей была разработана компьютерная программа, позволяющая производить сегментацию цифровых изображений клеток, а также сверточная нейронная сеть для их классификации. Работа была проведена с использованием Python 3.9 и библиотек OpenCV, NumPy, Skimage, SciPy, Pandas и Tensorflow. Была создана нейронная сеть со сверточной архитектурой, содержащая 10 сверточных и 5 полносвязных слоев, тренировка происходила на наборе данных размером в 10 000 фотографий, при этом 80% изображений использовалось для тренировки, 20% для валидации. Функция активации – ReLU, количество эпох – 100, размер батча – 32. Для тренировки применялась методика градиентного спуска, с оптимизатором Adam, в качестве метрик использовалась точность (*accuracy*). В качестве функции потерь выбиралась бинарная кроссэнтропия либо средний квадрат ошибок. Согласно полученным данным, наибольшей продуктивностью с точки зрения синтеза биоводорода характеризуется штамм *Parachlorella kessleri* PA-002. При этом лучшие показатели продемонстрировали культуры, находившиеся в условиях дефицита серы. Для них максимальная концентрация выделяемого водорода составила  $42,1 \pm 6,4$  ммоль  $H_2$  / (г сухой массы · сут)<sup>-1</sup>. Метрика точности при идентификации исследуемых штаммов микроводорослей составила 96,38%. Нейросетевой анализ позволил обнаружить различия между клетками культур микроводорослей *Parachlorella kessleri* PA-002, выращенных в разных условиях, с точностью 94,72%. Для штаммов *Chlorella vulgaris* IBCE C-19 и *Chlorella kessleri* IBCE C-3 данные показатели составили 89,22% и 90,46% соответственно.

Работа выполнена в рамках проекта Б21АРМ-018, № госрегистрации 20213856 БРФФИ (Беларусь-Армения).

# ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ЦИТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ РЕСВЕРАТРОЛА И ЦИКЛОАСТРАГЕНОЛА НА ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

М. А. Наквасина, Е. Н. Чурсанова, Е. И. Корпусова, Н. Г. Сараджи

*Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия*

Изучение механизмов реализации клеточной гибели иммуноцитов и разработка способов ее регулирования – одна из актуальных проблем клеточной биофизики.

Ресвератрол и циклоастрегенол – перспективные биогенные соединения, проявляющие противовоспалительное, противоопухолевое, иммуномодулирующее, геропротекторное действие, способные активировать теломеразу. Ресвератрол – растительный полифенол, молекулярными мишенями которого являются клеточные рецепторы, компоненты сигналтрандукторных систем, транскрипционные факторы, различные ферменты. Циклоастрегенол – тритерпеноидное сапониновое соединение, один из компонентов астрагала, с широким спектром фармакологических функций.

С целью расширения представлений о механизмах биологического действия этих соединений, исследования диапазона оптимальных концентраций и возможности их использования для регулирования процессов клеточной смерти нами изучены некоторые показатели (индикаторы) процессов апоптотической и некротической гибели, а также антиоксидантного статуса лимфоцитов человека, модифицированных воздействием УФ-света и пероксида водорода в присутствии ресвератрола и циклоастрегенола.

Обнаружено снижение интенсивности процессов апоптотической и некротической гибели лимфоцитов периферической крови человека после воздействия УФ-света (254 нм, 1510 Дж/м<sup>2</sup>) и пероксида водорода (10<sup>-5</sup> моль/л) в присутствии ресвератрола (10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> моль/л) и циклоастрегенола (10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup> моль/л) по сравнению с таковой для иммуноцитов, модифицированных в свободном состоянии.

Установлено, что цитопротекторное действие ресвератрола на лимфоциты обусловлено снижением уровня продукции внутриклеточных активных форм кислорода и ионов кальция, повышением уровня оксида азота и активности антиоксидантных ферментов – каталазы и глутатионредуктазы, увеличением пероксидной резистентности плазматических мембран, взаимодействием с ДНК. Ресвератрол может непосредственно выступать в качестве антиоксиданта и инактивировать пероксид водорода в модельных экспериментах.

Показано, что наиболее выраженный защитный эффект по отношению к лимфоцитам проявляет циклоастрегенол в концентрации 10<sup>-8</sup> моль/л. После воздействия УФ-света и пероксида водорода на лимфоциты, предварительно обработанные циклоастрегенолом (10<sup>-8</sup> моль/л), обнаружены снижение уровня внутриклеточных активных форм кислорода и ионов кальция, повышение уровня продукции оксида азота, активности каталазы и глутатионредуктазы, изменения зарядового состояния плазматических мембран по сравнению с таковыми для контрольных образцов (модифицированные клетки без циклоастрегенола).

Обсуждаются возможные механизмы действия ресвератрола и циклоастрегенола как регуляторов процессов апоптотической и некротической гибели лимфоцитов в условиях воздействия пероксида водорода и УФ-излучения: регулирование процессов митохондриального и ядерного механизмов апоптоза, процессов «кальций-зависимых» путей клеточной смерти, модификации плазматических мембран и процессов сигнальной трансдукции.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАНАЛА $K_v1.1$ С ПЕПТИДНЫМИ БЛОКАТОРАМИ: ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ НА КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

**Н. А. Орлов**<sup>1,2</sup>, **Е. А. Крюкова**<sup>1</sup>, **А. В. Ефременко**<sup>1</sup>, **С. А. Якимов**<sup>1</sup>, **В. А. Топорова**<sup>1</sup>,  
**М. П. Кирпичников**<sup>1,2</sup>, **О. В. Некрасова**<sup>1</sup>, **А. В. Феофанов**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация*

<sup>2</sup>*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва,  
Российская Федерация*

Потенциал-зависимый калиевый канал  $K_v1.1$  широко распространён в центральной и периферической нервной системе, контролирует возбудимость нейронов, нервно-мышечную передачу сигналов, а также участвует в различных физиологических процессах в невозбудимых клетках [1]. Патогенез некоторых заболеваний тесно связан с изменением уровня экспрессии и/или активности канала  $K_v1.1$  в определённых типах клеток. Соединения, способные специфически и с высокой аффинностью связываться с каналом  $K_v1.1$  и подавлять его активность, являются перспективными кандидатами для создания на их основе лекарственных средств для лечения заболеваний нервной, сердечно-сосудистой и иммунной системы.

Мы разработали на основе флуоресцентного метода (конфокальной микроскопии) аналитическую систему для изучения пептидных лигандов, способных блокировать ионную проводимость канала  $K_v1.1$  [2]. Система основана на анализе конкурентного связывания исследуемых соединений и флуоресцентного зонда Atto488-HgTx с каналом человека  $K_v1.1$  (S369T), меченным флуоресцентным белком mKate2. Подобранный для системы флуоресцентный зонд Atto488-HgTx обладает субнаномолярным сродством к каналу ( $K_d=0,7\pm 0,2$  нМ) и применим для скрининга лигандов, а также для визуализации канала  $K_v1.1$  в живых клетках.

Разработанная система была валидирована путём измерения аффинности известных блокаторов канала  $K_v1.1$ , таких как агитоксин 2, калиотоксин 1, хонготоксин 1 и маргатоксин. Была определена аффинность к каналу  $K_v1.1$  пептида Ce1 из яда скорпиона *Centruroides elegans* ( $K_{ap}=11\pm 5$  нМ). При помощи разработанной системы было обнаружено, что на взаимодействие канала  $K_v1.1$  с исследуемыми пептидными блокаторами не влияет переход канала из закрытого состояния в открытое. Структурные перестройки, сопровождающие переход канала в открытое состояние, не изменяют конформацию Р-петли (включая селективный фильтр), участвующей в формировании сайта связывания пептидных блокаторов.

Разработанная методика расширяет возможности изучения ионных каналов и их лигандов. Она подходит для решения задач, связанных с поиском специфичных блокаторов в природных ядах, сравнительного анализа мутированных или химерных пептидов в ходе разработки лекарств, изучения интерфейса взаимодействия лиганд-канал, поиска и разработки блокаторов каналов с аффинностью, зависящей от состояния канала, а также разработки флуоресцентных лигандов канала  $K_v1.1$ .

Работа поддержана грантом РФФ (проект N 22-14-00406).

### **Библиографические ссылки**

1. K<sub>v</sub>1.1 Channelopathies: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches / M. C. D'Adamo [et al.] // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21. P. 2935.
2. Orlov N.A., Kryukova E.V., Efremenko A.V. et al. Interactions of the K<sub>v</sub>1.1 channel with peptide pore blockers: a fluorescent analysis on mammalian cells // Membranes. 2023. Vol. 13, iss. 7. P. 645.

## ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БИОГЕННЫХ СТИМУЛЯТОРОВ НА КУЛЬТУРЫ ГРИБНЫХ ПАТОГЕНОВ

Л. В. Пашкевич, Л. Ф. Кабашникова, В. И. Лукша, Я. Н. Артемчук

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

В настоящее время для повышения урожайности и устойчивости культурных растений к заболеваниям все большее внимание уделяется биологически активным препаратам, обладающим одновременно ростостимулирующим и иммуноиндуцирующим действием. В связи с этим актуальным направлением представляется разработка и организация промышленного производства средств защиты растений (СЗР) на основе отечественных научных разработок, направленных на повышение общей неспецифической устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды путем индукции природных защитных механизмов. Одним из этапов разработки СЗР выступает оценка действия иммуномодулирующих препаратов на основе биогенных стимуляторов иммунитета (глюкан, микробиологический компонент – споры гриба *Trichoderma veride*) на культуры грибных патогенов, выращенные на твердых средах *in vitro*.

Объектом исследования служили фитопатогенные микромицеты – возбудители корневых гнилей *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (штамм 4.34) и *Fusarium oxysporum* sp. (штамма 6.19) из коллекции чистых культур лаборатории иммунитета РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию». Культивирование и сравнительное изучение культурально-морфологических особенностей *B. sorokiniana* проводилось на синтетической агаризованной среде Чапека, *F. oxysporum* – на картофельно-глюкозном агаре. В среду одновременно с высевом грибной культуры добавляли по 1 мл исследуемого раствора, содержащего  $\beta$ -1,3-глюкан или споры *T. veride*, отдельно или в сочетании. После инкубации при 28 °С измеряли диаметр выросших на чашках колоний в двух взаимно перпендикулярных направлениях через определенный промежуток времени (24 ч) в течение 11 дней для гриба *B. sorokiniana* и 5 дней – для *F. oxysporum*. На основе данного параметра рассчитывали радиальную скорость роста грибов [1] и показатель ингибирования роста мицелия [2].

Существенные различия получены в результате вычисления радиальной скорости роста ( $Kr$ ) микромицетов, которая в контроле и варианте с добавлением  $\beta$ -1,3-глюкана значительно превышала варианты опыта, где вносились споры *T. veride*. На фоне *T. veride* показатель  $Kr$  снижался в 1,8–3,3 раза по отношению к контролю для культуры фитопатогенного гриба *B. sorokiniana* и в 4,5–4,7 раза – у *F. oxysporum*. В варианте с *T. veride* ингибирование роста мицелия (%) для гриба *B. sorokiniana* составило  $45,1 \pm 5,6$ , а в варианте с совместным внесением  $\beta$ -1,3-глюкана и спор *T. veride* –  $69,8 \pm 1,8$ . Ингибирование роста мицелия (%) для гриба *F. oxysporum* на фоне гриба *T. veride* было еще более значимым:  $76,5 \pm 1,6$  и  $78,5 \pm 1,6$  в соответствующих вариантах.

Таким образом, в ходе исследования было установлено, что гриб *T. veride* оказывает супрессивное влияние на рост и развитие фитопатогенных микромицетов – возбудителей корневых гнилей, тогда как  $\beta$ -1,3-глюкан стимулирует рост и развитие патогенных грибов в культуре.

### Библиографические ссылки

1. Цитохимические и биохимические методы исследования микроорганизмов – возбудителей болезней растений: учебное пособие / Л. Г. Яруллина [и др.] // Уфа: РИЦ БашГУ, 2016. – 92 с.
2. Бадалян С. М. Антифунгальная активность различных базидиомицетовых макромицетов // Проблемы медицинской микологии. 2004. Т. 6, № 1. С. 18–26.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКРОЗА И АПОПТОЗА ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

**Н. А. Подошлелова<sup>1,2</sup>, А. А. Мишуков<sup>1</sup>, С. И. Обыденный<sup>1,2</sup>, П. А. Соловьева<sup>1</sup>,  
И. А. Чабин<sup>2</sup>, А. Н. Свешникова<sup>1,2</sup>, М. А. Пантелеев<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *ФГБУ науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии  
РАН, Москва, Россия*

<sup>2</sup> *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*

Тромбоциты играют ключевую роль в свертывании крови, в том числе являются одним из основных источников отрицательно заряженных фосфолипидных мембран для сборки ферментативных комплексов. Данную функцию выполняет только часть клеток, экспонирующих на внешнем слое мембраны фосфатидилсерин (ФС). Как правило, ФС появляется на внешнем слое мембраны в процессе клеточной смерти. Несмотря на то, что тромбоциты являются безъядерными, они по всей видимости, в зависимости от условий могут подвергаться как некрозу, так и апоптозу, и роли данных процессов в норме и при патологии могут отличаться.

Целью данной работы было сравнение морфологических и функциональных особенностей некротических и апоптотических тромбоцитов, выявление их патофизиологической роли.

Методы. В качестве модели некроза была выбрана активация тромбоцитов агонистами: коллаген-подобный пептид (CRP), смесь CRP и тромбина, либо смесь CRP с пептидами, активирующими PAR1 и PAR4 рецепторы. В качестве модели апоптоза была выбрана обработка тромбоцитов ингибитором белков Bcl-2 и Bcl-xL (ABT737). Исследование проводилось с использованием методов проточной цитометрии, конфокальной и трансмиссионной электронной микроскопии.

Результаты. В ходе исследования не выявлено существенных морфологических отличий некротических и апоптотических тромбоцитов. Однако, при апоптозе тромбоцитов, в отличие от некроза, не наблюдается связывания антител к р-селектину (CD62p), фактору Виллебранда и фибриногену. Это свидетельствует о том, что в случае апоптоза не происходит секреция альфа-гранул тромбоцитов. Показано, независимо от типа гибели ФС-положительные тромбоциты одинаково связывают факторы свертывания и обладают одинаковой активностью в поддержании прокоагулянтных мембранных реакций.

Исследование кинетики развития процессов гибели тромбоцитов методом проточной цитометрии и конфокальной микроскопии указывают на то, что некроз и апоптоз тромбоцитов реализуются через деполяризацию митохондрий, после которой происходит резкое повышение концентрации внутриклеточного кальция с последующей экстернализацией ФС, разрушением цитоскелета и потерей интактности плазматической мембраны. Отсутствие колебаний концентрации внутриклеточного кальция, предшествующих деполяризации митохондрий, является ключевым отличием между некрозом и апоптозом тромбоцитов.

Таким образом, апоптоз тромбоцитов, запущенный при помощи ABT737, более медленный процесс, чем некроз под воздействием физиологических агонистов. В конечной точке мертвые тромбоциты отличаются по наличию или отсутствию связанных с мембраной альфа-гранулярных белков.

## ВЛИЯНИЕ АНТИАТЕРОГЕННЫХ МУТАЦИЙ мтДНК НА КАЛЬЦИЕВЫЙ ГОМЕОСТАЗ В КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ АТЕРОСКЛЕРОЗА

**М. Ю. Погонялова, П. А. Баженов, А. Ю. Винокуров**

*Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева, г. Орел, Россия*

Атеросклероз имеет связь с нарушением митохондриального генома. Среди ассоциированных с патологией мутаций мтДНК выделяют как атерогенные, так и антиатерогенные [1]. Механизмы влияния обеих групп мутаций представляют значительный интерес. В патологическом процессе участвуют различные типы клеток, среди которых значительная роль отводится моноцитам и образующимся из них макрофагам [2]. Известно, что поляризация макрофагов может приводить к образованию клеток типов М1 и М2, характеризующихся соответственно про- и противовоспалительными профилями. При этом типы макрофагов имеют значительные различия в развитии кальциевого сигнала [3]. Известно, что для макрофагов типа М1 характерно большое количество ионотропных рецепторов P2X, а для М2 – метаболитных рецепторов P2Y [4]. Целью данной работы являлось исследование возможной связи между уровнем гетероплазмии антиатерогенных мутаций мтДНК и изменениями системы кальциевого гомеостаза в контексте влияния на развитие атеросклероза.

В исследовании были использованы четыре линии цитоплазматических гибридов, созданных на базе клеток ТНР-1 и тромбоцитов пациентов с диагностированным атеросклерозом, у которых выявлены различные комбинации антиатерогенных мутаций мтДНК (m.1555A>G, m.14846G>A, m.13513G>A). Исследование кальция в цитозоле и митохондриях проводили с помощью зондов Fluo-4 AM и X-Rhod-1 AM соответственно.

Полученные результаты позволяют говорить о значительном влиянии исследуемых мутаций на кальциевый гомеостаз клеток цибридов. Во всех исследуемых линиях происходит снижение амплитуды кальциевого ответа на АТФ по сравнению с ТНР-1. Но на бескальциевой среде наблюдается схожая или увеличенная по сравнению с ТНР-1 картина, что может быть следствием более высокого уровня кальция в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), увеличения экспрессии P2Y рецепторов или участников передачи сигнала при активации метаболитных рецепторов. В эксперименте с последовательным внесением ингибитора Са-АТФазы и АТФ в цибридах происходит снижение амплитуды ответа на тапсигаргин, что говорит об уменьшении Са в ЭПР. Однако сопоставимый ответ на последующее внесение АТФ, а также ответ на АТФ в эксперименте с ингибитором фосфолипазы С U73122 свидетельствуют о схожем с ТНР-1 уровнем P2X рецепторов. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об эффекте антиатерогенных мутаций мтДНК на изменения в кальциевом сигналинге. Дальнейшие исследования позволят выяснить, какое влияние это оказывает на метаболический профиль клеток и их возможное противовоспалительное действие.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00317.

### Библиографические ссылки

1. New markers of atherosclerosis: a threshold level of heteroplasmy in mtDNA mutations / M. A. Sazonova [et al.] // *Vessel Plus*. 2017. Vol. 1. P. 182–191.
2. Human atherosclerosis: new participants? / Y. A. Romanov [et al.] // *Frontiers in Cardiovascular Health*. 2003. P. 55–72.
3. *Liu H.* Mitochondrial contact sites in inflammation-induced cardiovascular disease // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020. Vol. 8. P. 692.
4. Intercellular calcium signaling induced by ATP potentiates macrophage phagocytosis / S. Zumerle [et al.] // *Cell reports*. 2019. Vol. 27, iss. 1. P. 1–10.

## СВЯЗАННЫЕ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ МУТАЦИИ МТДНК ВЛИЯЮТ НА БАЛАНС МЕЖДУ ФОРМАМИ И ЛОКАЛИЗАЦИЕЙ ПРОДУКЦИИ АФК В КЛЕТКАХ

**Д. Ю. Попов, М. С. Казаков, Е. Ю. Шитикова, А. Ю. Винокуров**

*Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева, г. Орёл, Россия*

Атеросклероз – это хроническое заболевание, вызванное воспалением в стенках артерий, инициатором которого является накопление липидов в стенках артерий. При развитии воспаления образуются макрофаги, представленные, в основном, двумя типами – М1 (провоспалительные, проатерогенные) и М2 (антивоспалительные, антиатерогенные). Митохондрии играют важнейшую роль в регуляции поляризации, дифференцировки и выживания макрофагов. Изменения метаболизма и физиологии митохондрий в результате мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК) могут лежать в основе соответствующего состояния активации макрофагов. Показано, что для одних мутаций характерен антиатерогенный эффект, а для других – проатерогенный [1]. Наличие мутаций в мтДНК может приводить к нарушению окислительно-восстановительного баланса между образованием и нейтрализацией активных форм кислорода (АФК), который чрезвычайно важен для поддержания нормальной физиологии клеток. В связи с этим представляет значительный интерес выяснение связи между происходящими изменениями в продукции АФК и функциональной поляризацией макрофагов [2].

В работе использованы линии цитоплазматических гибридов с разным набором мутаций мтДНК, ассоциированных с атеросклерозом. В целях оценки скорости продукции АФК использовали флуоресцентные зонды H<sub>2</sub>DCF-DA (на внутриклеточную перекись водорода), ди гидроэтидий (цитозольный супероксиданион-радикал) и MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XRos (супероксиданион-радикал в матриксе митохондрий) с регистрацией сигнала методами флуоресцентной и конфокальной микроскопии.

Полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии ассоциированных с атеросклерозом мутаций мтДНК на изменение продукции клетками АФК. В клетках с высоким уровнем гетероплазмии антиатерогенных мутаций мтДНК не наблюдается гиперпродукции супероксиданион-радикала в цитозоле и матриксе митохондрий, однако увеличено образование перекиси водорода. В то же время клетки с существенными уровнями проатерогенных мутаций мтДНК демонстрируют значительный рост продукции супероксиданион-радикала как в цитозоль, так и в матриксе митохондрий, а также сниженный уровень внутриклеточной перекиси водорода, что может говорить о нарушении работы супероксиддисмутазы, характерном для провоспалительных макрофагов М1 типа. При этом в случае одновременного наличия двух типов повреждений мтДНК антиатерогенные мутации могут снижать гиперпродукцию АФК, в частности, в матриксе митохондрий.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-15-00317.

### **Библиографические ссылки**

1. Mosaicism of mitochondrial genetic variation in atherosclerotic lesions of the human aorta / М. А. Sazonova [et al.] // Biomed Res Int. 2015. Vol. 2015. P. 825468.
2. The reactive oxygen species in macrophage polarization: reflecting its dual role in progression and treatment of human diseases / Н.-Y. Tan [et al.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016. Vol. 2016. P. 1–16.

# ВЛИЯНИЕ NaCl НА РОСТ КОРНЯ И ПРОЦЕССЫ Ca<sup>2+</sup>-СИГНАЛИЗАЦИИ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

А. А. Пушкина, А. В. Козел, В. С. Мацкевич

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь*

Засоление почвы – это процесс накопления избыточного количества легкорастворимых солей в почвенном растворе, приводящий к подавлению роста высших растений. Засоленные почвы являются крайне неблагоприятным фактором, негативно влияющим на прорастание семян, рост культур и продуктивность большинства растений, за исключением галофитов [1]. Более 800 миллионов гектаров земли (около 6% от общей площади земли) подвержены воздействию избыточных концентраций солей [2], что является основным лимитирующим фактором для ведения сельского хозяйства. В настоящее время все более актуальным становится проблема вторичного засоления, обусловленного антропогенными источниками. К ним относятся выбросы отходов соледобывающих предприятий и химических заводов, внесение минеральных удобрений, а также применение антигололедных смесей на урбанизированных территориях и автомобильных дорогах. В связи с этим изучение механизмов действия засоления на растения имеет большое значение для обеспечения сохранения окружающей среды, продовольственной безопасности и устойчивого развития сельскохозяйственных регионов. Целью настоящей работы – исследовать влияние NaCl на ростовые и сигнальные процессы у модельных растений *Arabidopsis thaliana* L. Heynh., а также важных для Беларуси сельскохозяйственных культур *Triticum aestivum* L. и *Pisum sativum* L. Для изучения изменения морфометрических показателей были проведены стандартизированные фенотипические тесты. Для анализа индукции кальциевой сигнализации использовался метод Ca<sup>2+</sup>-эквориновой люминометрии. В ходе работы были получены следующие результаты: 1) Концентрации NaCl, свыше 50 мМ, вызывали ингибирование роста осевых органов пшеницы и гороха. 2) Корень демонстрировал большую чувствительность к солевому стрессу по сравнению с надземной частью растения, особенно это было заметно у проростков гороха. 3) Добавление антиоксиданта-скавенджера HO• – диметилсульфоксида (0,3% ДМСО) в среду выращивания позволило снизить ингибирующий эффект соли на ростовые процессы у пшеницы и гороха. 4) Добавление к корням *A. thaliana* растворов NaCl вызывало повышение уровня свободного Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>цит.</sub>). При этом с повышением концентрации хлорида натрия уровень [Ca<sup>2+</sup>]<sub>цит.</sub> стремительно увеличивался, достигая максимума при обработке 200 мМ NaCl (увеличение в 11,8 раз по сравнению с контролем), что коррелировало с описанными для данной концентрации токсическими эффектами: индукцией окислительного стресса, снижением жизнеспособности клеток, ингибированием роста и гибелью. 5) Добавление 0,3% ДМСО значительно снижало пиковый уровень NaCl-индуцируемого сигнала [Ca<sup>2+</sup>]<sub>цит.</sub>. Таким образом, активные формы кислорода, синтезируемые при солевом стрессе, вероятно, играют важную роль в запуске Ca<sup>2+</sup>-сигнализации, а введение молекулярных антиоксидантов может снижать токсические эффекты NaCl.

## Библиографические ссылки

1. Plant hormone regulation of abiotic stress responses / R. Waadt [et al.] // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2022. Vol. 23. P. 680–694.
2. Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance // Annual Review of Plant Biology. 2008. Vol. 59. P. 651–681.

## ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО ГОССИПОЛ ДИЗАМИНО НА АТФ ЗАВИСИМЫЙ КАЛИЕВЫЙ КАНАЛ МИТОХОНДРИЙ

А. Д. Рахимов<sup>1</sup>, М. К. Позилов<sup>2</sup>, Н. Х. Якубова<sup>3</sup>, М. Б. Гафуров<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики и биохимии НУУз, Ташкент, Узбекистан

<sup>2</sup>Национальный университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

**Актуальность исследования.** В последнее время широкий интерес исследователей привлекает митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал (митоК<sub>АТФ</sub>-канал). Известно, что митоК<sub>АТФ</sub>-канал играет важную регуляторную роль в формировании адаптационных реакций организма в условиях гипоксии [1, 2] и в условиях ишемии при протекции кардиомиоцитов сердца [3]. Увеличение количества митохондрий приводит к ускорению процессов перекисного окисления липидов в мембранах. Липиды, особенно фосфолипиды, выполняют важные функции в формировании клеточных мембран, клеточных сигнальных путях и накоплении энергии. Многие возрастные заболевания, в том числе сердечно-сосудистые заболевания, диабет, заболевания почек, ревматоидный артрит и нейродегенеративные заболевания, связаны с нарушениями липидного обмена. Митохондриальная дисфункция и повышенное производство активных форм кислорода (АФК) приводят к изменениям липидного обмена и усилению окисления липидов [4, 5]. Полифенолы широко используются в качестве фармакологических корректирующих средств при дисфункции митохондриальных мембран.

**Материалы и методы исследования.** Эксперименты проведены в условиях *in vitro* на чистопородных крысах-самцах массой 180–200 г. Выделение митохондрий из сердца крыс проводили методом дифференциального центрифугирования. После вскрытия грудной полости, сердце выделяли и помещали в охлажденную среду. Состав разделительной среды следующий: сахароза 300 мМ, трис-НСl – 10 мМ, ЭДТА – 2 мМ, альбумин – 0,2%, рН – 7,4. Для определения проницаемости митохондриальной мембраны использовали следующую инкубационную среду: 125 мМ КСl, 10 мМ Нерес, 5 мМ сукцинат, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,005 мМ ротенон и 0,001 мМ олигомицин, рН 7,4. Скорость распада митохондрий определяли при количестве белка в среде 0,3 мг/мл. Активность сердечного митоК<sub>АТФ</sub>-канала определяли путем регистрации изменения оптической плотности на длине волны 540 нм (A<sub>540</sub>) на спектрофотометре V-5000 в кюветах объемом 3 мл. Статистическую обработку полученных результатов и рисование изображений проводили с помощью компьютерной программы OriginLab Corporation, США. При этом P<0,05; P<0,01; значение представляет статистическую надежность.

**Полученные результаты и их обсуждение.** Диазоксид, классический активатор митоК<sub>АТФ</sub>-канала, увеличивает проницаемость ионов калия. В нашем следующем эксперименте сравнивали влияние диазооксида и диазоиминопроизводного госсипола полифенола ЯН-1 на активность митоК<sub>АТФ</sub>-каналов. За контроль (100%) принимали проницаемость митоК<sub>АТФ</sub>-канала в отсутствие АТФ в среде инкубации, при этом оптическая плотность митохондрий сердца составила 0,349. В присутствии 200 мкМ АТФ в инкубационной среде A<sub>540</sub> составляла 0,155, при этом было обнаружено, что активность митоК<sub>АТФ</sub>-канала ингибировалась на 55,6% по сравнению с контролем. Концентрация 10 мкМ полифенольного вещества ЯН-1, диазоиминопроизводного госсипола, повышает активность сердечных митоК<sub>АТФ</sub>-каналов по сравнению с присутствием

АТФ ( $A_{540}=0,245$ ). 50 мкМ диазоксид приводит к изменению оптической плотности до 0,272, 50 мкМ диазоксид и 10 мкМ полифенола ЯН-1 изменяют оптическую плотность соответственно до 0,287.

Согласно полученным результатам, 10 мкМ полифенола ЯН-1, производного госсипола, увеличивает проницаемость сердечных митохондриальных К<sup>+</sup>-каналов на 70,2%, 10 мкМ диазоксид на 77,9%, 50 мкМ диазоксид и полифенола ЯН-1. Было обнаружено, что концентрации 10 мкМ в данных условиях увеличиваются на 82,2%.

### Библиографические ссылки

1. *Szewczyk A., Jarmuszkiewicz W., Kunz W. S.* Mitochondrial potassium channels // *IUBMB Life*. 2009. Vol. 61, iss. 2. P. 134–143.

2. *Пожилова Е. В., Новиков В. Е., Левченко О. С.* Митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал и его фармакологические модуляторы // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2016. Т. 14, № 1. С. 29–36.

3. *Tinker A., Aziz Q., Thomas A.* The role of ATP-sensitive potassium channels in cellular function and protection in the cardiovascular system // *Br J Pharmacol*. 2014. Vol. 171, iss. 1. P. 12–23.

4. Mitochondrial DNA damage associated with lipid peroxidation of the mitochondrial membrane induced by Fe<sup>2+</sup>-citrat / *A. M. Almeida [et al.]* // *An. Acad. Bras. Cienc*. 2006. Vol. 78, iss. 3. P. 505–514.

5. *Ademowo O. S., Dias H. K. I., Burton D. G.* Lipid (per) oxidation in mitochondria: an emerging target in the ageing process? // *Biogerontology*. 2017. Vol. 18, iss. 6. P. 859–879.

## ТЕТРАФЕНИЛБОРАТ УСИЛИВАЕТ ПРОТОНОФОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ФОСФОНИЕВЫХ ИЛИДОВ НА МОДЕЛЬНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ

**Т. И. Рокицкая, Р. С. Кирсанов, Л. С. Хайлова, Ю. Н. Антоненко**

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

Недавно нами было показано, что предшественники стабилизированных фосфониевых илидов такие, как (децилоксикарбонилметил)трифенилфосфоний бромид (СМТРР-С10) и его аналоги с разной длиной алкила, переносят ионы водорода через искусственные липидные мембраны, а также мембраны митохондрий и хлоропластов [1]. Введение метильных заместителей в фенильные группы фосфониевых солей значительно усиливает протонофорную активность предшественников фосфониевых илидов на плоских бислойных липидных мембранах (БЛМ) и выделенных митохондриях печени крысы.

Синтезированные нами предшественники стабилизированных фосфониевых илидов являются протонофорами катионного типа, поскольку могут находиться либо в катионной заряженной форме, либо цвиттерионной нейтральной форме. В результате наибольший транспорт протонов, опосредованный этими соединениями, наблюдается при формировании БЛМ из липидов с простыми эфирными связями. В таких липидах отсутствуют карбонильные группы, которые вносят большой вклад в величину скачка дипольного потенциала мембраны, замедляющего проникновение липофильных катионов через липидные мембраны. Нами было обнаружено, что индуцированный илидами протонный транспорт через БЛМ, сформированную из дифитаноилфосфатидилхолина (липид со сложноэфирными связями), увеличивается в десятки раз при добавлении наномолярных концентраций тетрафенилбората. Этот эффект вызван ускорением стадии проникновения через липидные мембраны катионной формы илида при образовании комплекса его с тетрафенилборатом. Ранее было показано, что липофильный анион тетрафенилборат ускоряет проникновение липофильных катионов и в частности тетрафенилфосфония [2].

Мы сравнили протонофорные способности метилированных в фенильных группах илидов на липосомах, нагруженных рН-индикатором пиранином. При формировании липосом из смеси липидов со сложноэфирными связями микромолярные концентрации илидов вызывали очень медленное изменение рН внутри липосом. Однако добавление наномолярных концентраций тетрафенилбората значительно ускоряло выход протонов из липосом. В случае формирования липосом из дифитанилфосфатидилхолина (липид с простыми эфирными связями) предшественники стабилизированных фосфониевых илидов в концентрации 200 нМ индуцировали быстрое изменение рН внутри липосом.

На выделенных митохондриях печени крысы тетрафенилборат также усиливал разобщающую активность предшественников стабилизированных илидов, однако действующие концентрации его были на два порядка выше чем на модельных мембранах. По-видимому, тетрафенилборат слабо накапливается в митохондриях из-за отрицательного потенциала в матриксе.

### Библиографические ссылки

1. Ester-stabilized phosphorus ylides as protonophores on bilayer lipid membranes, mitochondria and chloroplasts / R. S. Kirsanov [et. al.] // Bioelectrochemistry. 2023. Vol. 150. P. 108369.

2. *Stark G.* Negative hydrophobic ions as transport-mediators for positive ions: evidence for a carrier mechanism // Biochim. Biophys. Acta. 1980. Vol. 600. P. 233–237.

## ЭЛЕКТРОГЕНЕЗ АФФЕРЕНТНЫХ ВОЛОКОН *CHORDA TYMPANI* ПРИ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ ЯЗЫКА ПИЩЕВЫМИ СТИМУЛАМИ С ЦИТРУСОВЫМ ВКУСОМ

Ю. И. Рудак, Е. Н. Саваневская

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

Вкусовое ощущение формируется благодаря поступлению к нейронам мозга электрических импульсов от многих совместно активированных волокон, изменяющих характер электрогенеза в зависимости от типа и количества активированных синаптически связанных с ними вкусочувствительных клеток. Понимание этой схемы позволяет влиять на характер вкусового впечатления путем модификации химического состава вкусового стимула. Тем не менее, биоэлектрические процессы, протекающие на уровне проводникового отдела вкусового анализатора при рецепции многокомпонентных вкусовых раздражителей, пока изучены слабо. Целью работы является определение уровня импульсации афферентных нервных волокон барабанной струны крысы при вкусовой рецепции стимулов с цитрусовым вкусом.

Для эксперимента были использованы 18 белых лабораторных крыс. Эксперименты были проведены с учетом положений Европейской конвенции об обращении с лабораторными животными [1]. Применялся уретановый наркоз (1 г/кг). Проводилась регистрация афферентной импульсной активности в барабанной струне (*Chorda tympani*). Нерв размещали на биполярном хлорсеребряном электроде. Активный и заземляющий электроды подключали на вход усилителя аппаратно-программного комплекса «Нейрон-Спектр 4» (ООО «Нейрософт», РФ). В качестве проб осуществлялось предъявление на язык конфеты-леденца со вкусом апельсина (осколок диаметром 5 мм, предварительно смоченный в воде), а также 1 капли апельсинового сока. В качестве контрольного стимула в первом случае выступала вода (1 капля), а во втором – смоченный питьевой водой ватный тампон, идентичный по диаметру. Регистрация проводилась в течение 10 мин. Анализировалась средняя частота сигнала (имп./с).

Установлено, что предъявление на язык продуктов питания, обладающих выраженным цитрусовым вкусом, не во всех случаях сопровождается заметной реакцией афферентных волокон в составе барабанной струны. Применение в качестве стимула предварительно смоченной конфеты-леденца с апельсиновым вкусом не приводило к значимым изменениям параметров импульсации нерва. Среднее значение частоты импульсации в фоновой записи составило  $8,2 \pm 0,5$  имп./с, после стимуляции рецепторов языка –  $7,8 \pm 0,5$  имп./с.

Предъявление же апельсинового сока сопровождалось достоверным изменением частотных характеристик импульсации *Chorda tympani*. После воздействия наблюдалось снижение частоты импульсации с  $8,2 \pm 0,6$  имп./с до  $6,5 \pm 0,4$  имп./с ( $p < 0,05$ ). Таким образом, при нанесении на язык раздражителя с меньшим содержанием глюкозы и более высоким содержанием кислот, частота импульсации *Chorda tympani* снизилась.

В ходе исследования был проведен сравнительный анализ афферентной активности барабанной струны в условиях предъявления на язык двух многокомпонентных вкусовых раздражителя с апельсиновым вкусом. Только стимуляция рецепторов языка соком апельсина сопровождалась изменением импульсации волокон *Chorda tympani*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке ГПНИ (№ГР 20211944), БРФФИ (Б24МВ-013)

### **Библиографические ссылки**

1. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasbourg : Europ. Treaty Series, 1986. – 48 p.

## РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО КОМПЛЕКСА ДЛЯ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

**А. С. Савицкий, В. Ю. Бондаренко, В. В. Демидчик**

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

В настоящее время измерение фенотипических параметров растений является одним из узких мест в масштабных экспериментах, поскольку традиционно такие измерения проводятся вручную [1]. Попытки решить эту проблему привели к развитию феномики – новой омиксной области науки на стыке биологии, информатики и инженерии. Феномика позволяет оптимизировать и автоматизировать процесс анализа фенотипических свойств растений, переводя их в массивы цифровых данных, схожие с таковыми в геномике и протеомике. Внедрение так-называемого высокопроизводительного цифрового фенотипирования перевело описание морфологических признаков растений на новый уровень. В последнее время, благодаря применению библиотек компьютерного зрения, процесс обработки информации о фенотипе стал еще более эффективным [2]. Примечательно, что внедрение анализа цифровых изображений растений с применением алгоритмов машинного зрения позволило выявить ряд закономерностей в процессах роста и развития растений, которые не было ранее известны [2]. В представленной работе была предпринята попытка разработки программного комплекса для фенотипирования растений *Arabidopsis thaliana* в асептической культуре (вертикальный рост в пластиковых чашках на гелевой среде Phytogel™). Работа проводилась с использованием библиотеки компьютерного зрения OpenCV, включающей в себя разнообразные инструменты анализа изображений [3]. Также использовалась библиотека машинного обучения scikit-learn для обучения предсказательной модели, принимающей на вход площади листьев и корней и выдающей в качестве предсказания значений сырой и сухой биомассы [3]. Для генерации отчетов, файлов выходных данных использовалась библиотека Pandas [3]. В результате был разработан комплекс алгоритмов, позволяющий выявлять в изображении корни и листья и проводить их анализ. Программа способна определять площадь зеленой части растений и корней, и генерирует отчет, содержащий вычисленные параметры. Отчет может использоваться для обучения предсказательной модели. Обученная модель имела точность 96,6% по метрике R-квадрата на тестовой выборке. При разработке программы была заложена функция работы в автоматическом режиме, все, что требуется от пользователя – это ввести исходные данные. Разработанное программное обеспечение позволяет значительно ускорить анализ фенотипических данных, а применение предсказательной модели делает возможным первичную оценку влияния стресс-факторов на модельный объект. Технология может быть использована в физиологии растений и селекции стрессоустойчивых растений.

### **Библиографические ссылки**

1. Phenotyping: new windows into the plant for breeders / M. Watt [et al.] // Annual review of plant biology. 2020. Vol. 71. P. 689–712.
2. An image processing approach for measurement of chili plant height and width under field conditions / C. Gupta [et al.] // Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 2022. Vol. 21, iss. 3. P. 171–179.
3. An automated, high-throughput plant phenotyping system using machine learning-based plant segmentation and image analysis / U. Lee [et al.] // PloS one. 2018. Vol. 13, iss. 4. P. e0196615.

## ВЗАИМОСВЯЗЬ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ И АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

**Г. С. Свидельская<sup>1-3</sup>, А. А. Игнатова<sup>1</sup>, Е. А. Пономаренко<sup>1</sup>, И. В. Миндукшев<sup>4</sup>,  
С. П. Гамбарян<sup>4</sup>, М. А. Пантелеев<sup>1-3</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup>ЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия

<sup>4</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова,  
Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Метод малоуглового светорассеяния (Low angle light Scattering – LaSca) позволяет оценить агрегацию и изменение формы тромбоцитов при их активации [1]. В доступной литературе сведения о связи маркеров активации с агрегацией тромбоцитов, оцененной методом LaSca, отсутствуют. Между тем подобные исследования могут существенно расширить понимание механизмов тромбоцитарного гемостаза.

**Цель работы.** Изучение связи между маркерами активации и показателями агрегации тромбоцитов, исследованных методом LaSca.

**Материалы и методы.** В исследование включены здоровые взрослые добровольцы (n=16). Агрегацию тромбоцитов измеряли на лазерном анализаторе частиц LaSca-T (Biomedical systems, Санкт-Петербург) при температуре 23 °С и перемешивании 1200 об/мин. Тромбоциты, разбавленные в модифицированном HEPES буфере, активировали 800 нМ аденозидифосфата (АДФ). Полученные индикатрисы рассеяния характеризовали начальную скорость  $V_{ia}$ , амплитуду агрегации  $\Delta I(1)$  и изменение формы тромбоцитов  $\Delta I(12)$ . Для проточной цитометрии цельную кровь разводили в 21 раз буфером Тироде. Сильную активацию тромбоцитов индуцировали смесью из коллаген-подобного белка CRP (1,25 мкг/мл), пептида, активирующего рецептор тромбина SFLLRN (12,5 мкМ) и 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Слабую активацию – смесью АДФ (5 мкМ) и 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Оценивали экспрессию Р-селектина (уровень CD62p) и активированную форму гликопротеина  $\alpha IIb\beta 3$  (PAC-1).

**Результаты и обсуждение.** Выявлена высокая корреляция  $V_{ia}$  и PAC-1 как при сильной ( $r=0,83$ ,  $p<0,001$ ), так и при слабой активации ( $r=0,7$ ,  $p<0,01$ ). Существует умеренная корреляция между  $\Delta I(1)$  и PAC-1: при сильной активации  $r=0,46$ ,  $p=0,08$ , при слабой  $r=0,45$ ,  $p=0,07$ . Обнаружена сильная корреляция параметров агрегации с уровнем CD62p при активации сильными агонистами  $r>0,60$ ,  $p\leq 0,01$ . Уровень Р-селектина тромбоцитов при слабой активации АДФ не связан с параметрами агрегации тромбоцитов  $p>0,47$ . Параметр  $\Delta I(12)$  не связан с параметрами активации тромбоцитов ( $r<0,4$ ,  $p>0,3$ ).

**Заключение.** Наличие положительной корреляции между параметрами агрегации и уровнем Р-селектина и активированной формы гликопротеина  $\alpha IIb\beta 3$  дает основание полагать, что формирование небольших тромбоцитарных агрегатов связано с уровнем активации этих клеток.

Исследование поддержано фондом «Наука-детям».

### Библиографические ссылки

1. Low angle light scattering analysis: a novel quantitative method for functional characterization of human and murine platelet receptors / I. Mindukshev [et al.] // Clin. Chem. Lab. Med. Germany. 2012. Vol. 50, iss. 7. P. 1253–1262.

**УВЕЛИЧЕНИЕ НИТРИТНОЙ НАГРУЗКИ ВЫЗЫВАЕТ МОДИФИКАЦИЮ  
ВРЕМЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК СПАЙКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ПЕРОКСИДА  
ВОДОРОДА В ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ НЕЙРОНАХ  
*LYMNAEA STAGNALIS***

**А. В. Сидоров**

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Возрастание нитратной нагрузки, связанное с широким использованием минеральных удобрений в сельскохозяйственной практике, в сочетании с последующим превращением нитрат-аниона в нитрит-анион, который, в свою очередь, может выступать в качестве источника образования монооксида азота, молекулы с выраженными свободно-радикальными свойствами, может существенно изменить текущее редокс-равновесие практически в любой клетке организма. Активные формы кислорода рассматриваются как одни из основных участников процессов внутриклеточной и межклеточной сигнализации, в том числе в нервной ткани у позвоночных и беспозвоночных животных [1, 2]. Сочетанное действие этих факторов способно изменить функциональные характеристики нервных клеток, однако специфичность эффектов (или её отсутствие) в отношении нейронов, использующие различные виды нейромедиатора (-ов), остаётся невыясненной.

При помощи микроэлектродной техники исследования проанализированы показатели спонтанных потенциалов действия идентифицированных дофамин- (RPeD1) и серотонин- (LPeD1) содержащих клеток центральной нервной системы моллюска *Lymnaea stagnalis* [3] в ответ на приложение пероксида водорода ( $H_2O_2$ , 1 мМ). Установлено, что нанесение  $H_2O_2$  в указанной концентрации на поверхность препарата изолированной ЦНС не приводит к статистически достоверным изменениям временных и амплитудных характеристик спайка в обоих исследованных нейронах. Предварительное, недельное, нахождение животных в аквариумах, содержащих нитрит натрия (10 мМ) приводит к изменению характера ответов со стороны исследованных нейронов в ответ на приложение пероксида водорода (1 мМ). В частности, отмечено статистически достоверное, в 1,1 раза, возрастание длительности следовой гиперполяризации при сохранении неизменности временного хода фаз де- и реполяризации потенциала действия нейрона RPeD1. В отношении нейрона LPeD1, эффекты  $H_2O_2$  были более заметны – выявлено 1,3-кратное увеличение длительности следовой гиперполяризации в сочетании с увеличением времени фазы деполяризации (в 1,2 раза), отмечаемой на фоне 1,1-кратного снижения длительности фазы реполяризации спайка. Амплитудные характеристики (амплитуды порога, спайка, следовой гиперполяризации) потенциала действия RPeD1 и LPeD1, при этом, оставались статистически достоверно неизменными в случае нанесения пероксида водорода на поверхность препарата изолированной ЦНС.

В условиях нитритной нагрузки характер реакции нервной клетки на действие пероксида водорода зависит от её функциональной принадлежности и типа используемого нейромедиатора, что может быть связано с различиями в чувствительности  $Na^+$  и  $K^+$  проводимостей мембраны к действию свободно-радикальных форм азота и кислорода.

### Библиографические ссылки

1. *Holmström K. M., Finkel T.* Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2014. Vol. 6. P. 411–421.

2. *Сидоров А.В.* Функциональная активность нервных центров беспозвоночных. Минск: БГУ, 2011. – 247 с.

3. *Шахрани М., Сидоров А. В.* Сравнительная характеристика электрофизиологических показателей, идентифицированных дофаминергических (R.Pe.D.1) и серотонинергических (L.Pe.D.1) нейронов центральной нервной системы моллюска *Lymnaea stagnalis* // *Журн. БГУ. Биология.* 2017. Т. 3. С. 3–9.

## РОЛЬ СОЕДИНЕНИЙ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ В МЕХАНИЗМАХ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ К ЗАРАЖЕНИЮ ФИТОФТОРОЙ

А. А. Смирнов, Е. М. Кабачевская, С. В. Суховеева, И. Д. Вологовский

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь*

Картофель – одна из самых востребованных в мире сельскохозяйственных культур, основным негативным фактором возделывания которой является высоко инвазивное заболевание фитофтороз, вызываемое оомицетом *Phytophthora infestans*. Несмотря на многочисленные многолетние исследования, до сих не удается разработать высокоэффективные и универсальные методы борьбы с фитофторозом. Это связано с высокой изменчивостью и быстрой приспособляемостью фитофторы. Для разработки новых способов борьбы с данным фитопатогеном важное значение имеет углубленное понимание внутриклеточных механизмов формирования защитных реакций растения. В частности, актуальным представляется оценка роли в развитии защитных реакций картофеля различных групп вторичных метаболитов, таких как фенолпропаноиды и другие фенольные соединения (ФС). Особый интерес вызывает проведение сравнительного анализа защитных реакций сортов картофеля, контрастных по устойчивости к фитофторозу, и выявление особенностей иммунитета устойчивых и неустойчивых сортов.

Проведен анализ динамики общего содержания ФС, а также ключевой группы фенолпропаноидов – гидроксикоричных кислот (ГКК) в течение 3 дней после инфицирования фитофторой листьев картофеля сортов, различающихся по устойчивости к фитофторозу: Вектар, Лилея, Скарб, Зорачка, Уладар с баллами устойчивости 8, 5, 5, 4, 3, соответственно (чем меньше балл, тем ниже устойчивость). Обнаружено, что для листьев высокоустойчивого сорта Вектар в течение всех 3 дней заражения характерно стабильно более высокое содержание ФС (8–10%) и ГКК (12–14%) по сравнению с контролем. В листьях среднеустойчивых сортов с баллом устойчивости 5 в первый день заражения фиксировался быстрый (даже больший, чем у Вектара) рост накопления ФС (на 22% у Скарба, на 25% у Лилеи) и ГКК (18% у Лилеи, 37% у Скарба). У Зорачки с баллом устойчивости 4 максимум увеличения ФС (16%) и ГКК (20%) выявлен на 2-ой день заражения. При этом в листьях Лилеи содержание ФС и ГКК быстро падало уже на второй день, у сорта Скарб резкое снижение ФС отмечено к третьему дню после инфицирования, у Зорачки к 3-ему дню содержание ФС и ГКК также снижалось. У сорта Уладар с баллом устойчивости 3 в первый день после заражения листьев фитофторой обнаружено пониженное (85–90% от контроля) содержание ФС и ГКК, затем наблюдалось постепенное их увеличение таким образом, что лишь на 3 день после инфицирования содержание изучаемых групп веществ превосходило контроль на 10–14%.

В целом, можно говорить о том, что в листьях исследованных высокоустойчивого и среднеустойчивых сортов уровень содержания ФС и ГКК возрастает на достаточно ранних этапах развития ответа и сохраняется повышенным относительно контроля до 3 суток после инфицирования. Однако неустойчивый сорт в первые два дня после заражения отвечал снижением их содержания. Эти данные свидетельствуют о том, что ФС являются одной из составляющих ответа картофеля на действие фитофторы.

## ИЗУЧЕНИЕ ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫХ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МЕХАНИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ФИБРОБЛАСТОВ *IN VITRO*

**М. Н. Стародубцева<sup>2</sup>, А. Н. Шклярова<sup>1</sup>, И. А. Челнокова<sup>1</sup>, О. В. Шаховская<sup>1</sup>,  
Т. Д. Матвеевкова<sup>1</sup>, А. Е. Сусленкова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт радиобиологии НАН Беларуси, Беларусь*

<sup>2</sup>*Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь*

Прогрессирование возраст-зависимых патологий приводит к увеличению числа процедур медицинской визуализации с использованием ионизирующего излучения (рентгеноскопии, рентгенографии, компьютерной томографии и др.), а также процедур лучевой терапии. Фибробласты, клеточные элементы собственно соединительной ткани являются долгоживущими клетками и считаются системными индикаторами возраста всего организма. Характерными особенностями стареющей ткани и клеток являются изменения их механических свойств и поведения. Целью исследования являлось выявление различия в механических и ряда функциональных свойств фибробластов крысы в зависимости от возраста животного и поглощённой дозы при облучении культуры клеток рентгеновским излучением *in vitro*.

Первичные культуры фибробластов получали из кожи и легкого 6 и 13 мес. крыс самцов линии Wistar. Облучение фибробластов проводили с использованием рентгеновского аппарата X-Rad 320 Precision X-ray Inc. (320 кВ, 12,5 мА, 5 Гр/мин, фильтр №1 (2 мм Al), расстояние до объекта – 40 см). Клетки 0–2 пассажей высеивали в чашки Петри в среде DMEM/F12 и инкубировали 24 ч. Оценка структурных, механических свойств проводили с помощью атомно-силового микроскопа Bioscope Resolve (Bruker), оценку редокс-параметров сред – с использованием методики, основанной на люминол-зависимой хемилюминесценции системы с генератором свободных радикалов – органическим азосоединением АБАП, оценку уровня экспрессии коллагена IV типа – с использованием иммуноцитохимического окрашивания клеток.

Выявлено, что жесткость поверхности фибробластов 13 мес. крыс существенно увеличивается с увеличением поглощенной дозы в диапазоне доз 1–10 Гр. При этом, хотя жесткость поверхности фибробластов 6 мес. крыс не меняется значительно, на поверхности клеток имеет место перераспределение субмикронных участков с разными упругими свойствами. При дозе 10 Гр в структуре цитоскелета появляется  $\alpha$ -SMA. Сила неспецифической адгезии поверхности клеток к острию АСМ зонда значительно уменьшается после облучения фибробластов 13 мес. крыс рентгеновским излучением в дозовом интервале 1–10 Гр. При этом, сила адгезии, измеренная для молодых крыс, значительно увеличивается при дозе 10 Гр, однако в интервале доз 1–10 Гр на наномасштабе имеет место пространственное перераспределение участков поверхности клеток с разными адгезионными свойствами. При облучении рентгеновским излучением культур фибробластов *in vitro* имеет место изменение параметров выделения ими в межклеточное пространство различных веществ. Рентгеновское излучение в дозе 3–10 Гр вызывает резкое увеличение производства АФК фибробластами 13 мес. крыс. Для более молодых крыс рентгеновское излучение изменяет параметры редокс-свойств межклеточной среды фибробластов более сложным образом. С увеличением поглощённой дозы до 10–100 Гр имеет место повышение синтеза фибробластами коллагена IV.

В работе установлены возраст-зависимые радиационно-индуцированные различия параметров механических и функциональных свойств поверхности фибробластов крыс при облучении культуры клеток рентгеновским излучением *in vitro*.

# ГРАВИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛИСАХАРИДНОГО СОСТАВА КЛЕТОК СТЕБЛЕЙ ТОМАТА ПРИ ДЕЙСТВИИ ГРАВИСТИМУЛЯЦИИ И ЭПИНА

С. В. Суховеева

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

Движение органов растений с помощью направленного роста при воздействии гравистимуляции называют гравитропизмом. В результате различной интенсивности роста клеток на противоположных сторонах органа формируются гравитропические изгибы. Формировать гравитропический ответ могут способные к росту зоны растений. Рост растительных клеток, окруженных жесткой клеточной стенкой, происходит лишь при временном, обратимом расщеплении структурных элементов, обеспечивающих ее жесткость.

К основным структурным элементам клеточной стенки относят микрофибриллы целлюлозы, которые окружены матриксом из гемицеллюлоз, пектинов и гликопротеинов. Микрофибриллы целлюлозы обеспечивают механическую прочность клеточной стенки. Для вторичной клеточной стенки характерно наличие сложных гетерополимерных соединений лигнина. Целью работы стало исследование изменения соотношения различных групп полисахаридов в клеточной стенке клеток стеблей томатов, предварительно обработанных 0,1 мМ стимулятором роста растений эпином на основе синтетического фитогормона эпибрасинолида, при влиянии гравистимуляции.

Гравистимуляция 50-дневных томатов проводилась в темноте путем поворота растений на 90° относительно гравитационного вектора Земли. Для адаптации растений к темноте перед началом гравистимуляции растения помещались в условия полной темноты на 24 ч с целью исключения развития дополнительной фототропической реакции. Отбор растительной ткани контрольных и экспериментальных растений проводился на неактивном для фоторецепторов растений тусклом зеленом свете [1]. Содержание разных групп полисахаридов в клетках стеблей томата определяли гравиметрическим методом [2].

Было изучено относительное содержание основных групп полисахаридов в клетках стеблей растений томата, предварительно обработанных эпином, в зависимости от времени гравистимуляции и от части стебля, оказавшейся внизу или вверху после поворота растения на бок. Показано снижение доли структурных полисахаридов, гемицеллюлоз, лигнина, увеличение растворимых веществ в верхней части стебля и увеличение доли структурных полисахаридов,  $\alpha$ -целлюлозы, холоцеллюлозы, снижение гемицеллюлоз, растворимых веществ в нижней части стебля через 1 ч влияния гравистимула. При этом в верхней и нижней частях стебля происходили преимущественно разнонаправленные изменения, приводящие в конечном итоге к заметным биохимическим различиям между двумя частями стебля, что и позволяло ему изгибаться за счет неравномерного роста клеток в разных частях стебля.

Полученные результаты свидетельствуют о сложных перестройках структуры клеточных стенок при развитии гравитропического ответа в стеблях растений.

## Библиографические ссылки

1. Maxwell K., Johnson G. N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide // *Journal of Experimental Botany*. 2000. Vol. 51, iss. 345. P. 659–668.
2. Олейников Д. Н., Танхаева Л. М. Методика определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов // *Химия раст. сырья*. 2006. № 4. С. 29–33.

## АНАЛИЗ МОДИФИКАЦИИ РОСТА И НАКОПЛЕНИЕ АФК В КЛЕТКАХ КОРНЯ *ARABIDOPSIS THALIANA* ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАФИОЛЕТА

А. А. Толкач, В. С. Мацкевич

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь*

Свет является одним из важнейших факторов окружающей среды, которые влияют на рост и развитие высших растений. В последние годы показано, что умеренное УФ-С-излучение может стимулировать рост и развитие растений, увеличивая их фотосинтетическую активность и повышая содержание хлорофилла [1]. Однако, если интенсивность УФ-С излучения чрезмерна, обработка им может вызывать повреждения ДНК и мембран, что приводит к замедлению роста и развития, или даже гибели растения [2]. Цель работы – изучить влияние воздействия УФ-С на прорастание семян и уровень генерации АФК в клетках корня *Arabidopsis thaliana* и оценить эффективность антиоксидантов в снижении накопления АФК в ответ на обработку УФ-С. Объектом исследования являлись *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Использовались такие методы как стандартизированные ростовые тесты с облучением проростков и семян УФ и измерения генерации АФК в корнях растений с использованием флуоресцентного зонда дедрозтидиум (ДГЭ). В работе были получены следующие результаты: 1) При облучении проростков *Arabidopsis thaliana* в течение 3 мин наблюдалось максимальное увеличение прироста корня (на 12,9%), более длительное воздействие УФ ингибировало рост. При облучении УФ в течение 60 мин рост останавливался. 2) Облучение семян УФ оказывало стимулирующий эффект: длина корня при облучении 6 мин увеличилась на 14%. 3) Обработка растений УФ в течение 60 мин вызывала увеличение интенсивности флуоресценции ДГЭ в клетках корней арабидопсиса на 35%, что говорит о синтезе АФК. 4) При добавлении антиоксидантов наблюдалось уменьшение интенсивности флуоресценции ДГЭ по сравнению с воздействием УФ-С на корни в растворе буфера, при этом наиболее эффективными антиоксидантами выступали тиомочевина и СОД, а также ингибитор НАДФН-оксидаз (DPI). Это говорит о том, что УФ в первую очередь стимулирует синтез высокоактивных форм кислорода – гидроксильных и супероксиданионных радикалов, при этом НАДФН-оксидазы, вероятно, играют важную роль в усилении данного эффекта.

### Библиографические ссылки

1. *Hollósy F.* Effects of ultraviolet radiation on plant cells // *Micron*. 2002. Vol. 33. P. 179–197.
2. Влияние ультрафиолетового облучения на биохимические свойства растений / В. Н. Зеленков [и др.] // *Бутлеровские сообщения*. 2020. Т. 63, № 8. С. 134.

## ВЛИЯНИЕ ТРОЛОКСА И ИОНОЛА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА

**Н. Д. Федорова<sup>1</sup>, Р. А. Ковалёв<sup>1</sup>, Р. Л. Свердлов<sup>2</sup>, Е. Ю. Варфоломеева<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>НИЦ “Курчатовский институт” - ПИЯФ, Гатчина, Россия

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

Тролокс – водорастворимый аналог токоферола (витамина Е), который является очень сильным антиоксидантом и обычно используется в качестве эквивалента для измерения антиоксидантной способности других соединений [1]. Ионол – синтетический жирорастворимый аналог токоферола, также обладает ярко выраженной антиоксидантной активностью [2] и широко используется в пищевой промышленности. Возможности использования как тролокса, так и ионола в медицине активно исследуются [3, 4].

В данной работе было изучено влияние тролокса и ионола на клетки врожденного и адаптивного иммунитета (нейтрофилы и лимфоциты периферической крови соответственно). Исследовалось влияние различных концентраций ( $10^{-4}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М,  $10^{-7}$  М) на функциональную активность иммунных клеток: способность к генерации активных форм кислорода (АФК) при стимуляции форболовым эфиром (ФМА) для нейтрофилов [5] и способность к пролиферации при стимуляции фитогемагглютинином (ФГА) для лимфоцитов [6].

Нами было показано, что ни тролокс, ни ионол не влияют на способность лимфоцитов периферической крови к пролиферации при добавлении в указанных ранее концентрациях. Нейтрофилы периферической крови демонстрировали незначительное понижение способности к генерации АФК при добавлении тролокса и ионола в концентрации  $10^{-7}$  М. При повышении концентрации исследуемых веществ до  $10^{-4}$  М образец с ионолом показал значимое снижение интенсивности генерации АФК, а образец с тролоксом, напротив – значительное повышение количества АФК, генерируемых нейтрофилами в ответ на стимуляцию ФМА. Добавление тролокса и ионола в концентрациях  $10^{-5}$  М и  $10^{-6}$  М не привело к значимым изменениям измеряемой функциональной активности.

### Библиографические ссылки

1. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. Vol. 26, iss. 9–10. P. 1231–1237.
2. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): a review / W. A. Yehye [et al.] // *Eur J Med Chem*. 2015. Vol. 101. P. 295–312.
3. Antioxidant and antitumor activity of trolox, trolox succinate, and  $\alpha$ -tocopheryl succinate conjugates with nitroxides / O. D. Zakharova [et al.] // *Eur J Med Chem*. 2016. Vol. 122. P. 127–137.
4. Butylated hydroxytoluene (BHT) Protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from ferroptotic cell death: insights from *in vitro* and *in vivo* studies / P. Faraji [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. 2024. Vol. 13, iss. 2. P. 242.
5. Filatov M. V., Varfolomeeva E. Yu., Ivanov E. I. Flow cytofluorometric detection of inflammatory processes by measuring respiratory burst reaction of peripheral blood neutrophils // *Biochem Mol Med*. 1995. Vol. 55, iss. 2. P. 116–121.
6. Filatov M. V., Pantina R. A., Noskin L. A. Methods for registration of spontaneous DNA instability in mammalian cells // *Mutat Res*. 1998. Vol. 403, iss. 1–2. P. 95–101.

## РОЛЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ЗАКИСЛЕНИЯ В ДЕЙСТВИИ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА СИНАПСОСОМЫ МОЗГА КРЫС

С. В. Федорович, Е. А. Демидик, А. С. Люля

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь*

Микробиота кишечника может оказывать воздействие на нейроны. Более того, по современным представлениям, нарушение работы оси ‘микробиота-кишечник-мозг’ может лежать в основе патогенеза различных заболеваний центральной нервной системы. К метаболитам, которые синтезируются кишечным микробиомом и могут оказывать действие на клетки головного мозга, относятся прежде всего короткоцепочечные жирные кислоты пропионовая и масляная кислоты. Считается, что пропионовая кислота обладает нейротоксичными свойствами, а масляная кислота – нейропротекторными свойствами. Механизмы действия этих веществ на нейроны остаются неизвестными. Транспорт кислот в клетку может привести к снижению рН цитозоля, что в свою очередь может вызвать различные биологические эффекты, например, ингибирование экзоцитоза и нарушение регуляции освобождения нейромедиаторов. В данной работе мы сравнили действие пропионовой и масляной кислоты на рН цитозоля, экзоцитоз и образование свободных радикалов в синапсосомах мозга крыс. Использовались две концентрации короткоцепочечных жирных кислот – 5 мМ и 50 мкМ. 5 мМ пропионовой кислоты характерно для пропионовой ацидурии, наследственного заболевания, при котором происходит повреждение головного мозга. 50 мкМ близко к физиологической концентрации короткоцепочечных жирных кислот в крови.

Внутриклеточное рН определяли с помощью флуоресцентного зонда 2',7'-бис-(2-карбоксивинил)-5-(6)-карбоксивинилфлуоресцеин ацетоксиметильный эфир (BCECF-AM), экзоцитоз измеряли с помощью флуоресцентного зонда акридиновый оранжевый, образование активных форм кислорода изучали с помощью флуоресцентного зонда 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин (H<sub>2</sub>DCF-DA). Основным объектом были синапсосомы, изолированные пресинаптические окончания нейронов.

Инкубация синапсосом с 5 мМ пропионовой или масляной кислоты приводит к статистически достоверному снижению рН цитозоля на 0.8–1.0 единицы. В то же время, только 5 мМ пропионовой кислоты ингибировала экзоцитоз более чем в 5 раз. Такая же концентрация масляной кислоты и 50 мкМ обеих короткоцепочечных жирных кислот достоверно не влияли на динамику синаптических везикул. 5 мМ пропионовой кислоты также вызвало увеличение образования активных форм кислорода в синапсосомах. Такой же эффект вызвала и более низкая концентрация – 50 мкМ. Нам не удалось обнаружить прооксидантные свойства для масляной кислоты. В бесклеточной системе пропионовая кислота не индуцировала образование свободных радикалов. Эти результаты позволяют предположить, что данное соединение способно активировать неизвестную прооксидантную систему в пресинаптических окончаниях нейронов.

Таким образом, в отличие от пировиноградной и молочной кислоты обе изученные короткоцепочечные жирные кислоты способны значительно снижать внутриклеточное рН. В то же время, только пропионовая кислота обладала биологическим действием на изолированные пресинаптические окончания. Эти экспериментальные результаты позволяют сделать вывод, что синаптические эффекты короткоцепочечных жирных кислот не связаны со снижением рН цитозоля. Действие пропионовой кислоты может опосредоваться либо специфическими G-протеин связанными рецепторами либо прямым воздействием на экзоцитозный аппарат и внутрисинапсомальные митохондрии.

## ЗАЩИТНЫЕ ЭФФЕКТЫ ЗАКИСЛЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СРЕДЫ В MPP<sup>+</sup>-ИНДУЦИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

**Е. И. Федотова, К. А. Крицкая, А. Д. Надеев, А. В. Бережнов**

*Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»», Пушкино, Россия*

Болезнь Паркинсона (БП) – вторая по распространенности форма нейродегенеративных расстройств, вызванная гибелью дофаминергических нейронов в среднем мозге. В настоящее время не существует эффективных способов лечения данного заболевания, в связи с этим данная работа направлена на поиск новых направлений терапии БП, основанных на детальном понимании молекулярных и клеточных механизмов развития нейродегенерации. Известно, что гибель клеток при БП связана с накоплением нефункциональных митохондрий и повышенным окислительным стрессом [1], а улучшение состояния митохондриального ретикулума рассматривается как один из потенциальных методов терапии БП.

Целью данной работы было: оценить изменения внутриклеточных параметров в MPP<sup>+</sup>-индуцированной модели БП при кратковременном закислении внутриклеточной среды. В качестве токсической клеточной модели БП была использована культура нейробластомы SH-SY5Y, обработанная нейротоксином MPP<sup>+</sup>. Эксперименты проводились методами конфокальной, флуоресцентной микроскопии и с применением ПЦР в реальном времени.

В работе было показано, что кратковременное закисление внеклеточной среды до pH 6.6–6.8 (посредством кратковременной замены среды на среду с pH=6.0, 6.6, или с помощью добавления лактата и пирувата натрия) эффективно восстанавливало функциональное состояние митохондрий (увеличивало митохондриальный потенциал, уровень восстановленного глутатиона, общий пул и базальный уровень NADH, кальций-буферную емкость митохондрий) в культуре нейробластомы, обработанной MPP<sup>+</sup>. Также при закислении активировались процессы митофагии и митохондриальной динамики, которые, согласно литературным данным, также способны улучшать состояние митохондрий посредством утилизации поврежденных органелл [2]. При этом количество нежизнеспособных клеток не изменялось по сравнению с контрольными культурами. Таким образом, мы показали, что закисление внутриклеточной среды способно оказывать защитное действие на токсической клеточной модели БП.

Работа выполнена в рамках госзадания 075-01512-22-03 по теме: «Нейропротекторные препараты нового поколения» № 1022080100047-5-1.6.4.

### **Библиографические ссылки**

1. *Winklhofer K. F., Haass C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease // Biochim. Biophys. Acta. 2010. Vol. 1802. P. 29–44.*
2. *Therapeutic potential of autophagy-enhancing agents in Parkinson's disease / T. E. Moors [et al.] // Mol. Neurodegener. 2017. Vol. 12. P. 11.*

## ОБРАЗОВАНИЕ И ДЕГРАДАЦИЯ МОДЕЛЬНЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК: ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ

**Е. В. Шмелева<sup>1</sup>, Л. Ю. Басырева<sup>1</sup>, А. В. Гольцева<sup>1</sup>, В. С. Зубко<sup>1</sup>,  
Т. В. Вахрушева<sup>1</sup>, А. В. Соколов<sup>1,2</sup>, С. А. Гусев<sup>1</sup>, О. М. Панасенко<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва,  
Россия*

*<sup>2</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия*

В настоящее время хорошо известно, что увеличение количества нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) ассоциируется с сепсисом, тромбозом, аутоиммунными, онкологическими и некоторыми другими заболеваниями [1]. При ряде патологий отмечается замедление скорости деградации НВЛ [2]. Это должно способствовать увеличению времени нахождения компонентов НВЛ в кровотоке и их взаимодействию с иммунной системой, что может приводить к продлению повреждающего действия на клетки и ткани организма. В связи с этим становится актуальным поиск возможностей анализа скорости деградации НВЛ. Учитывая это, нами были разработаны подходы, позволяющие получить модельные НВЛ на основе комплексов ДНК лямбда фага и гистонов тимуса теленка, морфологические характеристики которых приближаются к таковым для нативных НВЛ. Геометрические характеристики получаемых модельных НВЛ определяются соотношением ДНК и гистонов. При соотношении ДНК/гистоны 1/25 по весу образуются однородные, мелкоячеистые сети, состоящие из тонких волокон диаметром 1–3 мкм. При уменьшении соотношения ДНК/гистоны до 1/5 сеть становится крупноячеистой, неоднородной, а толщина волокон увеличивается до 5–7 мкм, появляются округлые ассоциаты на поверхности волокон. Кроме того, удалось сконструировать модельные НВЛ, в состав волокон которых встроена миелопероксидаза. Таким образом, были получены модельные НВЛ, состоящие из трех компонентов: ДНК, гистонов и миелопероксидазы. Анализ деградации модельных НВЛ в сыворотке крови доноров показал, что их полное разрушение происходит в течение 24–48 часов. Можно предположить, что разработанный нами подход позволит в дальнейшем конструировать методом bottom-up более сложные модели НВЛ, по составу приближающиеся к нативным НВЛ.

Учитывая, что в настоящее время появляется все больше данных, указывающих на наличие гетерогенности НВЛ [3], разумно предположить, что для всестороннего контроля скорости разрушения НВЛ в крови при различных заболеваниях необходимо оценивать деградацию широкого набора различных по составу и структуре модельных НВЛ. Это позволит в перспективе проводить поиск подходов к коррекции скорости деградации НВЛ и соответственно снижению негативного влияния компонентов внеклеточных нейтрофильных ловушек на течение различных патологических процессов.

Работа поддержана грантом РФФ №20-15-00390-П.

### Библиографические ссылки

1. *Islam M. M., Takeyama N.* Role of neutrophil extracellular traps in health and disease pathophysiology: recent insights and advances // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24. P. 15805.
2. Degradation of neutrophil extracellular traps co-varies with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus / J. Leffler [et al.] // *Arthritis Res. Ther.* 2013. Vol. 15. P. 1–9.
3. Rethinking neutrophil extracellular traps / Y. Liu [et al.] // *International Immunopharmacology.* 2023. Vol. 124. P. 110834.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ПРИСУТСТВИИ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА НА ТРОМБОГЕННОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

**И. А. Ястребов<sup>1</sup>, В. Бельчиков<sup>2</sup>, И. С. Колесникова<sup>2,3</sup>, С. В. Галкина<sup>2,3</sup>,  
П. Е. Трахтман<sup>2</sup>, А. Н. Свешникова<sup>1-3</sup>**

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup>НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева МЗ РФ, г. Москва, Россия

Тромбоциты – короткоживущие безъядерные клетки крови, отвечающие за формирование тромбов при повреждении сосуда. Однако, кроме своих основных функций, при активации тромбоциты секретируют различные факторы роста и другие цитокины и как стало ясно в последнее время, участвуют в развитии онкологических заболеваний и оказывают разнонаправленное воздействие на пролиферацию и фенотип опухолевых клеток [1, 2]. В работе рассматривается изменение тромбогенного потенциала опухолевых клеток, выращенных в присутствии лизатов стандартных тромбоконцентратов (PL), в сравнении с клетками, выращенными с использованием фетальной бычьей сыворотки (FBS).

Используются клеточные линии рака молочной железы MCF-7 и нейробластомы SH-SY5Y, культивируемые по стандартным протоколам [3]. Клетки выращиваются в среде DMEM и MEM, обогащенной глутамином и антибиотиками в условиях 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37 °С. В качестве источника факторов роста использовался лизат стандартного тромбоконцентрата человека или отмытых от плазмы тромбоцитов человека, полученные путем пятикратного заморозки-разморозки. Оценка тромбогенности клеток проводилась с помощью флуоресцентной микроскопии тромбообразования в цельной рекальцифицированной цитратной крови, в плоскопараллельных проточных камерах с адгезированными на покровном стекле клетками. Площадь образовавшегося фибринового сгустка определялась по флуоресценции фибриногена-Alexa647, количество тромбоцитов в тромбе определялось с помощью окраски живых клеток DiOC<sub>6</sub>, ядерные клетки определялись по окраске ДНК (Hoechst 33042).

В отсутствие рекальцификации наблюдалась адгезия небольшого количества (0–10) тромбоцитов к опухолевым клеткам, при этом статистически значимых различий между клетками, культивируемыми с FBS или с PL, не наблюдалось. При рекальцификации крови до 2,5 мМ кальция наблюдалось образование фибриновых сгустков площадью от 1 до 100 мкм<sup>2</sup>, при этом количество агрегировавших тромбоцитов увеличивалось до 20. В целом, большая гетерогенность результатов наблюдалась как для FBS, так и для PL, однако процент клеток, вокруг которых образовывались крупные (больше 30 мкм<sup>2</sup>) тромбы, для PL был больше, чем для FBS. На основе проведенного исследования можно сделать вывод об увеличении вероятности тромбогенной трансформации опухолевой клетки под действием факторов роста тромбоцитарного происхождения.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 23-45-10039.

### Библиографические ссылки

1. Platelets and cancer: a casual or causal relationship: revisited / D. G. Menter [et al.] // *Cancer and Metastasis Reviews*. 2014. Vol. 33. P. 231–269.
2. *Lazar S., Goldfinger L. E.* Platelets and extracellular vesicles and their cross talk with cancer // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2021. Vol. 137, iss. 23. P. 3192–3200.
3. *Freshney R. I.* Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. New Jersey: John Wiley & Sons, 2015. – 736 p.

# **МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА**

## TWO-DIMENSIONAL DYNAMIC NUMERICAL MODEL OF THE AORTIC VALVE OPERATION

M. V. Goltsev, D. Kir, V. A. Mansurov, H. A. Pasiuk, N. A. Trushel

*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

Hemodynamics within vessels are an important factor in the development of various vascular complications, such as the formation of atherosclerotic plaques and aneurysms [1]. These complications pose a serious risk to human life, especially in cases involving the aorta. Mechanical properties of the blood vessel as well as the position and structure of the aortic valve play a significant role in blood flow and the pressure exerted by the blood on the vessel walls. The purpose of this work is to study the dynamic processes occurring in the aortic root through mathematical modeling.

To create a mathematical model, various initial data is required. These are the dimensions of the aortic root and aortic valve leaflets, the position of the aortic valve relative to the outflow tract of the left ventricle and the angle between the axes of the ascending aorta and the outflow tract of the left ventricle. Another factor influencing hemodynamics inside a blood vessel, in addition to the size of the vessel, is the structure of the leaflet and vessel wall at the tissue level. Collagen is the major load-bearing component of the aortic valve and can transfer load from the leaflets to the aortic wall when the valve is closed. Changes in the structure of the aortic wall and leaflets can be incorporated into the mathematical model using the Young's modulus.

The main method in modeling this interaction was the method of finite-difference integration of the Navier-Stoke equation and the conditions of mechanical equilibrium of the vascular wall for the related problems of viscous fluid flow and deformation of the elastic medium at the junction of the vertebral arteries into the basilar artery.

The fluid flow can deform the wall, so to numerically simulate the flow profile in a continuously deformable geometry, it is necessary to use the arbitrary Lagrange-Euler (ALE) method. The ALE method uses the dynamics of deforming geometry and moving boundaries using a moving mesh [2]. The vessel wall is a deformable material that can elastically deform under load. Consequently, the fluid flow also follows a new path, so the flow in the original geometry will be different from the flow in the deformed geometry.

As a first step, a two-dimensional geometric model of the aortic root was developed. The thickness of the valve leaflets was taken as 0.3 mm, the internal diameter of the aorta as 2 cm, the thickness of the aortic wall as 0.8 mm, and the initial angle between the aortic axis and the valve leaflet as 60°. The cardiac output had a duration of 0.1 s. The Young's modulus of the valve leaflet was  $10^5$  Pa and the Young's modulus of the aortic wall was  $5 \cdot 10^5$  Pa. Blood was assumed to be a Newtonian fluid with a viscosity of 5 mPa·s. The dynamic calculation was performed in the interval 0–1.5 s with a step of 0.1 s changing the angle of the aortic valve relative to the centerline of the aorta.

As a result of the simulation, the stress-strain state of the aortic wall and valve leaflet, the flow velocity field were calculated and it was shown that the movement of the valve leaflets has a flutter (oscillatory) character, manifested in a two-stage ejection of blood into the aorta.

## References

1. *Safar M. E.* Systolic blood pressure, pulse pressure and arterial stiffness as cardiovascular risk factors // *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2001. Vol. 10, iss. 2. P. 257–261.
2. Large deformation fluid-structure interaction—advances in ALE methods and new fixed grid approaches / W. A. Wall [et al.] // *Fluid-structure interaction: modeling, simulation, optimization*. 2006. P. 195–232.

## ATOMIC FORCE MICROSCOPY STUDY OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS

**L. V. Rabushka<sup>1</sup>, T. A. Shalukho<sup>1</sup>, M. V. Goltsev<sup>1</sup>, M. Barczewski<sup>2</sup>, Th. Schimmel<sup>2</sup>,  
T. V. Shman<sup>3</sup>**

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

<sup>2</sup>*Institute of Applied Physics and Center for Functional Nanostructures, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany*

<sup>3</sup>*Belarusian Center for Pediatric Oncology and Hematology, Pos.Lesnoe, Belarus*

The mesenchymal stem cells (MSCs) are the undifferentiated cells that can self-renew and differentiate into tissue-specific cell types. MSCs, which possess self-renewal potential and multipotent properties, have recently been identified as a potential novel therapeutic strategy for various degenerative and autoimmune disorders, including multiple sclerosis [1]. The aim of the mesenchymal stem cell replacement therapy is to overcome central nervous system cell loss and remyelination failure. Moreover, due to their immunomodulative properties, MSCs can resolve inflammation triggered by injury or degeneration.

Nevertheless, a number of questions about the cellular and molecular biology of MSCs are not yet understood. Study in details of human mesenchymal stem cells (hMSCs) mechanical properties such as elasticity, adhesion and stiffness, cytoskeleton organization and cell shape are required to realize their promising potential for development of new therapies. In this work the actin cytoskeleton and mechanical properties of hMSCs were studied by fluorescence microscopy and atomic force microscopy. For atomic force microscopy (AFM) investigations the hMSCs were fixed with 2% glutaraldehyde for 30 min. All data were obtained on a Nanoscope (R) IIIa MultiMode atomic force microscope. Force modulation mode was used to study mechanical properties (local stiffness and adhesion) of the hMSCs. 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). The measurements were performed in air at room temperature. The AFM investigations of hMSCs exhibited a considerable range of morphologies. Cells possess irregularly shaped flat lamellipods. Lamellipodia contain orthogonally arranged actin networks at the hMSC peripheries. For the spindle shaped cells the height of the nuclear region varies from 400 nm to 1  $\mu$ m, whereas lamellipodia thickness varies from 150 to 340 nm. For the star shaped cell nuclear region height is about 400–800 nm with the lamellipodia thickness from 180 to 300 nm. The area around nucleus looks like a smooth fiber mesh. AFM images demonstrate many parallel actin bundles with granule size of from 20 to 70 nm extending throughout the nuclear region. Darker parts in the adhesion image correspond to low adhesion value. The nucleus appears to be distinctly softer than the flat lamellipodia. According to the hMSC fluorescent images the microfilaments are linear in form and mostly is localized over the nucleus. The microtubules more often appear curved in form and span large regions of the hMSCs. Mechanical properties of hMSC most likely are regulated by the actin cytoskeleton, its structure and dynamics.

This study demonstrates that the AFM study of the structure and mechanical properties of MSCs can help in elucidating the mechanisms behind the beneficial effects of

stem cell transplantation leading to immunomodulation, transforming the central nervous system microenvironment from hostile to supportive and neurotrophic action, promoting the differentiation and regeneration of endogenous oligodendrocytes.

### **References**

1. The use of stem cells as a potential treatment method for selected neurodegenerative diseases: review / E. Cecerska-Heryc [et al.] // Cellular and molecular neurobiology. 2023. Vol. 43. P. 2643–2673.

## ПОДЩЕЛАЧИВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ: ЗАБЛУЖДЕНИЕ ИЛИ ХОРОШАЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ПЕРСПЕКТИВА?

**А. А. Богданов, Ан. А. Богданов, Н. А. Верлов, В. С. Бурдаков, В. М. Моисеенко**

*ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический) им. Н.П. Напалкова», Санкт-Петербург, Российская Федерация*

В результате биофизического процесса противодействия внутриклеточному гликолитическому закислению злокачественные клетки активируют переносчики протонов и лактата, возникает закисление микроокружения опухоли и явление обратного градиента рН, когда внеклеточный рН~6,4–7,1 становится меньше внутриклеточного рН~7,1–7,8 (для нормальных тканей внеклеточный рН~7,4, внутриклеточный рН~7,2). Закисление опухоли способствует пролиферации, предотвращению апоптоза, инвазивности, метастатическому потенциалу, агрессивности, уклонению от иммунитета и резистентности к лечению. Такое измененное состояние опухоли может быть мишенью для подщелачивающей терапии буферными агентами, такими как гидрокарбонат натрия [1].

Наши экспериментальные исследования показали высокую эффективность данного подхода. Нами была проведена изолированная перфузия 4% раствором гидрокарбоната натрия конечности крысы с перевитой опухолью лимфосаркомы Плисса. Было показано, что медиана выживаемости в группе с перфузией составила 17 суток, тогда как в группе без перфузии и в группе с перфузией физиологическим раствором – 13 суток [2]. Также мы выполнили внутрибрюшинную перфузию у мышей с асцитной формой карциномы Эрлиха раствором 1% гидрокарбоната натрия, что значительно увеличило их общую выживаемость по сравнению с перфузией 0,9% хлорида натрия или контрольной группой. Медиана выживаемости мышей, получавших гидрокарбонат натрия, составила 30 дней после инъекции опухолевых клеток, что достоверно отличалось от 18 дней в группе, получавшей хлорид натрия, и 14 дней в группе, не получавшей лечения [3]. Системная терапия мышей с солидной формой аденокарциномы толстой кишки (клетки СТ26) достоверно не выявило разницу в выживаемости, однако, у 3-х мышей из 10 в исследуемой группе мы наблюдали глобальное торможение опухолевого роста. Эксперименты *in vitro* на различных опухолевых клеточных линиях и теоретические расчеты показали, что механизмы действия буферной терапии, могут быть связаны с повреждением митохондрий, активацией аутофагии и нарушением транспорта лактата.

Полученные результаты дают ценную информацию об эффективности подщелачивающей терапии. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения основных механизмов и оптимизации применения этого многообещающего терапевтического подхода.

Работа выполнена в рамках государственного задания Комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга для ГБУЗ «СПб КНпЦСВМП(о) имени Н.П. Напалкова».

### **Библиографические ссылки**

1. Tumor acidity: From hallmark of cancer to target of treatment / A. A. Bogdanov [et al.] // *Front Oncol.* 2022. Vol. 12. P. 979154.
2. Antitumor efficacy of an isolated hind legperfusion with a pH-increased solution in the Pliss lymphosarcoma graft rat model / A. A. Bogdanov [et al.] // *Almanac of clinical medicine.* 2021. Vol. 49, iss. 8. P. 541.
3. Tumor alkalization therapy: misconception or good therapeutics perspective? – the case of malignant ascites / A. A. Bogdanov [et al.] // *Front Oncol.* 2024. Vol. 14.

## ГИБРИДНАЯ МНОГОМАСШТАБНАЯ МОДЕЛЬ КРОВООБРАЩЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАНЕНИИ

**Г. А. Быков<sup>1,2</sup>, М. А. Пантелеев<sup>1-3</sup>**

<sup>1</sup>*Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии,  
Российская академия наук, Москва, Россия*

<sup>2</sup>*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

<sup>3</sup>*Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,  
онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачёва, Москва, Россия*

Локальное повреждение сосудистой системы приводит к изменениям гемодинамических условий в остальной интактной части системы кровообращения, которая в свою очередь определяет граничные условия в области патологии. Необходимо количественно описать гемодинамические изменения и механизмы, лежащие в их основе.

Нашей целью была разработка математической модели для исследования изменений кровотока как в области патологии, так и в остальных интактных сосудах системы кровообращения.

Была построена многомасштабная стационарная модель гемодинамики для моделирования изменений потоков и давлений в сосудистой системе руки человека при венепункции. Кровь рассматривалась как несжимаемая Ньютоновская жидкость, протекающая через жёсткие цилиндрические сосуды под воздействием постоянного перепада давлений как граничных условий. Область патологии рассматривалась как трёхмерная область, в которой численно решалась система уравнений Навье-Стокса и непрерывности. Остальные сосуды были представлены в модели в виде системы линейных алгебраических уравнений, основанных на законе Пуазейля.

При малых радиусах раны, ниже критического значения 320 мкм, скорость кровопотери определялась гидродинамическим сопротивлением раны и возрастала с увеличением радиуса раны согласно сигмоидальному закону. При радиусах раны, больших чем 320 мкм скорость кровопотери определялась гидродинамическими сопротивлениями окружающих сосудов и не зависела от радиуса раны. Объёмный расход крови в окружающих сосудах зависел от радиуса раны по тому же закону, что скорость кровопотери. Давление в каждой бифуркации системы кровообращения было убывающей функцией радиуса раны и зависело от неё по сигмоидальному закону. Амплитуда падения давления была больше в бифуркациях, располагавшихся ближе к ране. Амплитуда падения давления в каждой бифуркации зависела от сопротивлений сосудов, отводящих кровь из данной бифуркации. Чем больше значение сопротивления, тем больше амплитуда падения давления.

Таким образом существует три режима кровотока при проколе вены: а) при малых размерах раны скорость кровопотери определяется гидродинамическим сопротивлением раны; режим «контроль раны», б) переходный режим, при котором влияние раны и сосудов системы на скорость кровопотери сопоставимо, в) при больших размерах раны кровотока определяется сопротивлением периферических сосудов, режим «контроль периферии».

Давления во всей сосудистой системе падают при проколе сосуда, и амплитуда этого падения в каждом анастомозе системы контролируется отводящими кровь из данной точки сосудами и частями повреждённого сосуда, ближайшими к новым граничным условиям (нулевое давление атмосферы).

## ВКЛАД УРОМОДУЛИНА В СТАБИЛИЗАЦИЮ КОЛЛОИДА МОЧИ В НОРМЕ И НА ФОНЕ ИНДУЦИРОВАННОГО КРИСТАЛЛОГЕНЕЗА В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Н. А. Верлов<sup>1</sup>, В. С. Бурдаков<sup>1</sup>, И. А. Кулаков<sup>1</sup>, Л. А. Иванова<sup>1</sup>, Ал. А. Богданов<sup>2</sup>,  
В. Л. Эмануэль<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина,  
Россия

<sup>2</sup>ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр  
специализированных видов медицинской помощи (онкологический)  
им. Н.П. Напалкова», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский  
университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Актуальной задачей при исследовании процессов, приводящих к манифестации мочекаменной патологии, является изучение механизмов, призванных стабилизировать коллоид мочи в норме и при патологии. Важнейшим компонентом мочи, препятствующим кристаллогенезу или, если говорить точнее, образованию нерастворимого конкремента, который не может быть выведен из организма естественным путем, является система белков мочи, основной вклад в действие которой вносит белок уромодулин [1]. Нами ранее показано, что стабилизация коллоида происходит за счёт формирования гель-подобной структуры, образованной нитями полимеризованного уромодулина [2]. Масса полимера уромодулина может достигать 10 МДа, при массе мономера – 95 кДа. В физиологически адекватном для человека диапазоне концентраций белка уромодулина и ионной силы раствора проведено исследование диффузных свойств частиц размером от 10 нм до 3 мкм методом анализа треков наночастиц и конфокальной микроскопии. Показано, что наличие уромодулина в концентрации от 100 мкг/л и более приводит к существенному уменьшению коэффициента диффузии частиц размером 70 нм, при этом не оказывает влияния на коэффициент диффузии частиц размером 10–30 нм. Для частиц размером 3 мкм методом конфокальной микроскопии показано, что гель-подобная структура полимера уромодулина препятствует, вплоть до полной остановки, их осаждению в растворе. Полученные данные хорошо объясняют механизмы стабилизации коллоида мочи в условиях первичного кристаллогенеза и более поздних стадий развития мочекаменной патологии, такие как агрегация и рост кристаллов и роль основного белка мочи уромодулина в этих процессах.

### Библиографические ссылки

1. Schaeffer C., Devuyst O., Rampoldi L. Uromodulin: roles in health and disease // *Annu Rev Physiol.* 2021. Vol. 83. P. 477–501.

2. Верлов Н. А., Ланда С. Б., Эмануэль В. Л. Олигомеры уромодулина в растворах различной ионной силы и рН // *Актуальные вопросы биологической физики и химии.* 2021. Т. 6, № 4. С. 607–611.

## РЕГУЛЯЦИЯ ПОЛЯРИЗАЦИИ МАКРОФАГОВ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК НА РАЗВИТИЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА

**А. Ю. Винокуров, М. С. Казаков, Д. Ю. Попов, Е. Ю. Шитикова,  
М. Ю. Погонялова, Е. А. Кузнецова, П. А. Баженов**

*Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева, Орел, Россия*

Атеросклероз – многофакторный патологический процесс, в котором участвуют три основных типа клеток: клетки эндотелия и гладкомышечные клетки интимы сосудов, а также макрофаги [1]. В силу различий фенотипа поляризованные макрофаги можно разделить на клетки М1 типа, обладающие в основном провоспалительным и атерогенным действием, и противовоспалительные и антиатерогенные клетки М2 типа [2]. Одним из ключевых факторов направления поляризации макрофагов выступает функционирование митохондрий. Выявлена ассоциация ряда мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК), кодирующей 13 белков электронтранспортной цепи, а также рРНК и тРНК, с прогрессированием атеросклероза [3], однако клеточные и молекулярные механизмы такой связи малоизучены.

Экспериментальные исследования 11 линий цитоплазматических гибридов на основе клеток ТНР-1, имеющих различные комбинации ассоциированных с атеросклерозом мутаций мтДНК, свидетельствуют о том, что происходящие в мутантных клетках изменения метаболизма имеют сходства с проатерогенными макрофагами М1. В частности, выявлено снижение уровня потребления кислорода и зависимости клеток от окислительного фосфорилирования, увеличение вклада гликолиза в синтез АТФ, уменьшение потребления глутамина, изменения в скорости продукции активных форм кислорода в межмембранное пространство митохондрий и, в большей степени, в митохондриальный матрикс, а также в скорости превращения супероксиданион-радикала в перекись под влиянием супероксиддисмутазы, снижение уровня митофагии и образования мембран, ассоциированных с митохондриями, изменение соотношения между метаболитами (P2Y) и ионотропными (P2X) пуринорецепторами.

Полученные результаты позволяют не только выдвинуть гипотезу о механизме связи мутаций мтДНК с развитием атеросклероза, но и обосновать возможные пути коррекции митохондриального метаболизма как стратегии снижения риска патологии.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00317.

### Библиографические ссылки

1. Pathophysiology of atherosclerosis / S. Jebari-Benslaiman [et al.] // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, iss. 6. P. 3346.
2. Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis / G. J. Koelwyn [et al.] // Nat Immunol. 2018. Vol. 19, iss. 6. P. 526–537.
3. Association of mutations in the mitochondrial genome with the subclinical carotid atherosclerosis in women / M. A. Sazonova [et al.] // Exp Mol Pathol. 2015. Vol. 99, iss. 1. P. 25–32.

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ДВОЙНУЮ СПИРАЛЬ ДНК МЕТАЛЛОПОРФИРИНОВ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ

Е. Н. Галюк, О. Н. Ринейская

*УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск Беларусь*

Порфирины являются основой для получения препаратов для фотодинамической терапии опухолей, фотосенсибилизаторов, таких как фотогем, фотофрин, фотосенс и разработанный в Республике Беларусь фотолон. Однако их использование показано для ограниченного круга опухолей, кроме того, они лишены собственного цитотоксического действия. В то же время высокая делокализация электронной плотности их тетрапиррольного цикла делает порфирины удобными лигандами для синтеза различных металлопорфиринов, обладающих высоким сродством к тканям новообразований у млекопитающих, включая человека. Основным механизмом их действия является связывание с ДНК и белками, участвующими в транскрипции и репликации ДНК, что приводит к апоптозу [1]. Поэтому актуальным является вопрос поиска новых эффективных препаратов, являющихся производными металлопорфиринов.

Как правило, оценка эффективности металлопорфиринов проводится относительно противоопухолевого препарата цисплатин. Цисплатин осуществляет свое биологическое действие путем ковалентного связывания с двойной спиралью ДНК. Действие металлопорфиринов является более сложным и осуществляется по нескольким механизмам: с помощью интеркаляции и минорно-желобкового связывания [1].

Нами разработан алгоритм и соответствующая компьютерная программа для расчета спектрофотометрического титрования растворов металлопорфиринов растворами ДНК, определяющие параметры связывания. Дополнительно было рассчитано изменение температуры плавления ДНК в присутствии металлопорфиринов и получены теоретические кривые плавления (термограммы). Для металлопорфиринов вычисления проводились для интеркаляционного механизма связывания. Аналогичные расчеты были проведены для цисплатина [2]. Это позволило выявить различия в воздействии металлопорфиринов и противоопухолевых соединений платины на ДНК.

Было показано, что на термограмме при платинировании до  $r_b=0.025$  основной пик ДНК практически не изменяется. Вместе с тем, узкие сателлитные пики практически полностью исчезают при этом значении  $r_b$  [2].

В отличие от соединений платины металлопорфирины не показывают столь сильных нарушений ДНК, но вызывают некоторую деформацию двойной спирали. Математическое моделирование термограмм, полученных для ДНК в присутствии различных концентраций металлопорфиринов, показало, что пики, вызванные плавлением сателлитных фракций, изменяются значительно слабее, тогда как пики, соответствующие остальному геному, изменяются в большей степени, чем при платинировании. При этом металлопорфирины сильно изменяют температуру плавления и ширину температурного интервала перехода спираль-клубок ДНК.

### Библиографические ссылки

1. Не только фотодинамическая терапия: Порфирины и их производные как противоопухолевые ДНК лиганды / Ю. И. Дутикова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. 2011. Т. 10, № 4. С. 47–53.

2. *Галюк Е. Н., Ринейская О. Н.* Первичная математическая обработка кривых плавления комплексов ДНК с противоопухолевым препаратом цисплатин и его неактивным аналогом трансплатином, полученных методом дифференциальной сканирующей калориметрии // Современные проблемы медицинской биохимии : сб. статей участников Междунар. науч.-практ. конф, посвящ. 85-летию проф. В. К. Кухты, Минск, 25 янв. 2022 г. / редкол. А. Д. Тагановича, Н. Н. Ковганко, В. В. Хрусталева. Минск : БГМУ, 2022. С. 50–55.

# ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ПУЛА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МИКРОВЕЗИКУЛ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО И ТРОМБОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ МИКРОАНГИОПАТИЕЙ

Н. В. Гончарова<sup>1</sup>, Л. Н. Анацкая<sup>2</sup>, М. П. Потапнев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>РНПЦ неврологии и нейрохирургии, Минск, Республика Беларусь

**Введение.** Структурно-функциональные изменения внутреннего слоя сосудистой стенки при селективном воздействии на эндотелий лейкоцитов признаны ведущим механизмом прогрессирования церебральной микроангиопатии (ЦМА). Циркулирующие в периферической крови внеклеточные везикулы (ВВ) являются производными мембран апоптотических/активированных клеток и представляют собой гетерогенную популяцию субмикронных частиц от 50 нм до 1000 нм, выступают в качестве аутокринных и паракринных эффекторов межклеточного взаимодействия и могут стать эффективными биологическими маркерами эндотелиального гомеостаза, воспаления, гемокоагуляции, ангиогенеза и тромбоза.

**Цель.** Изучить субпопуляционный состав и фенотипический профиль пула циркулирующих микровезикул эндотелиального и тромбоцитарного происхождения у пациентов с церебральной микроангиопатией.

**Материалы и методы.** Объект исследования – ВВ периферической крови пациентов с ЦМА (56 человек, средний возраст 62,9±9,4 лет, 53–83 года; средний показатель количества сосудистых факторов риска – 2,3±0,4). Группа контроля – 21 условно здоровый донор крови. Изоляция ВВ осуществлялась путем дифференциального центрифугирования. Фенотипический профиль субпопуляций циркулирующих ВВ выявлялся комбинацией моноклональных антител к CD31, CD309, CD34, CD95, CD36, CD117, CD106, CD102, CD144, CD45, CD146, CD71, CD14, CD62E, CD62P, CD73, CD147, CD61, FLT1, CD54, CD235a и CD69 человека (Beckman Coulter и Becton Dickinson) с учетом экспонирования на внешней мембране фосфатидилсерина. Регистрация и анализ данных производились на проточном цитофлуориметре с использованием программного обеспечения FACSDiva v7.0 (Becton Dickinson, США).

**Результаты.** Изучена структура пула циркулирующих ВВ у пациентов с ЦМА до начала терапии. Тромбоцитарные ВВ положительны по «якорным» антигенам CD41, CD61, CD31, CD36 (от 96 до 100% для каждого антигена). В структуре пула объектов 300–500 нм экспрессия фосфатидилсерина составляла 0,5–10%, CD41 – 19–36%, CD31 – 11–35%, CD61 – 20–37%, CD36 – 12–36%, CD62P – 7–12%, CD69 – 0,1–1,2%, CD102 – 4–12% и CD147 – 10–36%. В структуре пула объектов менее 300 нм экспрессия тромбоцитарных маркеров составляла 0,7–3,1%, относительное содержание фосфатидилсерина – 0,01–1,2%. Частицы размером более 500 нм экспонировали на внешней мембране фосфатидилсерин до 60%, маркеры тромбоцитов до 92%. Фенотип тромбоцитарных ВВ определен как AnnexinV<sup>+/-</sup>CD41<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>CD69<sup>+/-</sup>CD102<sup>+/-</sup>CD147<sup>+</sup>CD62P<sup>+</sup>. Фенотип эндотелиальных ВВ определен как CD309<sup>+</sup>FLT1<sup>+/-</sup>CD144<sup>+/-</sup>CD146<sup>+</sup>CD62E<sup>+/-</sup>CD31<sup>+</sup>CD147<sup>+</sup>CD54<sup>+/-</sup>. У пациентов с ЦМА в остром периоде выяв-

лено значимое увеличение относительного содержания тромбоцитарных ВВ с фенотипом CD41<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD62P<sup>+</sup>AnnexinV<sup>+</sup> (79,15±1,72%, p=0,001) и эндотелиальных ВВ с фенотипом CD309<sup>+</sup>CD144<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>CD62E<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> (7,74±1,19%, p=0,030) относительно уровней условно здоровых лиц (65,38±2,93% и 3,36±0,65% соответственно).

**Вывод.** Характеристика фенотипического профиля и установление уровней микровезикул эндотелиального и тромбоцитарного происхождения может служить дополнительным критерием оценки целостности эндотелия церебрального микроциркуляторного русла.

## АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗАТА *MYTILUS EDULIS*

Д. В. Григорьева<sup>1</sup>, В. А. Янчарский<sup>1</sup>, Л. В. Баран<sup>1</sup>, А. В. Соколов<sup>2,3</sup>,  
Г. А. Гусаков<sup>4</sup>, И. В. Горудко<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва,  
Россия

<sup>4</sup>Институт прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко БГУ, Минск, Беларусь

Ранее проведенные исследования показали, что гидролизат двустворчатых моллюсков из семейства мидий *M. edulis* и его компоненты могут эффективно регулировать воспаление, свертываемость крови, положительно влиять на барьерные функции эндотелия и препятствовать развитию окислительного стресса. Однако механизмы влияния препарата на основе производных *M. edulis* на различные клеточные системы и особенно клетки крови остаются малоизученными. Цель работы – характеристика препарата кислотного гидролизата *M. edulis* и исследование его влияния на структурно-функциональные свойства эритроцитов и тромбоцитов крови человека.

В работе использовали препарат N1-02, содержащий гидролизат *M. edulis*, который анализировали методами ИК- и КР-спектроскопии. Наиболее интенсивные полосы в спектрах ИК-поглощения и КР обусловлены ионизованными карбоксильной и аминогруппами, что свидетельствует о наличии в составе гидролизата преимущественно коротких пептидов. В спектрах также присутствует ряд полос средней и слабой интенсивности, которые связаны с колебаниями ароматического кольца. Эти колебания могут быть отнесены к остаткам Phe, Tyr и His. Кроме того, эти колебания могут быть связаны с присутствием в пробе меланоидинов, которые являются побочным продуктом при производстве гидролизата. Следует также отметить наличие в спектрах КР и ИК слабых полос, связанных с колебаниями связей C-S. Эти колебания, по-видимому, относятся к остаткам Met, поскольку содержание Cys в гидролизате менее 0,5%.

Тестируемый препарат в концентрации 0,05–0,25% от объема дозо-зависимым образом ингибировал гемолиз, инициированный внесением НОС1 (200 мкМ), а в концентрации 0,5–10% от объема – полностью препятствовал НОС1-индуцированному гемолизу. Кроме того, гидролизат *M. edulis* концентрационно-зависимым образом ингибировал кислотный лизис эритроцитов, однако достоверный эффект регистрировался при использовании препарата в концентрации 5–10% от объема. По всей видимости, протекторные эффекты гидролизата *M. edulis* на индуцированный гемолиз обусловлены, с одной стороны, стабилизацией плазматической мембраны эритроцитов входящими в состав препарата биологически активными молекулами (в случае кислотного гемолиза), с другой стороны, взаимодействием НОС1 с аминокислотными остатками пептидов или с меланоидинами, входящими в состав гидролизата.

При исследовании влияния гидролизата *M. edulis* на систему гемостаза было показано, что тестируемый препарат концентрационно-зависимым образом ингибирует АДФ- и коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов в плазме, а также

тромбин-индуцированную агрегацию изолированных тромбоцитов. Кроме того, выявлено, что гидролизат *M. edulis* увеличивает тромбиновое время, тем самым оказывая влияние на общий путь каскада свертывания крови. Таким образом, кислотный гидролизат *M. edulis* оказывает антиагрегантные эффекты регулируя как тромбоцитарное, так и плазменное звенья гемостаза.

Работа выполнена в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2» (задание 1.29.3).

# СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ОТВАРОВ ГИНОСТЕММЫ ПЯТИЛИСТНОЙ (*GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM*) И СОЛЯНКИ ХОЛМОВОЙ (*SALSOLA COLLINA*) В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ *IN VIVO*

О. И. Губич, В. И. Пашкевич, Д. А. Сорока

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

Терапия алкогольной болезни печени сегодня предполагает использование широкого спектра фармакологических средств, среди которых немаловажную роль играют фитопрепараты, обладающие высоким содержанием антиоксидантов, принимая во внимание тот факт, что гепатотоксическое действие этанола реализуется в том числе и посредством индукции в гепатоцитах перекисного окисления липидов, проводящего к повреждению липидного бислоя их мембран [1]. Одним из новых, малоизученных, но перспективных для гепатопротекции и набирающих все большую популярность лекарственных растений является гиностемма пятилистная. Поскольку химический гиностеммы характеризуется высоким содержанием флавоноидов, гипенозидов, сапонинов, каротиноидов, способных проявлять антиоксидантный эффект [2], целью данной работы явилось изучение ее способности снижать интенсивность перекисного окисления липидов в печени лабораторных крыс в условиях их хронической алкоголизации.

В работе использована модель хронического алкогольного поражения печени, разработанная Институтом фармакологии (г. Санкт-Петербург). Отвары гиностеммы и солянки холмовой (аптечный препарат сравнения) предоставляли intactным крысам-самцам породы *Wistar* и животным с алкогольным поражением печени вместо питьевой воды в течение 7 дней. Измерение величин клинических маркеров поражения печени и параметров перекисного окисления липидов проводилось, как описано нами в [3].

Установлено, что хроническое воздействие этанола на печень лабораторных крыс приводит к интенсификации в гепатоцитах перекисных процессов, что проявляется увеличением содержания ТБК-активных продуктов на 148%, активности каталазы – на 62,7%, снижением содержания SH-групп – на 79%, и сопровождается закономерным изменением в крови животных величин клинических маркеров поражения печени (активность щелочной фосфатазы, содержание общего билирубина, холестерина, триацилглицеринов, альбумина). Введение же в рацион крыс с алкогольным поражением печени отвара гиностеммы приводило к увеличению содержания SH-групп на 21,9%, снижению уровня ТБК-активных продуктов – на 15,6%, активности каталазы – на 19,6%. Полученные результаты коррелировали со снижением в крови крыс величин биохимических маркеров поражения печени. Необходимо отметить, что антиоксидантный эффект гиностеммы был выражен слабее, чем аналогичное действие препарата сравнения – солянки холмовой.

## Библиографические ссылки

1. *Dunn W., Shah V. H.* Pathogenesis of alcoholic liver disease // *Clinics liver disease*. 2016. Vol. 20. P. 445–456.
2. *Gynostemma pentaphyllum* an immortal herb with promising therapeutic potential / A. Aftab [et al.] // *Int. J. Food Properties*. 2023. Vol. 26. P. 808–832.
3. Исследование адаптогенных и гепатопротекторных свойств падуба парагвайского (*Plex paraguariensis*) на экспериментальных моделях *in vivo* / О. И. Губич [и др.] // *Журнал БГУ. Биология*. 2021. Т. 2. С. 43–51.

## ИЗООСМОТИЧЕСКАЯ СТРИКЦИЯ СОСУДИСТЫХ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ АКТИВАЦИИ ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ

В. С. Гусакова<sup>1</sup>, Д. В. Смаглий<sup>1-3</sup>, С. В. Гусакова<sup>1</sup>, Т. Н. Зайцева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

<sup>2</sup>Томский государственный университет, Томск, Россия

<sup>3</sup>Северский биофизический научный центр, Северск, Россия

Поддержание постоянного объема сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК) является необходимым звеном в регуляции нормального функционирования клеток при изменении осмолярности окружающей среды. Известно, что набухание клеток в гипоосмотической среде активирует механизмы регуляторного снижения объема, сопровождающиеся развитием транзиторного сократительного ответа. Последующее восстановление осмолярности среды также сопровождается транзиторной стрикцией СГМК. С другой стороны, в регуляции сократительной активности СГМК активное участие принимает пуринергическая сигнальная система, активируемая аденозин-3' – фосфатом (АТФ), концентрация которого в крови может повышаться при гипоксии. В данной работе исследовали влияние АТФ на изоосмотическую стрикцию ГМК сосудов малого и большого круга кровообращения.

Исследование проводили на кольцевых дезэндотелизированных сегментах аорты и легочной артерии крыс - самцов линии Wistar. Механическое напряжение (МН) СГМК измеряли с использованием четырехканальной механографической установки Myobath II и аппаратно-программного обеспечения LAB-TRAX-4/16 (Германия). Контрольные сокращения получали при инкубации в гиперкалиевом растворе Кребса, содержащим 30 мМ КСl (для сегментов аорты) или 15 мМ КСl (для сегментов легочной артерии). Для получения изоосмотической стрикции сегменты инкубировали в гипоосмотическом растворе Кребса, содержащем 40 мМ NaCl, а затем возвращали их в нормоосмотический раствор (120 мМ NaCl). Амплитуду сократительных ответов рассчитывали в процентах от амплитуды сокращения, вызванного гиперкалиевым раствором Кребса, которые принимали за 100%. В качестве активатора пуринергических рецепторов использовали АТФ (500 мкМ).

Помещение сегментов ЛА в гипоосмотический раствор приводило к развитию транзиторного сокращения амплитудой 69,5 (65,3; 85,4)% и длительностью 32,5 (30,0; 39,0) мин (n=11) от контрольного гиперкалиевого сокращения (15 мМ КСl). Восстановление осмолярности среды (120 мМ NaCl) после инкубации в гипоосмотическом растворе (40 мМ NaCl) приводило к развитию транзиторного сокращения амплитудой 59,6 (50,7; 67,3)% от контрольного гиперкалиевого (15 мМ КСl) сокращения и длительностью 42,5 (35,8; 55,0) мин (n=11). АТФ (500 мкМ) полностью подавлял развитие изоосмотической стрикции. Помещение сегментов аорты в гипоосмотический раствор вызывало транзиторную стрикцию амплитудой 61,3 (57,1; 71,5)% и длительностью 34,5 (31,5; 37,5) мин (n=8), а восстановление осмолярности среды – транзиторную стрикцию амплитудой 58,2 (54,2; 63,1)% и длительностью 48,0 (40,5; 53,1) мин (n=4). АТФ (500 мкМ) достоверно уменьшал амплитуду изоосмотической стрикции до 18,7 (15,2; 22,6)% (n=4, p<0,05) и устранял транзиторный её характер. Ингибитор Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup>-котранспорта буметанид (100 мкМ, предобработка 15 мин) не влиял на ингибиторное действие АТФ в сегментах ЛА, но полностью подавлял изоосмотическую стрикцию в присутствии АТФ в сегментах аорты.

Таким образом, выявлены различия в действии внеклеточного АТФ на изоосмотическую стрикцию в ГМК легочной артерии и аорты.

## ПРИМЕНЕНИЕ КРЕМНИЕВЫХ ПОДЛОЖЕК ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БЕЛКОВЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ МИКРОЧИПОВ

А. И. Давыденко<sup>1</sup>, А. Ю. Кохан<sup>1</sup>, Е. В. Шамова<sup>1</sup>, А. В. Бондаренко<sup>2</sup>, А. А. Бурко<sup>2</sup>,  
А. Е. Гончаров<sup>1</sup>, А. В. Осипова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники,  
Минск, Беларусь

В настоящее время флуоресцентный анализ является широко используемым методом исследования в биологии, медицине и смежных областях. В диагностических тест-системах на основе технологии микрочипов применение меченных флуорохромами антител позволяет детектировать взаимодействие иммобилизованных на подложку молекул со специфичными к ним компонентами в анализируемых биологических образцах. Однако существует проблема невысокой чувствительности таких тест-систем при детектировании целевых биомолекул в низких концентрациях, что особенно актуально при аллергодиагностике. Одним из решений является использование в качестве материала подложки монокристаллического кремния (Si) с тонким слоем диоксида кремния (SiO<sub>2</sub>). Наличие слоя SiO<sub>2</sub> позволяет усиливать возбуждение молекул, находящихся на его поверхности, за счет эффекта конструктивной интерференции [1]. В данной работе исследовали возможность увеличения чувствительности микрочиповых тест-систем для аллергодиагностики за счет использования подложек Si/SiO<sub>2</sub>.

На пластинах монокристаллического кремния формировали пленку диоксида кремния методом термического окисления. Толщину слоя пленки оценивали методом эллипсометрии. Модификацию поверхности подложек осуществляли разработанным ранее способом [2]. Затем наносили растворы аллергенов, содержащие линкер для ковалентной иммобилизации на поверхность. Полученные микрочипы последовательно инкубировали с сывороткой пациентов с подтвержденной аллергией и с флуоресцентно-мечеными антителами к IgE человека ( $\lambda_{em}=565$  нм,  $\lambda_{ex}=574$  нм). Регистрацию положительной реакции осуществляли по интенсивности флуоресценции с помощью лазерного сканера LuxScan10 (длина волны возбуждения – 532 нм, регистрация сигнала –  $575\pm 10$  нм).

Анализ данных показал, что регистрация специфического положительного сигнала у пациентов с установленной аллергией наблюдалась для обоих типов подложек: интенсивность флуоресценции для стеклянной подложки составила  $838,2\pm 140,9$  усл.ед., а для кремниевой в 2,5 раз выше –  $2052,3\pm 325,3$  усл.ед. ( $p=0,012$ ). В случае подложек на основе Si/SiO<sub>2</sub> соотношение сигнал шум составило  $6,6\pm 0,8$  при толщине пленки диоксида кремния 90 нм.

Таким образом, в работе было показано, что наилучшим материалом подложки тест-системы для детекции целевых белковых молекул является монокристаллический Si с тонкой пленкой SiO<sub>2</sub>. Использование данной подложки позволит значительно повысить чувствительность диагностических тест-систем, разрабатываемых для аллергодиагностики.

### Библиографические ссылки

1. An advanced, silicon-based substrate for sensitive nucleic acids detection / S. Petralia [et al.] // *Sensors*. 2018. Vol. 18. P. 3138.
2. Разработка методики модификации поверхности стекла для изготовления белковых микрочипов / А. И. Давыденко [и др.] // *Современные проблемы клеточной инженерии, иммунологии и аллергологии : Тезисы докладов международной научной конференции, посвященной 50-летию института. Научное электронное издание, Минск, 26–27 октября 2023 года / Национальная академия наук беларуси ; институт биофизики и клеточной инженерии нан беларуси. Минск: Колорград, 2023. 80 С.*

## ВЛИЯНИЕ МИКРОРНК ТРОМБОЦИТАРНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИЙ A549 И ОКР-GS

И. А. Дремук<sup>1</sup>, В. А. Шумский<sup>1</sup>, Е. М. Кизино<sup>1</sup>, А. Н. Свешникова<sup>2</sup>,  
Е. В. Шамова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия

Тромбоциты, помимо своей основной гемостатической функции, играют важную роль в развитии онкологических заболеваний. Известно, что тромбоцитарные микровезикулы (ТМВ) являются носителями малых некодирующих РНК (микроРНК), участвующих в регуляции онкогенов и опухолевых супрессоров [1, 2]. В зависимости от типа опухоли микроРНК, содержащиеся в ТМ могут оказывать как позитивное, так и негативное действие на прогрессирование опухоли, что позволяет рассматривать их в качестве диагностических маркеров. Целью данной работы явилось пилотное исследование влияния микроРНК-103, микроРНК-223, микроРНК-27 и микроРНК-24 ТМВ пациентов с раком молочной железы (РМЖ), раком легких (РЛ), раком почки (РП) и меланомой на пролиферативную активность (ПА) опухолевых клеток линий A549 и ОКР-GS.

ТМВ выделяли из суспензии тромбин-активированных тромбоцитов методом последовательного центрифугирования. Для оценки ПА клетки линий A549 и ОКР-GS засеивали на 96-луночные планшеты и инкубировали двое суток в присутствии ТМВ, полученных от пациентов с солидными опухолями. Количественную оценку ПА производили с использованием коммерческого набора CyQUANT в соответствии с инструкцией производителя. Считывание флуоресценции производили на планшетном ридере Perkin Elmer Wallac 1420 Victor2. Для изучения экспрессии микроРНК были использованы ТМВ от 48 участников исследования (10 больных РМЖ, 10 больных РЛ, 10 больных РП, 10 больных меланомой и 8 клинически здоровых лиц без патологий). Общую мРНК экстрагировали фенол-хлороформным методом. Синтез комплементарной ДНК и ПЦР-анализ проводили с использованием стартового набора miRCURY LNA miRNA PCR Starter Kit (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя.

Полученные результаты позволили выявить микроРНК, экспрессия которых была достоверно снижена в 4,7 (микроРНК-27) и 3,4 (микроРНК-103) раза в ТМВ пациентов с РЛ и РП соответственно по сравнению с группой здоровых доноров. Кроме того, мы наблюдали положительную корреляцию между ПА опухолевых клеток линии ОКР-GS и экспрессией микроРНК-103 ТМВ пациентов с РЛ и РП (коэффициент корреляции Спирмена  $r=-0,68$  и  $r=-0,82$  соответственно при  $p<0,05$ ). Также обнаружена положительная корреляция ПА опухолевых клеток линии A549 и экспрессии микроРНК-103 ТМВ пациентов с РП (коэффициент корреляции Спирмена  $r=-0,75$ ,  $p<0,05$ ).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о потенциальном влиянии микроРНК-103, содержащихся в ТМВ пациентов с РП и РЛ, на ПА клеток линии ОКР-GS и A549, что позволяет выделить эти микроРНК в качестве потенциальных биомаркеров РЛ и РП. Необходимы более глубокие исследования для оценки диагностической и прогностической ценности микроРНК-103 для пациентов с солидными опухолями.

Финансовая поддержка: грант №Б23РНФ-162; РНФ23-45-10039.

### **Библиографические ссылки**

1. Platelet microparticle-mediated transfer of miR-939 to epithelial ovarian cancer cells promotes epithelial to mesenchymal transition / M. Tang [et al.] // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8. P. 97464.

2. *Provost P.* The clinical significance of platelet microparticle-associated microRNAs. // *Clin Chem Lab Med*. 2017. Vol. 55. P. 657.

## РАСЧЁТ ВЫХОДА ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ В МОДЕЛИ НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ

Э. Б. Душанов<sup>1,2</sup>, Т. Тогтохтур<sup>1</sup>, Т. А. Кулагова<sup>3</sup>, В. К. Кулик<sup>3</sup>, А. Н. Бугай<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория радиационной биологии, ОИЯИ, Дубна, Россия

<sup>2</sup>Государственный университет «Дубна», Дубна, Россия

<sup>3</sup>Институт ядерных проблем, БГУ, Минск, Беларусь

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) является известным и перспективным методом лечения труднодоступных злокачественных опухолей головы и шеи [1, 2]. В результате реакции захвата нейтрона атомами бора образуются короткопробежные альфа-частицы и ядра лития с высокой биологической эффективностью, которые и приводят к поражению опухолевых клеток и тканей. Ключевое отличие БНЗТ от традиционной лучевой терапии заключается в том, что таргетность излучения достигается за счёт избирательной концентрации препаратов бора в опухоли, а не нацеливанием пучка.

В настоящей работе с помощью методов Монте Карло, реализованных в пакете GEANT4 [3], нами проведено моделирование взаимодействия пучка нейтронов с энергиями диапазоне от 0,0253 эВ до 10 кэВ и наночастицами <sup>10</sup>B с концентрациями от 10 до 100 мкг/г на масштабе отдельной опухолевой клетки. С использованием пакета GEANT4-DNA рассчитано число повреждений ДНК в моделях ядра глиальных клеток сферической и эллипсоидальной формы. Расчёты по физике взаимодействий нейтронов в модели показали их соответствие экспериментальным данным. Получено распределение событий энерговыделения при взаимодействии ДНК с продуктами реакции захвата нейтрона и других физических процессов. Для расчёта индукции двунитевых разрывов (ДР) ДНК, дающих основной вклад в клеточную гибель, использован алгоритм DBSCAN [4]. В работе проанализирован выход ДР ДНК в ядре клетки при различных распределениях наночастиц бора: в ядре, цитоплазме и на поверхности мембраны клетки, что позволит в дальнейшем оптимизировать схемы адресной доставки препаратов в опухоль.

### Библиографические ссылки

1. Таскаев С. Ю., Каныгин В. В. Бор-нейтронозахватная терапия. Новосибирск : Издательство СО РАН, 2016.
2. Boron neutron capture therapy: current status and challenges / S. Wang [et al.] // Front. Oncol. 2022. Vol. 12. P. 788770.
3. Moghaddasi L., Bezak E. Geant4 beam model for boron neutron capture therapy: investigation of neutron dose components // Australasian Physical & Engineering Sciences in Medicine. 2018. Vol. 41, iss. 1. P. 129–141.
4. Calculation of DNA damage in the tumor cell on boron neutron capture therapy / T. Togtokhtur [et al.] // PEPAN Letters. 2024. Vol. 21, iss. 4 (in press).

**КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ СИНЕГО (428 НМ) СВЕТОДИОДНОГО  
ИЗЛУЧЕНИЯ В СОЧЕТАНИИ С Zn-СОДЕРЖАЩИМ  
ПИРИДИЛПОРФИРИНОМ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ  
IN VIVO**

**Е. С. Ефимова<sup>1</sup>, Т. В. Шарабарина<sup>1</sup>, У. С. Грицай<sup>2</sup>, В. Д. Генин<sup>1</sup>, Ю. И. Сурков<sup>1</sup>,  
И. А. Серебрякова<sup>1</sup>, Е. С. Тучина<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>СГУ им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

<sup>2</sup>Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского, Саратов, Россия

Целью данного исследования было изучение физико-биологических изменений в области инфицированных гнойных абсцессов у крыс при фотодинамическом воздействии с использованием светодиодного синего (428 нм, 70 мВт/см<sup>2</sup>) излучения и 0,1% пиридилпорфирина Zn-TBut3PyP (ПФ) и технологии оптического просветления.

Формирование моделированного гнойного абсцесса (МГА) проводили на базе кафедры ОХ и ТА СГМУ им. В. И. Разумовского по методике, описанной ранее [1], в качестве инфектанта использовали клинический антибиотико-чувствительный штамм *Staphylococcus aureus*. 15 крыс породы «Стандарт», возрастом 8 месяцев, массой 200±50 г, были разделены на 5 экспериментальных групп: 1) контроль – МГА со стандартным лечением; 2) МГА с обработкой облучением; 3) МГА с обработкой ПФ; 4) МГА с обработкой ПФ и облучением, 5) МГА с обработкой ПФ, облучением при использовании технологии оптического просветления кожи. Оптически просветляющим агентом выступала смесь глицерина, ДМСО и воды в объемных долях 70% : 5% : 25% соответственно [2]. Спектры диффузного отражения в диапазоне 400–2100 нм с поверхности кожи над МГА регистрировали при помощи спектрометров USB4000-Vis-NIR и NIRQuest (Ocean Optics, США). Для оценки изменений в размерах и структуре МГА использовались УЗИ изображения, полученные на 0 и 5 день лечения с помощью УЗ аппарата DUB SkinScanner (Tpm Taberna pro Medicum, Германия) в режиме В-скана с помощью зонда (частота 22 МГц), глубина зондирования – 30 мм. Источником излучения служил светодиод с максимумом спектра испускания  $\lambda=428$  нм и плотностью мощности 70 мВт/см<sup>2</sup>. Во всех экспериментах режим излучения был непрерывный. Время облучения составляло 15 мин в сутки в течение 10 дней.

Для оценки эффективности воздействия ежедневно проводили высев инфильтрата из МГА на чашки Петри с ГРМ-агаром с последующим подсчетом численности микроорганизмов ( $\log_{10}$ КОЕ). Установлено, что использование синего (428 нм) светодиодного излучения для чрескожной обработки МГУ снижает обсемененность инфильтрата на 1  $\log_{10}$ КОЕ после первого сеанса облучения, на 5  $\cdot \log_{10}$ КОЕ после 5 сеанса и на 7  $\cdot \log_{10}$ КОЕ после 10 дней лечения. При анализе УЗИ-изображений выявлено существенное сокращение объема МГА на уже на 5 день для группы 4, на 10 день – для групп 4 и 5. Лучшие показатели – скорость снижения бактериальной нагрузки, редукция абсцесса, восстановление нормальных значений показателей крови – отмечены на 10 день для 4 и 5 группы животных. У группы 2 все показатели достигали нормы к 15 дню, в то время как для групп 1 и 3 восстановление произошло на 18 сутки.

Исследования проводилось при поддержке грантов: РФФ № 23-14-00287, РФФИ № 20-52-56005.

### **Библиографические ссылки**

1. Способ моделирования абсцессов мягких тканей : пат. №2601378 РФ / В. В. Алипов, А. И. Урусова, Д. А. Андреев и др. ; дата публ. : 10.11.2016.
2. Способ лазерной гипертермии опухолей при введении плазмонно-резонансных наночастиц с применением техники иммерсионного оптического просветления : пат. № 2022120596 РФ / В. Д. Генин, Э. А. Генина, В. В. Тучин и др. ; дата публ. : 19.07.2023.

## АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА МЕЗО-ТЕТРАГИДРОКСИФЕНИЛХЛОРИНА ПРИ ВВЕДЕНИИ В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСОВ С МОНОМЕРНЫМИ И ПОЛИМЕРНЫМИ ЦИКЛОДЕКСТРИНАМИ

Т. Е. Зорина<sup>1</sup>, Т. И. Ермилова<sup>3</sup>, И. В. Коблов<sup>1</sup>, В. Каскех<sup>2</sup>, И. Е. Кравченко<sup>1</sup>,  
Т. В. Шман<sup>3</sup>, В. П. Зорин<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ, Минск, Беларусь

<sup>3</sup>РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Циклодекстрины (ЦД) широко применяются в медицине и фармацевтической промышленности для разработки новых фармакологических форм препаратов из-за их способности нековалентно связывать по типу «гость-хозяин» и высвобождать различные вещества. Образование комплексов ЦД с лекарственными соединениями обеспечивает понижение токсичности лекарств, повышение их устойчивости, улучшения их фармакокинетических и фармакодинамических свойств. Одним из перспективных направлений развития систем доставки лекарств на основе ЦД является использование полимерных систем на их основе. Применение полимерных ЦД позволяет увеличить степень контроля биораспределения препаратов в организме.

Целью данной работы являлось сравнительное исследование особенностей процессов накопления и внутриклеточной локализации фотосенсибилизатора (ФС) мезо-тетра-(4-гидроксифенил)хлорина (мТГФХ, Biolitec, Германия), вводимого в суспензию клеток K562 (коллекция клеточных культур РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии) в виде комплексов с мономерными и полимерными ЦД.

В работе использовали метил-β-циклодекстрин (М-β-ЦД), производства AgaChem (Нидерланды); полимерные карбоксиметил-β-циклодекстрин (КМ-β-ЦДПР) и β-циклодекстрин (β-ЦДПР), производства CyclicLab (Венгрия).

Исследование кинетики накопления мТГФХ и его комплексов с ЦД в клетках K562 проводили методом проточной цитофлуориметрии (CytoFocus 820, Healicom, Китай). Для анализа процессов внутриклеточной локализации ФС сравнивали распределение в клетках флуоресценции мТГФХ и колокализаторов клеточных оргanelл методом конфокальной микроскопии на лазерном сканирующем конфокальном флуоресцентном микроскопе LeicaTCSSPE (Германия).

Установлено, что основными факторами, определяющими различия в характере изменений скорости внутриклеточного накопления, являются различия в скоростях диссоциации молекул мТГФХ из комплексов с ЦД, а также в степени снижения его активности в клеточной суспензии.

Согласно данным флуоресцентной микроскопии введение мТГФХ в составе комплексов с ЦД приводит к небольшому снижению эффективности накопления ФС в митохондриях клеток и практически не влияет на его локализацию в эндоплазматическом ретикулуме. Наиболее выраженные изменения в процессах распределения мТГФХ в комплексах ЦД связаны с накоплением ФС в лизосомах: при введении мТГФХ в виде раствора его флуоресценция в лизосомах практически не

наблюдается (коэффициент корреляции Пирсона для флуоресценции ФС и колокализатора лизосом LysoView488 не превышает 0,10–0,12), при использовании комплексов с ЦД значительная часть молекул мТГФХ обнаруживается в составе лизосом (коэффициент корреляции Пирсона равен 0,45 для мономерного ЦД и 0,51–0,65 для полимерных ЦД).

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования циклодекстринов для контролируемых изменений процессов распределения ФС в биологических системах.

## РОЛЬ СТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК НОВЫХ КАТИОННЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ПЛАТФОРМЕ ХЛОРИНА E<sub>6</sub>, ПРИ ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИИ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ

Т. Е. Зорина<sup>1</sup>, Т. И. Ермилова<sup>3</sup>, И. В. Коблов<sup>1</sup>, И. Е. Кравченко<sup>1</sup>, Т. В. Шман<sup>3</sup>,  
А. В. Кустов<sup>4</sup>, Д. Б. Березин<sup>5</sup>, В. П. Зорин<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ, Минск, Беларусь

<sup>3</sup>РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

<sup>4</sup>Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Иваново, Россия

<sup>5</sup>Ивановский государственный химико-технологический Университет,  
Иваново, Россия

Исследование кинетики перераспределения фотосенсибилизаторов (ФС) между клетками позволяет анализировать особенности процессов их накопления и локализации в паренхиме опухолевой ткани и прогнозировать результаты фотодинамического воздействия на солидные опухоли при проведении фотодинамической терапии.

В данной работе с использованием техники проточной цитофлуориметрии проведено сравнение скоростей перераспределения между клетками молекул ФС, производных хлорина e<sub>6</sub> с различными боковыми заместителями, синтезированных в Ивановском государственном химико-технологическом Университете (Иваново, Россия): 13(1)-N-(4'-N'-N'-диметилпиперазинил иодид) амид, 15(2),17(3)-диметилловый эфир хлорина e<sub>6</sub> (N1); 13(1)-N-метил амид, 15(2)-метилловый эфир, 17(3)-[N-1'-(1'-карбоксо-4'-гуанидилбутил) амид] хлорина e<sub>6</sub> (N2); 13(1)-N-метил амид, 15(2)-метилловый эфир, 17(3)-O-6'-галактопиранозиловый эфир хлорина e<sub>6</sub> (N3); 13(1)-N-метил амид, 15(2)-пентаэтиленгликолевый эфир, 17(3)-метилловый эфир хлорина e<sub>6</sub> (N4), а также Хл e<sub>6</sub> производства Frontier Scientific (США).

Исследования проводили с клетками лейкемической линии миелоидного происхождения K562 (коллекция клеточных культур РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии). Клетки окрашивали ФС при 37 °С в среде RPMI-1640 (Sigma, США) с 2% эмбриональной сывороткой телят (Sigma, США). Затем клетки отмывали трижды и переводили в среду, не содержащую ФС. Для оценки скорости межклеточного перераспределения ФС окрашенные и неокрашенные клетки смешивались в соотношении 1:4, и через определенные интервалы времени отбирали пробы для получения гистограмм распределения клеток по величине интенсивности флуоресценции в области 640–670 нм.

Данные цитометрического анализа показали, что по уровню накопления в клетках K562 исследованные ФС располагаются в ряду: N4 >> N3 > N2 > N1. В тоже время порядок следования производных хлорина по изменению величины скорости перераспределения между клетками имеет иной характер. Если равномерное распределение молекул N2 в клетках достигается в течение 0,5–1 мин., то в случае N4 для этого требуется 8–10 мин. N1 и N3, подобно Хл e<sub>6</sub>, характеризуются чрезвычайно низкой скоростью миграции между клетками в суспензии. На протяжении нескольких часов молекулы этих ФС остаются в пуле окрашенных клеток.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии строгой корреляции между изменениями скорости накопления ФС в клетках и их способностью мигрировать между клетками. Одной из возможных причин этого может являться различный характер влияния типа боковых заместителей на кинетику процессов накопления и выведения ФС из клеток. Анализ кинетики межклеточного обмена позволяет моделировать кинетику внутритканевого распределения ФС с различными физико-химическими характеристиками.

## ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ДО И ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ С СОЛЯМИ ЛИТИЯ *IN VITRO*

**Г. П. Зубрицкая<sup>1</sup>, О. В. Климович<sup>2</sup>, О. Ю. Махина<sup>2</sup>, И. А. Дремук<sup>1</sup>,  
Е. И. Слобожанина<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>Городской центр трансфузиологии УЗ «6-я городская клиническая больница»,  
Минск, Беларусь

Препараты лития часто называют "стабилизатором настроения" и назначают обычно пациентам, не реагирующим на другие лекарства. Это сравнительно медленно действующие препараты, иногда может пройти несколько месяцев прежде, чем они стабилизируют психическое состояние человека. Все соли лития в терапевтических концентрациях обычно не оказывают негативного влияния на клетки крови, а при концентрациях, превышающих терапевтические, проявляют негативный эффект. В литературе имеются противоречивые данные о влиянии  $Li^+$  на продукцию активных форм кислорода (АФК). Показано, что воздействие  $Li^+$  на кардиомиоциты приводит к повышению уровня АФК и последующему окислительному стрессу. С другой стороны, обнаружен протекторный эффект  $Li^+$  на нейроны клеточной линии РС5 в условиях окислительного стресса, вызванного диабетической гипергликемией. Вопрос о влиянии солей лития на уровень АФК в лимфоцитах недостаточно изучен.

Цель исследования – выявить действие ионов лития на продукцию АФК в лимфоцитах человека *in vitro*. Уровень АФК в лимфоцитах оценивали с использованием флуоресцентного зонда 5-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (СМ-Н<sub>2</sub>DCFDA) на проточном цитофлуориметре (Beckman Coulter, США). Лимфоциты были получены в градиенте плотности гистобака и подвержены воздействию сульфата и хлорида лития как в фармакологических (1 мМ), так и в токсических (6 и 10 мМ) концентрациях.

Показано, что при воздействии на клетки как сульфата лития, так и хлорида лития в концентрации 1 мМ (3 ч инкубации, 37 °С), базальный уровень АФК практически не изменялся по сравнению с нативными лимфоцитами (контроль). Измерение уровня АФК в лимфоцитах, подвергшихся воздействию токсических концентраций сульфата лития при этих же условиях позволило установить лишь незначительное повышение уровня АФК на 10–15% по сравнению с контрольными клетками, а увеличение времени инкубации лимфоцитов (15 ч) с хлоридом лития в концентрации 1 мМ привело к снижению базального уровня АФК примерно на 10–15%, тогда как при токсической концентрации (6 мМ) этот уровень увеличивался примерно в 2 раза по сравнению с контролем. При максимальной токсической концентрации ионов лития (10 мМ) увеличение базального уровня АФК составляла примерно 30% по отношению к контролю.

Таким образом, в зависимости от типа соли лития и времени инкубации их с лимфоцитами они по-разному влияют на окислительно-восстановительные процессы в клетках. По-видимому, 3-х часовая инкубация лимфоцитов с ионами лития не успевает запустить полностью окислительные процессы в клетке для активации продукции АФК и требуется больше времени для диффузии лития через мембрану лимфоцитов.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант Б 23-107.

## ИЗМЕНЕНИЕ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА И ОБЩЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ОСТРЫМ НАРУШЕНИЕМ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Г. П. Зубрицкая<sup>1</sup>, Е. Н. Найда<sup>2</sup>, Е. А. Григоренко<sup>2</sup>, Н. П. Митьковская<sup>2</sup>,  
Ю. М. Гармаза<sup>3</sup>, Е. И. Слобожанина<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>УО «Белорусский государственный медицинский университет» Минск, Беларусь

<sup>3</sup>ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских технологий» Минск, Беларусь

Известно, что уровень микро- и макроэлементов в эритроцитах и плазме крови существенно меняется при различных заболеваниях, в том числе рассматривается роль их дисбаланса в развитии артериальной гипертензии (АГ) и острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК). Процесс интенсификации свободнорадикального окисления также является общебиологическим механизмом при развитии любого вида патологии, в том числе и при патологии, связанных с АГ. Поиск предикторов нарушений микроциркуляции у пациентов с артериальной гипертензией и ОНМК является актуальным. Цель настоящей работы – оценить изменения элементного и антиоксидантного статуса крови у пациентов с АГ без поражения головного мозга (ГМ), бессимптомном поражением ГМ, а также пациентов с перенесенном ранее ОНМК. Определение концентрации биоэлементов в периферической крови человека проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой, а оценку общей антиоксидантной активности (ОАА) плазмы крови – по тролокс эквивалент антиоксидантной активности.

Установлено, что концентрация Са и Mg в эритроцитах и плазме крови имели тенденцию к снижению у пациентов с бессимптомной АГ и ОНМК по сравнению с группой лиц с АГ без поражения ГМ (контроль). Анализ водно-электролитного обмена у пациентов с бессимптомным поражением ГМ выявил статистически значимое снижение в эритроцитах уровня натрия до  $606,6 \pm 99,5$  мг/л и повышение содержания калия до  $2945,7 \pm 221,5$  мг/л по сравнению с данными для лиц с АГ без поражения ГМ (Na –  $732,1 \pm 51,7$  мг/л и K –  $2005,6 \pm 126,5$  мг/л). В плазме крови лиц с бессимптомным поражением ГМ по сравнению с АГ без поражения ГМ мы наблюдали противоположное изменение концентраций данных элементов. Обнаруженные разнонаправленные изменения содержания K и Na у пациентов с бессимптомным поражением ГМ скорее всего свидетельствуют об изменении их клеточной проницаемости. В эритроцитах и плазме крови пациентов с ОНМК (эритроциты –  $1021,2 \pm 17$  мг/л ( $P < 0,01$ ); плазма –  $43,8 \pm 2,4$  мг/л ( $P < 0,05$ )) обнаружено увеличение содержания фосфора по сравнению с аналогичными показателями, характерными для АГ без поражения ГМ (эритроциты –  $538,1 \pm 40,54$  мг/л; плазма –  $50,18 \pm 1,11$  мг/л). При избыточном поступлении фосфора повышается уровень выведения кальция. Обнаружено достоверное снижение ОАА плазмы крови у пациентов, страдающих АГ с бессимптомным поражением ГМ ( $1,25 \pm 0,198$  мМ) и с

ОНМК ( $1,263 \pm 0,12$  мМ) по сравнению с группой пациентов с АГ без поражения ГМ ( $1,53 \pm 0,06$  мМ) ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, установленные изменения элементного состава эритроцитов и плазмы крови, а также изменение ОАА плазмы у пациентов с АГ с бессимптомным поражением ГМ и ОНМК по сравнению с пациентами АГ без поражения ГМ свидетельствуют о нарушении металло-лигандного гомеостаза и ухудшении оксигенации мозга, что вносит вклад в патогенез данных заболеваний.

## ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОСНОВНЫХ ТРАНСПОРТНЫХ СИСТЕМ ПЛАЗМЫ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕЩИН С РЕЗУС-ИММУНИЗАЦИЕЙ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИМ СРЕДНЕОБЪЕМНОГО ПЛАЗМАФЕРЕЗА МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ

**А. А. Иванов<sup>1</sup>, А. К. Королик<sup>2</sup>, О. В. Козлякова<sup>3</sup>, Г. Г. Лубневская<sup>1</sup>,  
М. С. Тарасик<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>*ГУ Минский НИЦ хирургии, трансплантологии и гематологии, Минск, Беларусь*

<sup>3</sup>*Городской центр трансфузиологии УЗ 6-ой ГКБ, Минск, Беларусь*

Одним из методов лечения беременных женщин с резус-иммунизацией является плазмаферез, направленный на удаление антирезус-антител и других патологических субстанций из организма матери. Однако, вопросы кратности и объема удаляемой плазмы остаются очень актуальными, поскольку включение лечебного плазмафереза в комплексную терапию беременных с резус-иммунизацией должно создать предпосылки для пролонгирования беременности вплоть до сроков рождения жизнеспособного младенца.

С этой целью нами был проведен анализ изменений функционального состояния основных транспортных систем плазмы крови беременных женщин с резус-иммунизацией при проведении им среднеобъемного плазмафереза (ПА) по различным схемам методом флуоресцентного зондирования и данных биохимического анализа.

В работе были исследованы образцы плазмы крови 19 беременных женщин с резус-иммунизацией до и после проведения им нескольких сеансов среднеобъемного лечебного плазмафереза (удаление от 30 до 50% объема циркулирующей плазмы) по различным схемам. Общее количество оцененных процедур ПА составило 60. Схемы проведения ПА были следующие: 1 схема – 1-ый ПА, через 3-4 дня – 2-ой ПА, через 3-4 дня – 3-ий ПА; 2 схема – 1-ый ПА, через 7 дней – 2-ой ПА, через 7 дней – 3-ий ПА, через 20-30 дней повторение циклов по медицинским показаниям.

В данной работе были получены и проанализированы спектры флуоресценции зондов: 8-анилино-нафталин-1 – сульфоната (АНС), Хинальдинового красного (ХК) и Нильского красного (НК) в плазме крови беременных женщин с резус-иммунизацией до и после проведения им ПА по 1-ой схеме и по 2-ой схеме. Для всех пациенток был проведен биохимический анализ крови на содержание общего белка, альбумина, билирубина и уровня антител до и после каждого сеанса плазмафереза.

Установлено, что включение плазмафереза в комплекс лечебных мероприятий у беременных с резус-иммунизацией вне зависимости от схем их проведения приводит к некоторому снижению транспорта катионных гидрофобных метаболитов (по данным флуоресцентного зонда ХК). Отмечается нормализация дисбаланса распределения нейтральных гидрофобных лигандов (по данным флуоресцентного зонда НК), которая имеет кратковременный эффект. Выявлена разнонаправленность в изменениях связывающей способности молекул альбумина по отношению к анионным гидрофобным метаболитам (по данным флуоресцентного зонда АНС): увеличение связывающей способности молекул альбумина после ПА в плазме беременных с резус-иммунизацией является благоприятным прогностическим признаком, а уменьшение – имеет неблагоприятный клинический прогноз (преждевременные роды, высокий риск развития гемолитической болезни плода). В последнем случае может быть рекомендована схема 1 с частотой проведения среднеобъемного плазмафереза через 3–4 дня и увеличением числа сеансов ПА до получения стабильного клинико-лабораторного эффекта.

## АЛЬБУМИН, МОДИФИЦИРОВАННЫЙ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ГИПЕРГЛИКЕМИИ, ИНГИБИРУЕТ ЛЕЙКОЦИТАРНУЮ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗУ, ПРЕПЯТСТВУЯ РАЗВИТИЮ ГАЛОГЕНИРУЮЩЕГО СТРЕССА

В. А. Иванов<sup>1</sup>, В. А. Костевич<sup>1,2</sup>, Н. П. Горбунов<sup>2</sup>, И. В. Горудко<sup>3</sup>,  
Д. В. Григорьева<sup>3</sup>, А. В. Соколов<sup>1,2</sup>, О. М. Панасенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

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

Ключевой фермент клеточного звена врожденного иммунитета лейкоцитарная миелопероксидаза (МПО) катализирует образование активных форм галогенов, которые, с одной стороны, выполняют бактерицидную функцию, уничтожая патогены, с другой – повреждают биомолекулы, клетки и ткани, что приводит к развитию галогенирующего стресса, способствующего воспалительным заболеваниям. Одно из таких заболеваний – сахарный диабет, как правило, сопровождается гипергликемией, которая приводит к неферментативному гликированию белков под действием глюкозы и основных продуктов ее превращения – глиоксаля и метилглиоксаля (МГ). Гликированные белки способны снижать активность таких бактерицидных агентов, как лизоцим и лактоферрин, способствуя развитию инфекционных осложнений. Цель работы – выяснить, изменится ли в условиях моделирования гипергликемии ферментативная активность МПО и повлияет ли это на уровень маркеров галогенирующего стресса в крови человека.

*Методы.* Гипергликемию моделировали добавлением к МПО или в цельную кровь глюкозы, МГ или человеческого сывороточного альбумина, модифицированного путем инкубации с МГ (ЧСА-МГ). Пероксидазную активность МПО регистрировали по окислению 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) аммония, хлорирующую – по обесцвечиванию целестинового синего В. Связывание МПО с ЧСА-МГ исследовали методом электрофореза, а также с использованием моноклональных антител против МПО. МПО, хлорированные церулоплазмин (ЦП-С1) и липопротеины низкой плотности (ЛНП-С1) регистрировали в плазме крови методом ИФА с использованием соответствующих моноклональных антител. Дегрануляцию нейтрофилов исследовали методом проточной цитофлуориметрии, регистрируя экспрессию на поверхности клеток маркера азурофильных гранул (CD63) с использованием флуоресцентно меченых антител.

*Результаты.* Добавление к МПО глюкозы (до 22 мМ) или МГ (до 42 мкМ) не влияло на ее ферментативную активность. ЧСА-МГ связывался с МПО, образуя прочный комплекс ( $K_d = 1,1$  нМ), что подтверждает конкуренция ЧСА-МГ с моноклональными антителами против МПО за связывание с ферментом. ЧСА-МГ дозозависимо ингибировал пероксидазную и хлорирующую активности МПО по неконкурентному механизму. Инкубация донорской крови при 37 °С с ЧСА-МГ в течение 1,5 ч с последующим добавлением активатора нейтрофилов форбол-12-миристан-13-ацетата приводила к достоверному снижению во внеклеточной среде уровня как самой МПО, так и ЦП-С1 и ЛНП-С1. Ни глюкоза, ни МГ в аналогичных условиях не влияли на содержание МПО, ЦП-С1 и ЛНП-С1 в крови. Поскольку источником МПО в крови являются

нейтрофилы, исследовали влияние ЧСА-МГ на высвобождение МПО из их гранул. Установлено, что ЧСА-МГ не влиял на экзоцитоз содержимого азурофильных гранул, в том числе и МПО.

*Вывод.* Моделирование гипергликемии путем добавления глюкозы или МГ к изолированной МПО (*in vitro*) или в цельную кровь (*ex vivo*) не влияло на ее ферментативную активность и маркеры галогенирующего стресса в крови. ЧСА-МГ связывался с МПО, ингибировал ее активность, препятствуя галогенирующему стрессу.

Работа поддержана грантом РФФ № 20-15-00390-П.

# ПРОЦЕСС КРИСТАЛЛООБРАЗОВАНИЯ В КРИОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕДАХ НА ОСНОВЕ ВОДНО-ГЛИЦЕРИНОВЫХ РАСТВОРОВ

А. А. Иванова, Е. Ю. Симоненко

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

Криоконсервация клеток лежит в основе многих биомедицинских исследований, от рутинного хранения образцов до новых клеточных методов лечения, а также позволяет создавать криобанки для долгосрочного хранения биоматериала и является ключевой технологией вспомогательных репродуктивных технологий. Для снижения негативных воздействий процесса заморозки на клетки используются криопротекторные среды. В качестве проникающих внутрь клетки компонент криопротектора для заморозки сперматозоидов чаще всего используется глицерин. В литературных данных нет подробного изучения процесса кристаллообразования в водных растворах глицерина низкой концентрации.

Поэтому целью данной работы является изучение процесса формирования кристаллов льда в криопротекторных средах на основе водных растворов глицерина низкой концентрации.

Оценка средних размеров кристаллов, формирующихся в изучаемых растворах, а также исследование влияния отдельных компонент криопротекторных сред были проведены с помощью рентгеноструктурного анализа (PETRA III, DESY, Германия).

Первые эксперименты с помощью рентгеноструктурного анализа были проведены для базовых растворов малых объемов (20 мкл). Полученные результаты продемонстрировали возможность использования данного метода для изучения процесса кристаллообразования. Для получения значений средних размеров кристаллов, формирующихся в растворе при криоконсервации, было написано программное обеспечение, позволяющее численно оценить размеры кристаллов. С помощью данной программы были получены размеры средних кристаллов для водно-глицериновых растворов с добавлением сахарозы при замораживании в больших объемах. Было показано, что для воды (100%) средний размер кристаллов составляет  $21 \pm 2$  мкм, для буферного раствора глицерина (12% об.) средний размер кристаллов составляет  $12 \pm 1$  мкм, в то время как для буферного раствора глицерина с добавлением непроникающих компонент (альбумина (4 мг/мл), сахарозы (0,04 М)) средний размер кристаллов, формирующихся в растворе составляет  $9 \pm 1$  мкм.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о необходимости присутствия в криопротекторной среде проникающего в клетку компонента - глицерина для последующей криоконсервации. В литературе встречаются предположения о том, что дисахариды, взаимодействуя с глицерином, формируют матрицу, влияющую на структуризацию молекулы воды и препятствующую нуклеации. Однако данные предположения требуют дополнительного анализа.

## Библиографические ссылки

1. *Petrunkina A.M.* Fundamental aspects of gamete cryobiology // *J. Reproduktionsmed. Endokrinol.* 2007. Vol. 4, iss. 2. P. 78–91.
2. The combination of trehalose and glycerol: an effective and non-toxic recipe for cryopreservation of human adipose-derived stem cells / T. Y. Zhang [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* 2020. Vol. 11, iss. 1. P. 460.

# ОЦЕНКА ОБРАЗОВАНИЯ ГИДРОПЕРЕКИСЕЙ ЛИПИДОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА КОМПЛЕКСЫ ЦИТОХРОМА С С ФОСФОЛИПИДАМИ

**Е. Д. Ионова, Г. О. Степанов, А. Н. Осипов**

*ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия.*

На сегодняшний день известно, что цитохром *c* является одним из важнейших элементов в развитии запрограммированной гибели клетки (апоптоза) [1]. При этом цитохром *c* проявляет пероксидазную активность, где в качестве субстрата выступает не только пероксид водорода, но гидроперекиси липидов. Скорость пероксидазной реакции в присутствии гидроперекисей на порядки выше, чем с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [2].

За основу нашего исследования были взяты работы по облучению порфиринов и применению фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии [3]. Целью проведенного исследования стала оценка образования гидроперекисей липидов при действии лазерного облучения с длиной волны 441 нм на комплексы цитохрома *c* лецитиновой мембраной.

В рамках исследования был облучен образец, содержащий в себе цитохром *c*, пероксид водорода, в соотношении 10:1 к цитохрому, и лецитиновые липосомы. Количество гидроперекисей было показано с помощью метода железоиндуцируемой хемиллюминесценции, с использованием физического активатора (кумарина C-525). В результате, впервые было замечено увеличение быстрой вспышки хемиллюминесценции после облучения лазером комплексов цитохрома *c*, подвергнувшегося изменению под действием пероксида водорода, с натуральными фосфолипидами. Это связано с тем, что пероксид водорода воздействует на гем, который, вероятно, выходит из цитохрома *c*, и высвобождает железо. Воздействие пероксида водорода на гем контролировалось спектрофотометрически по уменьшению полосы Soret. Оставшийся без железа протопорфирин поглощает энергию лазера и индуцирует образование синглетного кислорода, что в свою очередь приводит к накоплению гидроперекисей.

Данное исследование позволяет приблизиться к возможности контроля перекисного окисления липидов, играющего ключевую роль во многих заболеваниях, в том числе опухолевых, и процессах апоптоза, а также сделать следующий шаг в фотодинамической терапии.

## Библиографические ссылки

1. Redox phospholipidomics of enzymatically generated oxygenated phospholipids as specific signals of programmed cell death / V. E. Kagan [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. 2020. Vol. 147. P. 231–241.
2. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome *c* bound to cardiolipin-containing membranes / N. A. Belikova [et al.] // *Biochemistry*. 2006. Vol. 45, iss. 15. P. 4998–5009.
3. Alibasha A., Ghosh M. Recent developments of porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy. 2023. P. 1–14

# ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННО ВЫСОКОГО СОДЕРЖАНИЯ ДЕЙТЕРИЯ В ПИТЬЕВОМ РАЦИОНЕ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В КРОВИ И ТКАНЯХ ПЕЧЕНИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

С. В. Козин, Д. А. Гришко, О. Ф. Паремузова

*Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия*

Установлено, что изменение содержания дейтерия в питьевом рационе может оказывать влияние на физиологические процессы, протекающие в живых организмах [1, 2]. Интерес представляет исследование влияния изотопномодифицированной воды, в которой содержание дейтерия сопоставимо с таковым в ледниковых шапках Марса (700–1000 ppm) на функциональные показатели организма, в частности на антиоксидантную систему.

В эксперименте использовали воду с модифицированным изотопным составом с содержанием дейтерия 750 ppm (ВМИС-750 ppm), которая была получена разведением оксида дейтерия (99,92%) («Leimacs», Россия) водой с естественным содержанием дейтерия 150 ppm.

Концентрацию дейтерия в плазме крови определяли с помощью ЯМР-спектрометра Bruker Avance NEO 700 МГц. Интенсивность свободнорадикальных процессов в плазме крови и тканях печени определяли методом хемилюминесцентного анализа на приборе Lum-100. В тканях печени лабораторных животных определяли содержание восстановленного глутатиона. Общую антиоксидантную активность изучали методом оценки радикальной сорбции 2,2'-азино-бис-3-этилбензтиозолин-6-сульфоокислоты (ABTS).

Содержание дейтерия в крови лабораторных животных, в питьевом рационе которых была ВМИС-750 ppm, повысилось со  $149,7 \pm 0,5$  ppm до  $486,2 \pm 4,6$  ppm. На фоне продолжительного использования в питьевом рационе ВМИС с содержанием дейтерия 750 ppm происходило усиление антиоксидантного потенциала крови экспериментальных животных, что сопровождалось снижением показателей нарастания вспышки хемилюминесценции. Общая активность антиоксидантной системы тканей печени была выше в группе «ВМИС-750 ppm», что выражалось статистически значимым снижением светосуммы свечения хемилюминесценции на 13% и увеличением радикальной сорбции на 21% по сравнению с контрольной группой. Животные, группы «ВМИС-750 ppm», имели достоверно более высокое содержание восстановленного глутатиона в тканях печени (на 37%) по сравнению с животными, в рационе которых была вода с естественным содержанием дейтерия 150 ppm.

Таким образом, повышение в питьевом рационе млекопитающих содержания дейтерия до 750 ppm, т. е. уровня, аналогичного марсианским ледникам, оказывает биологическое действие на тканевом и молекулярном уровне, активируя антиоксидантную систему млекопитающих. Данное исследование открывает предпосылки для дальнейшего изучения биологических эффектов относительно высоких содержаний дейтерия, соответствующих его содержанию в ледниковых шапках на полюсах Марса (от 700 до 1000 ppm).

## Библиографические ссылки

1. Deuterium-depleted water influence on the isotope  $^2\text{H}/^1\text{H}$  regulation in body and individual adaptation / A. Basov [et al.] // *Nutrients*. 2019. Vol. 11. P. 1903.
2. Изотопное замещение дейтерия на протий в тканях головного мозга крыс изменяет его резистентность к гипоксии / С. В. Козин [и др.] // *Биофизика*. 2019. Т. 64, № 2. С. 362–370.

# ИССЛЕДОВАНИЕ *IN SILICO* БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПИОГЛИТАЗОНА КАК ИНГИБИТОРА ГИСТОНДЕАЦИЛАЗ

О. Ф. Краецкая

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

**Актуальность.** Пиоглитазон является лекарственным средством класса тиазолидиндионов, которое используется в качестве гипогликемического средства при диабете второго типа. Само действие данного средства проявляется в его способности к уменьшению инсулинорезистентности. Из литературных данных также известно, что производные пиоглитазона проявляют широкий спектр противоопухолевой активности с различными молекулярными механизмами действия [1]. Один из таких механизмов был изучен нами в более ранних работах [2]. Было установлено [2], что пиоглитазон способен ингибировать VEGF-A – фактор роста эндотелия кровеносных сосудов, приводящий к увеличению сосудистой проницаемости опухолей. Также, при различных видах онкологических заболеваний может наблюдаться повышенная экспрессия индивидуальных HDAC (гистондеацилаз) – ферментов, действующих в качестве ингибиторов экспрессии различных генов, в то числе и противоопухолевого фактора, что однозначно повышает риск развития опухоли [3]. Кроме того, при различных видах онкологических заболеваний может наблюдаться повышенная экспрессия индивидуальных HDAC. Например, согласно [3], уровень HDAC1 повышается при раке простаты, желудка, толстого кишечника, раке груди; HDAC2 – при колоректальном, раке груди и шейки матки. Поэтому разработка ингибиторов HDAC – достаточно интересный и перспективный подход в лечении онкологических заболеваний.

**Цель:** Изучение с помощью программы молекулярного докинга возможности ингибирования пиоглитазоном HDAC1 и HDAC2.

**Материалы и методы.** Выбор белков HDAC1 и HDAC2 проведен из банка данных 3D-структур белков RSCB PDB. 3D-модель пиоглитазона создана с помощью специализированных программ пакета Chemoffice. Молекулярный докинг осуществлен с помощью пакета программ AutoDock.

**Результаты.** В ходе проведения исследования и анализа полученных данных было определено, что лучшие ингибирующие свойства пиоглитазона проявляются при взаимодействии его с HDAC1:  $K_i=353,75$ ;  $E_{св.}=-5,83$  ккал/моль. Для HDAC2 аналогичные параметры связывания с пиоглитазоном несколько хуже и составляют:  $K_i=253,8$ ;  $E_{св.}=-3,75$  ккал/моль.

**Выводы.** Пиоглитазон показывает высокое сродство *in silico* в качестве ингибитора гистондеацилаз – HDAC1 и HDAC2. Это открывает возможность изучения данного альтернативного механизма действия пиоглитазона на противоопухолевую активность *in vitro*.

## Библиографические ссылки

1. Rahid M., Shrivastava N., Husain A. Synthesis and sar strategy of thiazolidinedione: a novel approach for cancer treatment // J. Chil. Chem. Soc. 2020, Vol. 65, iss. 2. P. 4819–4832.
2. Краецкая О. Ф. Моделирование новых производных пиоглитазона и изучение зависимости структура-биологическая активность *in silico* на основе рецептора

VEGF // Инновационные технологии в фармации : Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня образования кафедры фармакологии Иркутского государственного медицинского университета, Иркутск, 6 июня 2022 г. / Под редакцией Е. Г. Приваловой. Иркутск, 2022. С. 54–60.

3. *Surabhi S., Tekwani B.* Histone deacetylases inhibitors in neurodegenerative diseases, neuroprotection and neuronal differentiation // *Frontiers in Pharmacology*. 2020. Vol. 11. P. 537–556.

## УСТАНОВЛЕНИЕ *IN SILICO* НАЛИЧИЯ АФФИННОСТИ У МЕТФОРМИНА К ФАКТОРУ РОСТА КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ VEGF-A

О. Ф. Краецкая

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

Из целого ряда проангиогенных факторов наиболее значимым и хорошо изученным на сегодняшний день является белок семейства VEGF, называемый VEGF-A. В данное семейство также входят плацентарный фактор роста (PGF) и белки VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D. Все они были обнаружены позже, чем VEGF-A. Наряду с перечисленными были открыты белок VEGF-E, кодируемый вирусами, и белок VEGF-F [1]. VEGF-A, и VEGF-B и PlGF – основные регуляторы роста кровеносных сосудов, VEGF-C и VEGF-D необходимы для формирования лимфатических сосудов [1]. На сегодняшний день изучено три вида тирозинкиназных рецепторов к VEGF-A – VEGFR-1, 2 и 3 [1]. VEGF-A активирует рецепторы VEGFR1 и VEGFR2. VEGF-B и PlGF (факторы роста плаценты) соединяются с VEGFR2. VEGF-C и VEGF-D взаимодействуют с рецептором VEGFR3 [1].

В настоящее время большое внимание исследователей привлекает проблема поиска новых антиангиогенных препаратов, применяемых в лечении онкологических пациентов с сопутствующей патологией, например, такой как сахарный диабет второго типа (СД 2). В этой связи довольно перспективным кандидатом является лекарственный препарат пиоглитазон, а также его функциональные производные [2].

Нужно также отметить, что результаты многих исследований такого гипогликемического средства как метформин (N,N-диметилимиддикарбоимид диамид) также подтверждают его защитное действие на развитие и прогрессирование рака [3]. Однако, в литературе, посвященной противоопухолевому эффекту метформина, отсутствуют сведения о попытках поиска у него возможного ангиогенного эффекта.

**Цель:** Установить *in silico* наличие у метформина сродства к фактору роста эндотелия кровеносных сосудов VEGF-A и его рецепторам VEGFR1 и VEGFR2.

Выбор белка VEGF-A и VEGFR1 и VEGFR2 был проведен из банка данных 3D-структур белков RSCB PDB. 3D-модель метформина создана с помощью пакета программ Chemoffice. Молекулярный докинг осуществлён с помощью программы AutoDock.

**Результаты.** Более низкое значение свободной энергии связывания ( $E_{св.}$ ) для лиганда должно свидетельствовать о его более высокой аффинности к анализируемому белку. В ходе проведения молекулярного докинга установлено отсутствие аффинности метформина к фактору роста кровеносных сосудов VEGF-A и его рецепторам (Энергия связывания ( $E_b$ )=+5,7...+100,1 ккал/моль).

**Выводы:** В ходе проведенного исследования *in silico* не выявлено наличие сродства у метформина к фактору роста эндотелия кровеносных сосудов VEGF-A и его рецепторам VEGFR1 и VEGFR2. На основании этого можно предполагать, что механизм противоопухолевого эффекта метформина не включает такой механизм действия как антиангиогенность.

### Библиографические ссылки

1. *Vasudev N. S., Reynolds A. R.* Anti-Angiogenic Therapy for Cancer: Current Progress, Unresolved Questions and Future Directions. // *Angiogenesis*. 2014. Vol. 17. P. 471–494.

2. *Rahid M., Shrivastava N., Husain A.* Synthesis and sar strategy of thiazolidinedione: a novel approach for cancer treatment // *J. Chil. Chem. Soc.* 2020. Vol. 65, iss. 2. P. 4819–4832.

3. Метформин и злокачественные образования: возможный механизм противоопухолевого действия и перспективы использования в практике / К. О. Кузнецов [и др.] // *Проблемы эндокринологии*. 2022. Т. 68, № 5. С. 45–55.

# ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ДЕЙСТВИЮ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ КЛЕТОК ЛИНИИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА С ИНДУЦИРОВАННЫМ РАДИОРЕЗИСТЕНТНЫМ ФЕНОТИПОМ МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ

**И. А. Кулаков<sup>1</sup>, Н. А. Верлов<sup>1</sup>, Ал. А. Богданов<sup>2</sup>, В. С. Бурдаков<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

<sup>2</sup>ГБУЗ «СПб КНЦСВМП(о) им. Н.П. Напалкова», Санкт-Петербург, Россия

Анализ ДНК-комет является быстрым и чувствительным методом для исследования повреждений генетического материала в клетках [1]. Данный метод основан на электрофоретической миграции отдельных цепей ДНК исследуемых клеток. Метод позволяет оценить количество одно- и двунитевых разрывов, которые приводят к уменьшению сверхспирализации ДНК, вызывая миграцию ее отдельных нитей, а также косвенно оценить активность репарации и профиль эпигенетических модификаций. Радиорезистентность опухолевых клеток является одним из основных препятствий при лучевой терапии злокачественных новообразований. На фоне фракционированного облучения может возникнуть субпопуляция клеток опухоли с меньшей чувствительностью к действию ионизирующего излучения (ИИ), чем исходная популяция клеток.

Цель исследования – методом ДНК-комет оценить биологический эффект облучения в гамма установке РХ-30-Гамма (источник <sup>60</sup>Со) в диапазоне доз от 0 до 100 Гр на клетки АКЭ дикого типа (АКЭ WT) и с индуцированным радиорезистентным фенотипом (АКЭ RR). Для моделирования радиорезистентности в системе *in vivo* использовали клетки линии аденокарциномы Эрлиха (АКЭ), перевиваемые интраперитонеально аутобредным лабораторным мышам ICR (CD-1). Субпопуляцию клеток АКЭ RR, сохраняющую жизнеспособность после воздействия гамма-излучения в дозе 30 Гр, получали в серии последовательных перевивок и облучений с шагом в 10 Гр. Анализ ДНК-комет проводили для клеток АКЭ WT и АКЭ RR проводили по протоколу P. Olive [1]. Результаты микроскопии ДНК-комет обрабатывали в программном пакете ImageJ с использованием плагина OpenComet (ver 1.3).

В серии облучений была получена субпопуляция клеток АКЭ RR. Анализ ДНК-комет показал, что после облучения дозой в 100 Гр средние длины хвостов комет составили 2066±20 и 906±9 мкм для групп АКЭ WT и АКЭ RR, соответственно. Доля ДНК в хвостах комет составила 68,87±2,11% для клеток АКЭ WT и 65,47±4,05% для клеток АКЭ RR. Моменты хвостов комет и моменты хвостов комет по Оливе клеток АКЭ WT составили 90,08±3,26 и 37,60±2,37 усл. ед., соответственно. Для клеток АКЭ RR – 55,91±4,05 и 24,64±2,32 усл. ед., соответственно. Таким образом, были выявлены достоверные различия характеристик комет клеток двух групп. На основании полученных результатов, возможно сделать заключение о меньшей чувствительности клеток АКЭ RR к действию ИИ, относительно клеток АКЭ WT. Полученные данные хорошо соотносятся с критерием отбора АКЭ RR – сохранением жизнеспособности и способности к перевивке мышам после облучения дозой 30 Гр.

## Библиографические ссылки

1. Olive P. L., Banáth J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells // Nat Protoc. 2006. Vol. 1, iss. 1. P. 23–29.

## КОВАЛЕНТНО МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ДИПЕПТИДАМИ НАНОАЛМАЗЫ В КАЧЕСТВЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

А. А. Луговский<sup>1</sup>, А. С. Касич<sup>1</sup>, Г. А. Гусаков<sup>2,3</sup>, М. П. Самцов<sup>3</sup>, Е. Д. Мицкевич<sup>2</sup>,  
В. А. Пархоменко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Учреждение БГУ «Республиканский центр проблем человека», Минск, РБ

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

<sup>3</sup>Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко БГУ, Минск, РБ

Доставка лекарственных препаратов с помощью связанных с олигопептидами наночастиц, представляют собой инновационный подход к терапии различных заболеваний. В частности, ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза (УДА) имеют маленький размер, что позволяет им легко проникать в клетки организма и доставлять лекарственные вещества. Олигопептиды, в свою очередь, обладают уникальными свойствами, способствующими повышению эффективности лекарственного вещества и улучшению его стабильности. Комбинация наночастиц и олигопептидов позволяет создавать более эффективные и безопасные препараты, которые могут быть использованы для лечения широкого спектра заболеваний, включая рак, инфекции и неврологические расстройства. Целью данного исследования состоит в разработке эффективного метода синтеза комплекса для доставки лекарственных препаратов на основе УДА, ковалентносвязанного с дипептидом (Phe-Gly).

**Методы.** В работе использовался исходный УДА марки УДА-ГО производства ЗАО «Синта» (Минск, Беларусь). Для модификации поверхности ДНА было проведено его окисление путем термообработки на воздухе при температуре 400 °С в течение 5 ч. Далее УДА подвергался восстановлению дибораном с последующей промывкой и высушиванием при 150 °С, что приводило к образованию гидроксильных поверхностных групп. Дипептид Phe-Gly с трет-бутоксикарбонильной защитой (ВОС) по аминогруппе фенилаланина прививался на УДА в условиях реакции Микаямы с последующим удалением ВОС-защиты в 20% растворе трифторуксусной кислоты (ТФА) в дихлорметане (ДХМ).

**Результаты.** В результате сравнительного анализа колебательных спектров исходного УДА и УДА, ковалентносвязанного с дипептидом (УДА-О-Gly-Phe), установлено наличие у последнего дополнительной полосы ИК-поглощения в области 1650 см<sup>-1</sup>, которая характерна для амидов. Также показано, что для образца УДА-О-Gly-Phe-ВОС появляется интенсивный колебательный пик с максимумом на 1716 см<sup>-1</sup>, соответствующий карбонильной группе ВОС-защиты. После снятия ВОС-защиты данное колебание уже не наблюдается. Для исследованных образцов также наблюдаются характерные для Gly-Phe фрагмента колебания в области 1160, 1255 см<sup>-1</sup>, которые можно отнести к деформационным колебаниям амидных фрагментов. Таким образом, можно заключить, что привитие фрагмента с ВОС-защитой и ее последующее снятие было успешным. Исследованы спектры электронного поглощения и испускания полученного комплекса.

**Вывод.** Разработаны методы получения УДА, ковалентносвязанных с молекулой дипептида Gly-Phe. Исследование спектральных свойств полученных композитов показало эффективность выбранной синтетической схемы. Предварительное восстановление поверхностных групп (кислотных, сложноэфирных, ангидридных и лактонных) до гидроксильных позволило селективно провести ковалентную модификацию без образования побочных продуктов. Следовательно, данные структуры могут быть использованы при создании высокоселективных лекарственных средств.

## **ВЛИЯНИЕ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ НА ИЗОЛИРОВАННЫЕ ПРЕСИНАПТИЧЕСКИЕ ОКОНЧАНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС *IN VITRO***

**Л. М. Лукьяненко<sup>1</sup>, Е. В. Венская<sup>1</sup>, Т. Г. Дубовская<sup>1</sup>, А. С. Скоробогатова<sup>1</sup>,  
И. И. Прокофьев<sup>1</sup>, Х. Л. Эрнандес Касерес<sup>2</sup>, Митчел Вальдес-Соса<sup>2</sup>**

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

<sup>2</sup>*Кубинский центр нейронаук, Гавана, Куба*

В настоящее время механизмы, лежащие в основе нейрофизиологических процессов эпилепсии, раскрыты недостаточно. Существует предположение, что физико-химическое состояние мембран оказывает влияние на способность нейронов генерировать или затормаживать электрический заряд, тем самым приводя к дисбалансу передачи импульса. Согласно гипотезе мембранной контаминации эпилептогенные вещества проникают в мембрану нервных клеток, инициируют увеличение латерального давления в мембране и вызывают пароксизмальную деполяризацию в тех нейронах, которые могут генерировать пейсмекерные потенциалы, снижая при этом текучесть мембран [1]. Одним из применяемых противоэпилептических средств является вальпроевая кислота – лекарственное средство, ингибирующее потенциал-зависимые натриевые каналы, увеличивающее содержание гамма-аминомасляной кислоты в клетках нервной системы, за счёт чего происходит усиление тормозной и ингибирование возбуждающей нейротрансмиссии. Терапевтическая концентрация вальпроевой кислоты составляет 100 мкг/мл, при этом предполагается, что более высокие концентрации могут приводить к обратному эффекту – встраиваться в мембраны нервных клеток, увеличивая их микровязкость и приводя к эпилептической активности.

Цель данной работы – изучить влияние различных концентраций вальпроевой кислоты на микровязкость липидного бислоя и цикл синаптических везикул в изолированных пресинаптических окончаниях больших полушарий головного мозга крыс. Действие вальпроата натрия на биофизические характеристики синаптических мембран и цикл синаптических везикул изучали на модели изолированных пресинаптических окончаний - синаптосом, которые представляют собой замкнутые структуры, образованные пресинаптическими мембранами с прикрепленными элементами постсинаптической мембраны. Синаптосомы получали из больших полушарий головного мозга крыс по методу Хайоша. Микровязкость липидного бислоя плазматических мембран синаптосом оценивали с помощью флуоресцентных зондов: 2-диметиламино-6-лауроилнафталина (лаурдана), 1-(4-триметиламмоний)-6 фенил-1,3,5 гексатриена (ТМА-ДФГ). Высвобождение и обратный захват нейротрансмиттеров в синаптосомах регистрировали посредством изменения флуоресценции акридинового оранжевого (АО). Предварительные результаты экспериментов показали, что при воздействии вальпроата натрия на синаптосомы в концентрациях 100–200 мкг/мл наблюдалось изменение параметров флуоресценции ТМА-ДФГ и лаурдана, встроенных в мембраны синаптосом, а также параметров флуоресценции АО. Полученные результаты свидетельствуют о том, что вальпроат

натрия приводит к изменению микровязкости липидного бислоя синапсом и тенденции к увеличению обратного захвата нейротрансмиттера после индуцированного деполяризацией экзоцитоза синаптических везикул *in vitro*.

Работа выполняется совместно с Кубинским центром нейронаук при поддержке БРФФИ, проект №Б23КУБ-026.

#### **Библиографические ссылки**

1. *Нечипуренко Ю. Д., Гарсия Рейес Р. С., Эрнандес Касерес Х. Л.* Гипотеза контаминации мембран нейронов, эпилепсия и кетогенная диета // *Биофизика*. 2021. Т. 66, № 6. С. 1123–1132.

## БИОФИЗИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДВУХФАЗНОГО АДАПТАЦИОННОГО ОТВЕТА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Г. Г. Мартинович, В. В. Войнаровский, И. В. Мартинович

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

В последние годы выяснено, что ключевую роль в адаптационных процессах большинства клеток при окислительном стрессе играет фактор транскрипции Nrf2, активность которого регулируется с участием редокс-зависимого белка Keap1 [1]. В нормальных условиях Keap1 нековалентно связывает Nrf2, что обуславливает направленный транспорт и деградацию белка в протеасоме 26S. Умеренный окислительный стресс и электрофильные агенты нарушают взаимодействие в комплексе Nrf2-Keap1, в результате Nrf2 активирует транскрипцию сотен генов, участвующих в защите и адаптации клеток к окислительному стрессу. Однако при превышении определенного порога активации Nrf2 запускается экспрессия генов, продукты которых способствуют развитию окислительного стресса и последующей гибели клеток [2].

Наличие порога для активации защитного действия через фактор транскрипции Nrf2 позволяет предположить, что зависимости доза-эффект для модуляторов системы Nrf2-Keap1 будут являться двухфазными: иметь область роста и область снижения клеточного отклика при увеличении действующей дозы [3]. Для количественного анализа немонотонного двухфазного клеточного ответа, индуцированного модуляторами системы Nrf2-Keap1, предложена биофизическая модель образования комплексов фактора транскрипции Nrf2 с двумя сайтами ДНК. При не высоких концентрациях в ядре фактор транскрипции Nrf2 связывается с высокоаффинным сайтом ДНК, регулирующим экспрессию защитных генов, а при высоких концентрациях – с низкоаффинным сайтом, продукты экспрессии которого способствуют гибели клеток. Согласно предложенной модели различия в аффинности участков связывания формируют количественную основу для преобразования одним и тем же фактором транскрипции длительности стрессовых воздействий в противоположно направленные клеточные ответы (адаптация и гибель). В опухолевых клетках при увеличении аффинности связывания Nrf2 с сайтами ДНК из-за мутаций происходит сдвиг максимума гормезиса в направлении более низких концентраций лиганда в сравнении с нормальными клетками.

На основе количественного анализа селективной хемосенсибилизации опухолевых клеток фенольными антиоксидантами с использованием разработанной биофизической модели образования комплексов фактора транскрипции Nrf2 с сайтами ДНК показано, что при определенных концентрациях один и тот же регулятор индуцирует развитие окислительного стресса в опухолевых клетках и активацию адаптационных процессов в нормальных. Таким образом, различия в опухолевых и нормальных клетках величины константы диссоциации фактора транскрипции Nrf2, регулирующего стрессовые ответы клеток, могут служить основой для разработки новой стратегии таргетной противоопухолевой терапии.

### Библиографические ссылки

1. Mazers of Nrf2 regulation / N. K. Zenkov [et al.] // Biochemistry (Moscow). 2017. Vol. 82. P. 556–564.
2. Nrf2 amplifies oxidative stress via induction of Klf9 / S. N. Zucker [et al.] // Mol. Cell. 2014. Vol. 53. P. 916–928.
3. Chemosensitization of tumor cells by phenolic antioxidants: The role of the Nrf2 transcription factor / G. G. Martinovich [et al.] // Biophysics. 2020. Vol. 65. P. 920–930.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ И КАТИОННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

**Г. Д. Мороз<sup>1</sup>, Т. В. Вахрушева<sup>1</sup>, А. В. Соколов<sup>1,2</sup>, М. С. Юдин<sup>1,3</sup>, А. М. Варижук<sup>1</sup>,  
С. Э. Алиева<sup>1</sup>, В. Н. Лазарев<sup>1,3</sup>, О. М. Панасенко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, Россия

Возрастающее распространение устойчивых к антибиотикам бактерий побуждает к поиску новых антибактериальных препаратов, в качестве которых перспективными считаются короткие катионные антимикробные пептиды (КАМП). Как правило, при оценке биосовместимости КАМП ограничиваются определением их цитотоксичности. Очень мало исследований взаимодействия КАМП с белками организма-хозяина. В этом отношении особый интерес представляют собственные антибактериальные белки организма. Одним из них является фермент миелопероксидаза (МПО), секретруемый нейтрофилами в очаге инфекции, где ожидается и присутствие КАМП. Взаимодействие КАМП и МПО может сказаться как на бактерицидности КАМП, так и на активности МПО. Цель работы – исследование влияния: 1) КАМП на каталитическую активность МПО и 2) модификации КАМП, вызванной действием  $\text{HOCl}$ , антимикробного продукта функционирования МПО, на бактерицидность КАМП.

**Методы.** В работе использованы четыре коротких КАМП, сконструированных на основе микробиома пиявки *Hirudo medicinalis*: *pept\_1545* (FLIGKAIKRKFCLRSVWNA), Hm-AMP1 (RLKRFKRVALRREKTARNFRSIVS), Hm-AMP2 (EKRWRLIFNYF) и Hm-AMP8 (RAVIYKIPYNAIASRWIIAPKKC). Связывание КАМП с МПО определяли методом микромасштабного термофореза. Peroксидазную активность МПО оценивали спектрофотометрически по изменениям спектра поглощения гемовой группы при переходе фермента из нативной формы в промежуточное редокс-состояние. Для выявления участия остатков тирозина и цистеина пептидов в реакциях пероксидазного цикла МПО использовали, соответственно, метод флуориметрии и измерение свободных  $-SH$  групп с помощью реактива Элмана. Бактерицидное действие КАМП оценивали на бактериях *E. coli*. О количестве бактерий судили по оптической плотности при 540 нм.

**Результаты.** Методом микромасштабного термофореза показано, что все исследуемые КАМП связываются с МПО (диапазон  $K_d$  1–10 мкМ). При этом Hm-AMP2 активировал, у *pept\_1545* с увеличением концентрации активирующее действие сменялось на ингибирующее, Hm-AMP8 ингибировал, а Hm-AMP1 не влиял на пероксидазную активность МПО. Установлено, что в механизмах обнаруженного влияния пептидов на активность МПО участвуют их остатки тирозина и цистеина. Степень модификации КАМП под действием  $\text{HOCl}$  варьировали, используя разное мольное соотношение  $\text{HOCl}$ /пептид. При его увеличении до определенного значения прекращалось бактерицидное действие пептида. Это соотношение составило 2:1 для Hm-AMP2 и 5:1 для *pept\_1545* и Hm-AMP8. Этот результат с учетом аминокислотного состава указанных

пептидов позволяет предположить, что модификация остатков лизина, а не цистеина, играла существенную роль в потере пептидами бактерицидной активности.

*Вывод.* На примере исследованных кАМП показано, что короткие кАМП в зависимости от аминокислотного состава могут: 1) оказывать влияние на каталитическую активность МПО, ингибируя её или ускоряя каталитические обороты; 2) терять свой бактерицидный потенциал, став мишенью для НОСІ, высокореакционного антимикробного агента, продуцируемого МПО.

## ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ CdSe/ZnS В ДИАГНОСТИКЕ ПАТОЛОГИЙ ЯИЧНИКОВ

И. Г. Мотевич<sup>1</sup>, Н. М. Попко<sup>1</sup>, А. В. Шульга<sup>2</sup>, С. А. Маскевич, Н. Д. Стрекаль<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, Гродно, Беларусь

<sup>2</sup>Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Своевременная диагностика онкологических заболеваний является наиболее актуальной задачей современной медицины. Поиск, идентификация и качественный анализ специфических маркеров в биологическом материале необходимы для скрининга и прогнозирования. Разработка и интеграция в практику технологий применения флуоресцентных маркеров, находится на этапе интенсивного исследования и развития. В качестве перспективных маркеров возможно применение флуоресцентных полупроводниковых наночастиц CdSe/ZnS [1]. Наночастицы CdSe/ZnS, используемые в данной работе в качестве контрастирующего красителя для окраски гистологических срезов яичников с различной патологией, были солюбилизованы по оригинальной методике. В результате солюбилизации благодаря наличию карбоксильной группы COO<sup>-</sup> меркаптоуксусной кислоты поверхность наночастиц становилась отрицательно заряженной, что позволяло рассматривать данные частицы как анионные флуоресцентные зонды, чувствительные к pH [2].

В срезах доброкачественных новообразований полоса флуоресценции наночастиц CdSe/ZnS испытывает батохромный сдвиг на 6 нм, а в срезе серозной карциномы гипсохромный сдвиг на 4 нм и в срезе аденокарциномы с метастазом в сальник на 7 нм, соответственно, по отношению к положению полосы в гистологическом срезе яичника без патологии. Подобного рода изменения наблюдаются и в спектрах флуоресценции наночастиц в водных растворах при разных значениях pH. Поэтому можно предположить, что в гистологических срезах злокачественных новообразований среда становится более кислой, а в срезах доброкачественных новообразований – более щелочной. Основной причиной различных изменений в положении флуоресценции наночастиц является изменение микроокружения частиц, а именно зарядовое окружение. Протоны H<sup>+</sup> и гидроксил ионы OH<sup>-</sup>, окружающие наночастицу, создают вблизи поверхности наночастицы локальное электрическое поле. Изменения в положении полосы флуоресценции наночастиц CdSe/ZnS в гистологических срезах и в растворах с разным значением pH, можно проанализировать в рамках самоиндуцированного эффекта Штарка. Нами показано, что электронный переход в щелочной среде и в срезах доброкачественных новообразований обусловлен исключительно только изменением поляризуемости и наблюдается квадратичный эффект Штарка. Данная ситуация возможно только тогда, когда в КТ индуцированный дипольный момент возникает только во внешнем электрическом поле, образованном ионами H<sup>+</sup> и OH<sup>-</sup> а также карбоксил ионами остатков меркаптоуксусной кислоты на поверхности наночастиц.

### Библиографические ссылки

1. Glutathione capped core/shell CdSeS/ZnS quantum dots as a medical imaging tool for cancer cells / M. Rana [et al.] // Inorganic Chemistry Communications. 2020. Vol. 112. P. 107723–107751.

2. Флуоресцентные наночастицы CdSe/ZnS как нанозонды локального pH в диагностике онкологических заболеваний / И. Г. Мотевич [и др.] // Оптика и спектроскопия. 2018. Т. 124, № 5. С. 605–611.

# ХЛОРАМИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ АДЕНОЗИНА – НОВЫЕ АНТИАГРЕГАНТЫ КОВАЛЕНТНОГО ТИПА ДЕЙСТВИЯ

**М. А. Мурина<sup>1</sup>, Л. А. Милойкович<sup>1,2</sup>, А. К. Аносов<sup>2</sup>, Д. И. Рощупкин<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

<sup>2</sup>ГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

Сердечно-сосудистые патологии являются основной причиной смертности и инвалидизации населения в промышленно развитых странах. Наиболее тяжелые заболевания в этой группе обусловлены развитием тромбоза в местах патологического (чаще всего атеросклеротического) изменения сосудов. К ним относятся ишемический инсульт, инфаркт миокарда, острый коронарный синдром и некоторые др.

Целью работы было создание оригинального препарата на основе хлораминовых производных структурных аналогов аденозина, которые можно отнести к классу ковалентных ингибиторов тромбоцитов (антиагрегантов), эффективных лекарственных средств для борьбы с артериальными тромбозами. В работе исследованы эффективность и механизм действия ряда соединений, включая N6-хлораденозин, N6-хлор-АМФ, N6-хлор-АТФ и др. (аденозиновые хлорамины), на функциональную активность тромбоцитов. Объектом исследования были изолированные тромбоциты, тромбоциты в составе плазмы и цельной крови; клетки активировали агонистами АДФ, тромбином, коллагеном; агрегационную активность тромбоцитов контролировали турбидиметрическим методом.

Ранее нами установлено, что аденозиновые хлорамины характеризуются повышенной реакционной способностью по отношению к сульфгидрильной группе [1]. Тромбоциты имеют на внешней поверхности специфические рецепторы к аденозину и его аналогам. Мы полагали, что хлорамины аденозинов будут не только связываться с этими рецепторами, но и химически модифицировать серосодержащие атомные группы в составе рецепторов. Установлено, что собственная чувствительность тромбоцитов как мишеней для аденозиновых хлораминов высокая. Так, агрегации тромбоцитов в суспензии изолированных клеток снижается примерно в 2 раза при микромолярных концентрациях хлораминов (2,0–10 мкМ). Аденозиновые хлорамины являются эффективными ингибиторами функций тромбоцитов в присутствии плазмы крови (БТП) и цельной крови. Они, во-первых, угнетают агрегацию тромбоцитов. Существенный эффект ингибирования (на 50%) проявляется в БТП и крови при их концентрации 50–100 мкМ. Во-вторых, аденозиновые хлорамины способны тормозить агрегацию уже активированных клеток и вызывать распад сформированных агрегатов: введенные в БТП через 1,5 мин после агониста, хлорамины (50–100 мкМ) резко ослабляют дальнейшую агрегацию. По-видимому, это явление обусловлено ингибированием дегрануляции клеток. Таким образом, созданные антиагреганты обладают способностью оказывать действие на активированные тромбоциты, что важно для борьбы с развивающимся внутрисосудистым тромбообразованием. Антиагрегантное свойство хлораминовых аналогов аденозина, вероятно, обусловлено их способностью к модификации сульфгидрильной группы рецепторов плазматической мембраны.

## Библиографические ссылки

1. *Murina M. A., Roshchupkin D. I., Sergienko V. I.* The antiplatelet effect and chemical activity of N6-chloroadenosine phosphate // *Biophysics*. 2021. Vol. 66. P. 535–540.

## КЛЕТОЧНАЯ ИЗБИРАТЕЛЬНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ХЛОРАМИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ АДЕНОЗИНА

М. А. Мурина<sup>1</sup>, Е. В. Михальчик<sup>1</sup>, Д. И. Рощупкин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

<sup>2</sup>ГБОУ РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

В настоящее время актуальным являются поиск и разработка новых средств предотвращения внутрисосудистого тромбообразования. С целью создания необратимого ингибитора тромбоцитов на основе хлораминовых производных структурных аналогов аденозина, в работе проведено изучение избирательности действия этих соединений на тромбоциты путем сопоставления с действием на другие клетки крови.

Для определения чувствительности различных клеток в крови к действию хлораминов определяли, во-первых, снижение степени агрегации тромбоцитов, во-вторых, изменение скорости образования активных форм кислорода нейтрофилов и, в-третьих, скорость гемолиза. Клеточная система, использованная в настоящей работе для изучения антиагрегантной активности хлораминов, в наибольшей степени приближена к условиям в организме. С использованием агрегометра (WBA-591, Chrono-log, США) измеряли кинетическую кривую агрегации тромбоцитов в образцах крови, представляющую собой зависимость сопротивления для переменного электрического тока от времени. Аденозиновые хлорамины, введенные в образцы крови в концентрации 100 мкМ, вызывали существенное (более 50%) угнетение агрегационной активности тромбоцитов. Модификация нейтрофилов была изучена хемилюминесцентным (ХЛ) методом в цельной крови. При введении в кровь форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА) ХЛ ответ нейтрофилов намного превышает ответ других клеток, поэтому использование такой системы позволяет оценивать их реакцию без процедуры предварительного выделения. В качестве активатора свечения использовали люминол, который взаимодействует преимущественно с  $\text{НОСл/ОСл}^-$ , и позволяет регистрировать  $\text{НОСл/ОСл}^-$ , образующиеся и вне-, и внутриклеточно [1]. Регистрировали ХЛ как при не активированном состоянии клеток, так и в условиях их стимуляции (ФМА). Установлено, что ни одно из исследуемых соединений (в диапазоне концентраций 100–200 мкМ) не стимулировало нейтрофилы. Достоверного влияния хлораминов на ФМА-индуцированный ХЛ ответ цельной крови также не обнаружено. Изучали модификацию эритроцитов, регистрируя гемолитический эффект, обусловленный изменением проницаемости их плазматической мембраны. Мембранотропное действие хлораминов на эритроциты исследовано при их введении в цельную кровь. Концентрация хлораминов в этих опытах была значительно выше тех, при которых наблюдалось заметное антиагрегационное действие. Полученные результаты свидетельствуют, исследуемые хлорамины (400–600 мкМ) не вызывают гемолиза эритроцитов в течение всего срока наблюдения (24 ч). Таким образом, хлорамины в концентрациях, при которых происходит ингибирование агрегации тромбоцитов в цельной крови, не вызывают повреждения эритроцитов по критерию гемолиза. Та-

ким образом, хлораминовые производные аденозинов в крови действуют на тромбоциты избирательно: на уровне сильного ингибирования агрегации тромбоцитов изменение свойств эритроцитов и лейкоцитов не происходит.

#### **Библиографические ссылки**

1. *Roshchupkin D. I., Belakina N. S., Murina M. A.* Luminol-enhanced chemiluminescence of rabbit polymorphonuclear leukocytes: the nature of oxidants that directly induce luminol oxidation // *Biofizika*. 2006. Vol. 51, iss. 1. P. 99–107.

## **АКТИВАТОРЫ МИТОФАГИИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРЫ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА**

**А. Д. Надеев, Е. И. Федотова, К. А. Крицкая, А. В. Бережнов**

*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГБУ науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»», Пушкино, Россия*

Механизмы повреждения нейронов при болезни Паркинсона (БП) остаются неразгаданными, но аномальное функционирование митохондрий являются ключевым этапом в процессах гибели клеток. Во всех клетках есть механизм утилизации поврежденных митохондрий – митофагия. Почти единственным известным способ умеренной активации митофагии является закисление внутриклеточной среды. Ранее, в исследованиях на клеточных культурах, нами были обнаружены нетоксичные клеточные метаболиты, а именно лактат и пируват натрия, способные активировать митофагию, закисляя цитозоль.

Целью дальнейших исследований стало использование этих подходов на организменном уровне, на лабораторных животных – мышах. В качестве токсических моделей БП применяли ротеноновую и МРТР модели. Для оценки моторных функций применяли тесты «сужающаяся дорожка», «цилиндр», «шест». Выживаемость нейронов в нигростриальных областях оценивали на препаратах парафинизированных срезов, окрашенных по Нисслю.

В ротеноновой модели увеличение лактата моделировали умеренной физической нагрузкой. Такой вид терапии не показал положительных результатов. Напротив, второй подход, заключающийся в ингаляции 20% CO<sub>2</sub>, для достижения временного закисления оказался успешным.

В модели с другим нейротоксином – МРТР – наиболее успешной оказалась терапия, заключающаяся во внутрибрюшинном введении пирувата натрия. Экспериментальные животные, в отличие от контрольной группы, не утрачивали координацию, а также сохранили больше нейронов в области черной субстанции.

Таким образом, мы предполагаем, что закисление внутриклеточной среды, активирующее процесс митофагии, может быть перспективным терапевтическим подходом для лечения БП.

## РОЛЬ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В АПОПТОТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ ЦИТОХРОМА C

**А. Н. Осипов, А. Ю. Макаров, В. В. Волков, Е. Д. ИONOва, А. А. Стручкова,  
М. Сучков, С. Смолева, Г. О. Степанов**

*ГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия*

Молекулярные и клеточные механизмы запрограммированной гибели клеток являются одним из наиболее популярных направлений исследований в современной медицинской биофизике. На сегодняшний день известно более десятка видов запрограммированной гибели клеток, отличающихся по механизму и типам клеток или органелл, участвующих в этом процессе [1, 2]. Можно предположить, что большое количество типов клеточной гибели тесно связаны друг с другом или являются последовательными стадиями одного процесса. Так хорошо известно, что в процессе апоптоза происходит выход цитохрома C из митохондрий в результате открытия мегапор во внешней мембране митохондрий. Выход цитохрома C в цитоплазму знаменует значительным повышением пероксида водорода в межмембранном пространстве и запуске перекисного окисления липидов митохондриальных мембран, т.к. в результате разрыва митохондриальной цепи переноса электронов происходит усиление образования супероксидных радикалов. Изучению молекулярных механизмов процессов, запускаемых при апоптотических реакциях посвящено данное исследование.

В основу исследования положены реакции, появляющиеся при взаимодействии пероксида водорода с фосфолипидным комплексом цитохрома C митохондрий. Проведенные исследования показали, что низкие концентрации пероксида водорода (1–10 мкМ) инициируют появление пероксидазной активности у комплексов цитохрома C с анионными фосфолипидами. Такие реакции соответствуют апоптотическим процессам. Если же концентрация пероксида водорода велика (100 мкМ и выше), то в результате взаимодействия комплекса цитохрома C с пероксидом водорода происходит разрушение гема цитохрома C и выход свободного железа из цитохрома C, что можно видеть по уменьшению полосы Core. Кроме того, нами обнаружено, что появление свободного железа в митохондриях приводит к запуску процессов перекисного окисления липидов. Процессы запрограммированной гибели клеток с участием свободного железа принято относить к ферроптотическим. Полученные результаты позволяют предположить, что изменение концентрации пероксида водорода в митохондриях может служить регулятором переключения различных механизмов запрограммированной гибели клеток.

### Библиографические ссылки

1. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease / B. R. Stockwell [et al.] // Cell. 2017. Vol. 171, iss. 2. P. 273–285.
2. Redox lipid reprogramming commands susceptibility of macrophages and microglia to ferroptotic death / A. A. Kapralov [et al.] // Nat Chem Biol. 2020. Vol. 16, iss. 3. P. 278–290.

# ГОМЕОСТАЗ ЭЛЕКТРОГЕННЫХ МЕТАЛЛОВ В ЭПИДЕРМИСЕ КАК ФЕНОМЕН САМООРГАНИЗОВАННОЙ КРИТИЧНОСТИ

**В. И. Петухов<sup>1</sup>, Е. В. Дмитриев<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Балтийская международная академия, Рига, Латвия*

<sup>2</sup>*Институт вычислительной математики РАН, Москва, Россия*

Гомеостаз электрогенных металлов (ЭМ) в эпидермисе (волосы) принципиально отличается от аналогичного процесса в целом организме. Если в первом случае речь может идти о локальном гомеостатическом контроле трафика металлов в деривате эпидермиса (который, как известно, не относится к электровозбудимым тканям), то гомеостаз Na, K и Ca во всем организме определяется непосредственным участием этих металлов в поддержании водно-электролитного баланса и нормальным функционированием электровозбудимых тканей (мышечной и нервной).

Основываясь на ключевых положениях теории самоорганизованной критичности (СК) [1], авторы выдвинули гипотезу о существовании локального гомеостаза ЭМ на уровне эпидермиса.

Мембранные помпы – АТФазы (Р-типа), осуществляющие металлотрафик в эпидермисе, будучи осцилляторами, способны (согласно теории СК) к самоорганизации – переходу в критический (синхронный) режим работы. В роли активаторов этих насосов могут выступать активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА), в частности NO или, точнее, его производные: ионы нитрозония (NO<sup>+</sup>) и нитроксила (NO<sup>-</sup>). Основным источником этих ионов, способных S-нитрозировать тиоловые группы белков и способствовать их взаимодействию с другими биологически активными молекулами, является постоянно функционирующая в режиме автокатализа (по типу реакции Белоусова-Жаботинского) трехкомпонентная химическая система, состоящая из NO, негемового Fe<sup>2+</sup> и низкомолекулярных тиолов [2]. В этой системе, целью которой является продление посреднической функции нитроксида, происходит постоянное взаимное превращение образующихся динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами ( $\{(RS-)_2 Fe^{2+}(NO)_2\}^+$ ) и S-нитрозотиолов (RS-NO). Поэтому при достаточном поступлении необходимых компонентов (NO, тиолы, Fe<sup>2+</sup>) такая система превращается в генератор периодических колебаний уровня NO<sup>+</sup>, которые могут приводить к сопряженным сдвигам в гомеостазе ЭМ, благодаря активирующему действию NO<sup>+</sup> на мембранные АТФазы. Сама активация Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФаз и Ca<sup>2+</sup>-АТФаз происходит при модификации SH-групп цистеина в белковой молекуле этих ферментов с участием АФК (окисление) и/или АФА (нитрозирование). Вместе с тем увеличение продукции АФК и АФА в эпидермисе должно с неизбежностью приводить к увеличению плотности (количества) активированных АТФаз (Р-типа) на мембране клетки, способствуя самозапуску процесса синхронизации (критичности).

Локальный характер гомеостаза ЭМ в эпидермисе делает несостоятельной экстраполяцию на весь организм данных спектроскопии ЭМ в таком биосубстрате, как волосы.

## Библиографические ссылки

1. *Bak P.* How nature works. Copernicus: New York, 1996. – 276 p.
2. *Vanin A.F.* Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working forms” of endogenous nitric oxide // Nitric Oxide Biol. Chem. 2016. Vol. 54. P. 15–29.

## НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА РОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В РАЗВИТИИ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Г. Н. Семенкова<sup>1</sup>, И. Э. Адзерихо<sup>1</sup>, Н. В. Амаэбери<sup>2</sup>, Т. А. Кулагова<sup>2,3</sup>,  
Т. Э. Владимирская<sup>1</sup>

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

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

<sup>3</sup>НИУ «Институт ядерных проблем» БГУ, Минск, Беларусь

Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) – терминальное заболевание, которое характеризуется ремоделированием легочных сосудов, что приводит к повышению сосудистого сопротивления и артериального давления в легочной артерии, а в конечном итоге к правожелудочковой сердечной недостаточности и смерти. В настоящее время принято считать, что основными механизмами сосудистого ремоделирования являются эндотелиальная дисфункция и гиперплазия гладкомышечных клеток. Особенностью ЛАГ является изменение иммунитета и развитие в легких воспаления. Уже подтверждена взаимосвязь воспалительного процесса с ремоделированием легочных сосудов и прогрессирующей плексиформной артериопатии. Однако детальные механизмы развития воспаления при этой патологии не установлены. Не определён также вклад индукторов оксидативного стресса в этот процесс. Понимание роли воспаления в патогенезе ЛАГ является важным для выявления соответствующих мишеней и поиска терапевтического окна для эффективного лечения этой патологии. Цель нашей работы: определить роль оксидативного стресса в развитии воспаления в динамике экспериментальной ЛАГ.

Исследования проводили на взрослых белых беспородных крысах в соответствии с принципами биоэтики с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (<https://bioethics.belmapo.by/research-ethics.html>). Для создания физиологической модели ЛАГ крысам вводили монокроталин подкожно (60 мг/кг). Животных выводили из эксперимента через 2, 4, 6 и 8 нед. развития ЛАГ. Исследовали образцы легочной ткани, сыворотку, плазму и нейтрофилы периферической крови.

Установлено, что ранних стадиях заболевания (2, 4 нед.) увеличивается уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6 в сыворотке крови и легочной ткани. Затем наблюдается снижение концентрации этих цитокинов. При этом, в процессе развития ЛАГ (4, 6 и 8 нед.) динамично повышается продукция противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Эти цитокины участвуют в стимуляции нейтрофилов и нейтрофил-опосредованного воспаления. Показано, что при прогрессировании ЛАГ происходит праймирование нейтрофилов, что выражается в усилении их функционального ответа по кальций-зависимому механизму. В динамике ЛАГ наблюдается поступательное повышение генерации активных форм кислорода и хлора клетками, усиление секреторной дегрануляции, увеличение количества, а также галогенирующей и пероксидазной активности миелопероксидазы в плазме, снижение уровня глутатиона в сыворотке крови. На поздних стадиях ЛАГ для нейтрофилов животных характерна повышенная способность к образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек. Избыток миелопероксидазы во внеклеточной среде может приводить к гиперпродукции хлорноватистой кислоты, которая является сильным окислителем и хлорирующим агентом, модифицирующим или повреждающим жизненно важные (в особенности, для клеток сосудистой стенки) молекулы. Все это свидетельствует о формировании оксидативного стресса и его важной роли для прогрессирования ЛАГ на поздних стадиях.

# ОЦЕНКА ЭМОЦИИ ОТВРАЩЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ШУМА ИЗ ДИАПАЗОНА WiFi

А. В. Сидоренко, Н. А. Солодухо

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

Технология WiFi на сегодняшний момент используется практически во всех сферах жизнедеятельности человека. В связи с этим важным становится оценка влияния этого излучения на организм человека, в частности на эмоциональное состояние.

**Методика проведения исследований.** Регистрация электроэнцефалограмм осуществлялась по стандартной схеме «10/20» с использованием электроэнцефалографа «Нейрон-Спектр-4» фирмы Нейрософт. Анализировались ЭЭГ мужчин. Электроэнцефалограммы обрабатывались в режимах: фон (режим 1), облучение на частотах 2,4–2,5 ГГц и 5,15–5,35 ГГц в пределах нормы (режим 2), облучение на частотах 2,4–2,5 ГГц и 5,15–5,35 ГГц выше нормы (режим 3). Изучались следующие количественные параметры ЭЭГ: спектральная плотность мощности альфа-ритма в отведениях T3 и T4, спектральная плотность мощности дельта-, тета-, альфа-, бета-, гамма-ритмов, усредненная по всей поверхности головы, фрактальная размерность в отведениях Fp1, Fp2, F3, F4, C3, C4, P3, P4, O1, O2, F7, F8, T3, T4, T6, T5, Cz, Fz, Pz, Fpz, Oz.

**Методика оценки эмоционального состояния человека.** В состоянии отвращения спектральная плотность мощности альфа-ритма в отведении T3 больше, чем в отведении T4 [1]. В [2] показано, что при негативной эмоции спектральная плотность мощности дельта-ритма, усредненная по всей поверхности головы, уменьшается, а тета-, альфа-, бета-, гамма-ритмов – возрастает. Фрактальная размерность в отведениях во всех отведениях головы возрастает, когда человек испытывает веселье, страх, отвращение [3].

**Результаты.** В режиме 1 спектральная плотность мощности альфа-ритма ЭЭГ в отведении T4 была больше, чем в отведении T3, а в режимах 2 и 3 – наоборот,  $T3_{\alpha} > T4_{\alpha}$ . В режимах 2 и 3 спектральная плотность мощности дельта, тета-ритмов ЭЭГ, усредненная по всей поверхности головы, уменьшается, а альфа-, бета, гамма-ритмов – возрастает. Это подтверждает, что человек испытывает негативную эмоцию. Фрактальная размерность в режиме 2 в отведениях F3, F8, T4 T6 падает относительно фона, в остальных отведениях ЭЭГ она возрастает относительно фона. Фрактальная размерность в режиме 3 в отведениях T4 T6, падает относительно фона, а в остальных отведениях возрастает относительно фона. Это подтверждает, что человек в состояниях 2 и 3 испытывает веселье, страх либо отвращение. На основании вышеизложенного можно сделать заключение, что человек при воздействии электромагнитного шума из диапазона WiFi начинает испытывать отвращение.

## Библиографические ссылки

1. Approach-withdrawal and cerebral asymmetry: emotional expression and brain physiology / R. J. Davidson [et al.] // *Journal of Personality and Social Psychology*. 1990. Vol. 58, iss. 2. P. 330–341.
2. The influence of emotional states on short-term memory retention by using electroencephalography (EEG) measurements: a case study / I. A. Badara [et al.] // *Materials of 10th international joint conference on biomedical engineering systems and technologies*, Porto, 21–23 Feb. 2017. P. 205–213.
3. *Padial R. E., Ibáñez-Molina A. J.* Fractal dimension of EEG signals and heart dynamics in discrete emotional states // *Biological Psychology*. 2018. Vol. 137. P. 42–48.

## СОДЕРЖАНИЕ ИОНОВ ТИТАНА В ЭРИТРОЦИТАХ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ВЫЯВЛЕННОЙ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ДИОКСИДУ ТИТАНА

А. С. Скоробогатова<sup>1</sup>, Е. В. Венская<sup>1</sup>, М. Д. Садовничук<sup>1</sup>, Н. С. Аляхнович<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Беларусь

По литературным данным люди получают диоксид титана (TiO<sub>2</sub>) ежедневно в количестве 0,5–3,2 мг/кг массы тела в зависимости от привычек питания и приема лекарственных средств [1]. Кроме того, диоксид титана входит в состав изделий медицинского назначения, например, эндопротезы суставов и зубные импланты, что также способствует проникновению титана в организм пациентов.

В нашей работе проведено изучение содержания ионов титана в эритроцитах и плазме крови пациентов, постоянно контактирующих с изделиями медицинского назначения, содержащими титан, с наличием или отсутствием клинических симптомов непереносимости титана, диоксида титана и/или других металлов. В исследование после получения предварительного согласия было включено 53 человека. У всех обследованных проведен забор крови до проведения провокационной пробы с 2 мг TiO<sub>2</sub> сублингвально [1]. Всех обследуемых разделили по наличию/отсутствию достоверного прироста пероксидазной активности ротовой жидкости после провокационной пробы с TiO<sub>2</sub>, что свидетельствовало о гиперчувствительности к TiO<sub>2</sub> (группа 1 (n=22) и 0 (n=17), соответственно).

Содержание титана определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на приборе ICPE-9000 (Shimadzu, Япония). Подготовку проб к измерению осуществляли путем «мокрой» кислотной минерализация образцов с использованием системы микроволновой пробоподготовки Milestone Ethos E (Италия).

В группе 1 медиана содержания титана составила 0,4005 мг/л (межквартильный интервал 0,2401–1,2266 мг/л), а в группе 0 – 0,3680 мг/л (межквартильный интервал 0,1975–0,8554 мг/л). Статистический анализ позволил обнаружить достоверное различие содержания титана в эритроцитах пациентов групп 1 и 0 (p=0,03515, тест Колмогорова-Смирнова).

Медиана содержания титана в плазме крови обследуемых группы 1 составила 0,1809 мг/л (межквартильный интервал 0,08120–0,2412 мг/л), а в группе 0 – 0,1576 мг/л (межквартильный интервал 0,1022–0,2542 мг/л). Достоверных различий содержания элемента в группах сравнения не обнаружено.

Таким образом, показано, что эритроциты пациентов с гиперчувствительностью к TiO<sub>2</sub> накапливают титан в более высоких количествах, чем плазма крови. Вероятнее всего это связано с тем, что содержание элементов в плазме и сыворотке крови отражает текущий обменный статус и зависит как от количества транспортных белков, так и от поступившей дозы вещества, а эритроциты накапливают элементы в результате более медленных обменных процессов.

### Библиографические ссылки

1. Аляхнович Н. С. Клиника и диагностика гиперчувствительности, вызванной титаном и его оксидом // Рецепт. 2022. Т. 25, № 6. С. 771–780.

# МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Е. И. Слобожанина, Е. В. Шамова

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

Металлотионеины (МТ) – цистеин-обогащенные белки, связывающие переходные металлы, обнаружены во всех эукариотических клетках и некоторых прокариотах. У млекопитающих обнаружены различные изоформы МТ, названные МТ-I – МТ-IV. Несмотря на большое разнообразие физиологических функций, которые выполняют МТ в клетках млекопитающих, большинство из них эти белки осуществляют именно благодаря способности предоставлять биодоступный цинк участникам биохимических реакций.

Ранее в лаборатории медицинской биофизики нашего института показана роль МТ в опухолевых клетках [1] и участие МТ в гомеостазе цинка и редокс-состоянии в эритроцитах кардиологических пациентов [2], а также в лимфоцитах пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом (В-ХЛЛ). Выявлены изменения, как в активности каспазы-3, так и в уровне содержания МТ I/II в лейкемических лимфоцитах после их экспозиции с  $Zn^{2+}$ ,  $H_2O_2$  и N-ацетилцистеином. Оценка уровня экспрессии МТ и активности каспазы 3 в лимфоцитах здоровых доноров и пациентов с В-ХЛЛ позволила обнаружить при физиологических условиях повышенную активность каспазы-3 по сравнению с нормой, а при окислительном стрессе в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ – снижение уровня МТ и обратную корреляцию между содержанием этого белка и количеством жизнеспособных клеток, что указывало на запуск апоптотических процессов по каспазы-3-зависимому механизму, в котором одним из основных триггеров могут выступать МТ [3]. Так как *in vivo* МТ связывают преимущественно  $Zn^{2+}$  и  $Cu^+$ , и таким образом, участвуют в поддержании внутриклеточного гомеостаза именно этих эссенциальных микроэлементов, можно было предположить, что в группе пациентов с В-ХЛЛ при прогрессировании заболевания, значения отношений концентрации цинка к меди имеет прямую взаимосвязь с функцией МТ. Изучена взаимосвязь между содержанием МТ, ионов меди и цинка в плазме крови при В-ХЛЛ в зависимости от прогрессирования заболевания [4]. Показано, что у пациентов с В-ХЛЛ при прогрессирующем заболевании и частичной ремиссии значения отношений цинка к меди в плазме крови достоверно снижались. Корреляционный анализ показал, что существует связь между уровнем МТ, концентрацией меди и цинка в плазме крови при ХЛЛ в зависимости от прогрессирования заболевания.

Из полученных данных следует, что отношение концентрации цинка к меди и уровень МТ в плазме периферической крови могут быть потенциальными прогностическими маркерами при терапии В-ХЛЛ.

## Библиографические ссылки

1. Экспрессия ABCB1, ABCC1 и металлотионеинов в В-лимфоцитарной клеточной линии IM-9 при формировании множественной лекарственной устойчивости / А. В. Тамашевский [и др.] // Новости медико-биологических наук. 2017. Т. 16, № 1. С. 108.

2. *Harmaza Y., Tamashevski A., Slobozhanina E.* The role of metallothioneins in the maintenance of zinc homeostasis and redox state in erythrocytes of cardiologic patients with the metabolic disorders // *JIOMICS*. 2019. Vol. 260. P. 1–7.

3. Изучение экспрессии металлотioneинов и активности каспазы-3 в лимфоцитах пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом до и после модификации клеточного редокс-баланса / А. В. Тамашевский [и др.] // *Новости медико-биологических наук*. 2023. Т. 23, № 2. С. 62–68.

4. Изменение уровня металлотioneинов, цинка и меди в плазме крови пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом / Е. И. Слобожанина [и др.] // *Доклады НАН Беларуси*. 2023. Т. 67, № 5. С. 410–416.

## ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ МЕХАНИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ ВОЛОСКОВЫХ КЛЕТОК ОТОЛИТОВЫХ ОРГАНОВ КРЫСЫ

Л. В. Смаглий<sup>1-3</sup>, В. П. Демкин<sup>1</sup>, М. В. Светлик<sup>1</sup>, С. В. Мельничук<sup>1</sup>,  
Т. В. Руденко<sup>1,2</sup>, М. Д. Акинина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Томский государственный университет, г. Томск, Россия

<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия

<sup>3</sup>Северский биофизический научный центр, г. Северск, Россия

Вестибулярная система человека обеспечивает восприятие информации об изменении положения тела в пространстве и последующее перераспределение мышечного тонуса и сохранение равновесия. Функциональные нарушения вестибулярной системы вызывают постуральную нестабильность, осциллопсию и хроническое нарушение равновесия. При двухсторонней вестибулярной дисфункции единственным методом лечения является имплантация вестибулярного протеза. Изучение механизмов работы вестибулярного аппарата человека *in vivo* очень сложна, в связи с чем эффективным методом является физико-математическое моделирование и последующая проверка результатов расчетов с экспериментальными результатами, полученными на лабораторных животных [1]. Отолитовые органы (утрикула и саккула) наряду с полукружными каналами обеспечивают интегративный ответ на изменение положения головы. Гетерогенное строение отолитовой мембраны, включающей три слоя (гель-слой, мэш-слой, слой отолитов), а также различная чувствительность афферентов стриолярной и экстрастриолярной области к высоко- и низкочастотным стимулам не позволяют однозначно определить экспериментальными методами параметры электрической стимуляции при протезировании вестибулярного аппарата. В связи с этим нами предложена физико-математическая модель динамики отолитовых органов, учитывающая структурно-морфологические особенности отолитовой мембраны и позволяющая выявить и спрогнозировать ответ при действии периодического механического стимула.

Модельным объектом служили отолитовые органы крысы. Построение геометрической модели утрикулы и саккулы крысы производили на основании данных Desai S.S. с соавт. (2005). Расчет степени активации волосковых клеток отолитовых мембран проводили с использованием программного обеспечения COMSOL Multiphysics® 4.2. и метода конечных элементов для вычисления 3D-смещений слоев отолитовой мембраны при действии механического стимула, соответствующего гармоническим колебаниям в диапазоне частот 0–5000 Гц, шагом 10 Гц и направленным вдоль главных осей головы (X, Y, Z). Выявлен резонансный характер зависимости смещения слоев отолитовой мембраны от частоты внешнего стимула. Определены резонансные частоты колебаний гель-слоя (230±5 Гц, 1430±5 Гц, 3290±5 Гц,) и границы гель-мэш слоев (330±5 Гц, 1720±5 Гц, 4360±5 Гц) утрикулы, а также гель-слоя (370±5 Гц, 1500±5 Гц, 2575±5 Гц, 3300±5 Гц, 4530±5 Гц) и границы гель-мэш слоев (390±5 Гц, 1490±5 Гц, 2640±5 Гц) саккулы. Установлено, что гель-слой отолитовой мембраны преимущественно реагирует на высокочастотную стимуляцию и обуславливает преобладание высокочастотных колебаний волосковых клеток в области стриолы.

В то же время мэш-слой отолитовой мембраны реагирует на низкочастотную стимуляцию и обуславливает преобладание низкочастотных колебаний волосковых клеток в области экстрастриолы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00259.

### **Библиографические ссылки**

1. The vestibular implant: Opinion statement on implantation criteria for research / R. van de Berg [et al.] // Journal of Vestibular Research. 2020. Vol. 30. P. 213–223.

## АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ *IN SILICO* С ПРИМЕНЕНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА

Г. Г. Султанова, Р. А. Ганиева, С. Б. Дадашева, Х. Х. Мамедова, В. Х. Гасимова,  
Н. Б. Гусейнова

*Институт ботаники Министерства науки и образования АР, Азербайджанский  
медицинский университет, Баку, Азербайджан*

Нами исследовано сродство некоторых веществ (-галантамин, пентахлорнитробензол, пентахлорфенат натрия, рогор (диметоат), трихлоруксусная кислота, трихлорфон, три-терпеноид, сапонин и стероидный алкалоид) к рекомбинантной ацетилхолинэстеразе человека (PDB ID: 4EY6). Ацетилхолинэстераза (АХЭ), катализируя расщепление ацетилхолина, является важным ферментом, который способствует прекращению передачи нервных импульсов в частности при болезни Паркинсона и Альцгеймера, относящихся к неврологическим заболеваниям, приводящим к нарушению регуляции активности АХЭ. Исследования с использованием молекулярного докинга *in silico* предлагают экономичный метод создания лекарств, поскольку позволяют получить важную информацию о взаимодействиях между предполагаемыми лигандами и белками-мишенями.

Для анализа молекулярного взаимодействия использовалось программное обеспечение Biovia Discovery Studio 2023. Рекомбинантная АХЭ человека в комплексе с рентгенокристаллическими структурами белка (-)-галантамина (PDB ID: 4EY6) были получены из Банка данных о белках. После добавления водорода к белку 4EY6 с использованием алгоритма force field энергия белка была снижена с помощью силового поля CHARMM. SDF-файлы молекул изученных соединений были получены из базы данных PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Показано, что галантамин обладает высокой склонностью к связыванию с активным участком АХЭ, где он образует жизненно важные контакты с важными остатками. В силу большого размера такие вещества, как стероидные алкалоиды и сапонин, не вступают в значимые взаимодействия с активным центром АХЭ. В тоже время пентахлорфенат натрия, пентахлорнитробензол, рогор (диметоат), трихлоруксусная кислота, трихлорфон и тритерпеноид, продемонстрировали различную степень сродства к АХЭ, что указывает на их потенциал в качестве модуляторов или ингибиторов АХЭ.

Полученные результаты характеризуют фармакологическое воздействие соединений и предоставляют полезную информацию о молекулярных взаимодействиях между АХЭ и другими веществами. Высокая степень связывания соединений с АХЭ может предложить их для дополнительного тестирования и разработки лекарств с учетом размера и формы молекул для взаимодействия лиганд-белок.

Наши исследования проливает свет на возможные фармакологические действие соединений на рекомбинантную АХЭ человека и предоставляет важную информацию для создания новых методов лечения нейродегенеративных заболеваний.

### Библиографические ссылки

1. *In vitro* and *in silico* acetylcholinesterase inhibitory activity of thalicttricavine and canadine and their predicted penetration across the blood-brain barrier / J. Chlebek [et al.] // *Molecules*. 2019. Vol. 24. iss. 7. P. 1340.
2. *Sajid J. Q. M., Imran Khan M., Alharbi Ali H.* Identification of natural compounds of the apple as inhibitors against cholinesterase for the treatment of Alzheimer's disease: an *in silico* molecular docking simulation and ADMET study // *Nutrients*. 2023. Vol. 15, iss. 7. P. 1579.

## ОЦЕНКА СТАТУСА ДЕСИАЛИРОВАНИЯ ТРОМБОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННЫХ ЛЕКТИНОВ

М. Д. Сысоев, А. А. Игнатова, Е. В. Сунцова, М. А. Пантелеев

ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва,  
Российская Федерация

Измерение уровня десиалирования (снижения количества сиаловых кислот) тромбоцитов как маркера тяжелого течения иммунной тромбоцитопении (ИТП) представляет большой научно-клинический интерес. Уровень десиалирования измеряется с помощью меченых лектинов [1].

Целью данной работы является определение параметров связывания ( $EC_{50}$ ) лектинов с тромбоцитами и подбор условий для разработки оптимизированного протокола измерения уровня десиалирования тромбоцитов.

Для измерения содержания сиаловых кислот на поверхности тромбоцитов использовалась комбинация трех флуоресцентно меченых лектинов: SNA и MAL-II, связывающиеся с различными формами сиаловой кислоты, и RCA-I, связывающийся с десиалированными углеводными остатками. Такой выбор лектинов позволяет более корректно охарактеризовать статус десиалирования тромбоцитов. В качестве метода измерения флуоресценции лектинов, связанных с тромбоцитами, использовалась точная цитофлуориметрия. В качестве положительного контроля используются пробы с добавленной нейраминидазой.

В ходе работы были получены  $EC_{50}$  связывания лектинов SNA, MAL-II и RCA-I с отмытыми тромбоцитами в суспензии – 2,9, 3,6 и 7,1 мкг/мл соответственно. Также были получены зависимости связывания лектинов от концентрации тромбоцитов, где был показан интервал  $10^3$ – $10^4$  тромбоцитов/мкл, в пределах которого связывание лектинов значительно не меняется. Полученные данные позволяют увидеть, в каких пределах концентраций лектинов и тромбоцитов находится зона насыщения.

На основе полученных параметров и зависимостей нами предложены концентрации лектинов и тромбоцитов, определенные как наиболее оптимальные для измерения уровня десиалирования. В текущее время протокол измерения используется нами в апробации с участием здоровых доноров и пациентов с хронической ИТП.

Авторы выражают благодарность фонду “Наука – детям” за поддержку исследования.

### Библиографические ссылки

1. Measuring beta-D-galactose exposure on platelets: Standardization and healthy reference values / D. Lasne [et al.] // Res. Pract. Thromb. Haemost. 2020. Vol. 4, iss. 5. P. 813–822.

# ФОТОИНДУЦИРОВАННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВЫМ КРАСИТЕЛЕМ С ОБЪЕМНЫМИ ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ В СТРУКТУРЕ МОЛЕКУЛЫ

**Д. С. Тарасов<sup>1,2</sup>, М. П. Самцов<sup>1</sup>, Е. С. Воропай<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ, Минск, Беларусь*

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

Фотосенсибилизатор на основе индотрикарбоцианинового красителя с ортофениленовым мостиком в цепи сопряжения и двумя полиэтиленгликолями (ПЭГ) на концевых группах при фотоактивации проявляет высокую эффективность повреждения раковых клеток, избирательность накопления и низкую токсичность [1, 2]. В насыщенных воздухом растворах некоторая часть энергии возбуждения молекул полиметиновых красителей (ПК) расходуется на сенсибилизацию образования синглетного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ). Процесс генерации  $^1\text{O}_2$  является причиной фотодеструкции ПК. При этом эффективность ПК в качестве фотосенсибилизаторов для фототерапии в определенной степени зависит от способности к генерации  $^1\text{O}_2$ . В связи с этим установление закономерностей образования  $^1\text{O}_2$  молекулами в условиях соответствующих биологическим тканям представляется важным для выявления механизма фотоактивности новых соединений. Поскольку индотрикарбоцианиновые красители локализованы в раковых клетках в области с низкой диэлектрической проницаемостью, то малополярные растворители являются адекватной модельной средой. В данной работе приведены результаты исследований фотофизических свойств этого соединения в органических растворителях различной полярности.

Проведены исследования спектрально-люминесцентных и фотофизических свойств фотосенсибилизатора на основе индотрикарбоцианинового красителя (ПК1) и его аналог без заместителей ПЭГ (ПК2). Для красителя ПК2 в малополярном хлороформе наблюдается значительный рост  $\gamma_{\Delta}$  при изменении концентрации в диапазоне  $10^{-7}$ – $10^{-5}$  М:  $\gamma_{\Delta}=0,022\pm 0,004$  при  $C_{\text{кр}}=2,6\cdot 10^{-7}$  М до  $\gamma_{\Delta}=0,104\pm 0,016$  при  $C_{\text{кр}}=5,8\cdot 10^{-5}$  М, а для ПК1 с объемными заместителями квантовый выход образования синглетного кислорода имеет постоянное значение  $\gamma_{\Delta}=0,032\pm 0,003$ . Показано, что увеличение квантового выхода фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода ПК2 в малополярном хлороформе обусловлено ростом доли контактных ионных пар в растворе с концентрацией и проявлением эффекта тяжелого атома аниона.

Показано, что присутствие в структуре катионного индотрикарбоцианинового красителя двух цепочек полиэтиленгликолей с молекулярной массой 300 Да препятствует отдалению противоиона от катиона красителя ПК1 в малополярном хлороформе, молекулы красителя находятся в форме контактных ионных пар в исследованном диапазоне концентраций. Наличие объемных заместителей, вследствие стерических препятствий, затрудняет взаимодействие хромофора красителя с растворенным кислородом.

## Библиографические ссылки

1. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics / A. A. Lugovski [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2016. Vol. 316. P. 31–36.

2. Оптимизация параметров источника фотовоздействия при фотохимиотерапии опухолевых тканей лабораторных животных / М. П. Самцов [и др.] // Журнал Белорусского государственного университета. Физика. 2019. Т. 1. С. 19–26.

# ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОЛЕКУЛ ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ ПРИ КОМПЛЕСООБРАЗОВАНИИ С ПОЛИПЕПТИДАМИ

Д. С. Тарасов<sup>1,2</sup>, М. П. Самцов<sup>1</sup>, Ю. И. Ощепкова<sup>3</sup>, А. П. Луговский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ, Минск, Беларусь

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

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

Использование метода фотодинамической терапии (ФДТ) в последние годы выявило высокую эффективность заживления гнойных ран. При ФДТ оказывается воздействие на все фазы раневого процесса. Такая терапия обладает антимикробным и противовоспалительным действием, корректирует метаболические и иммунологические изменения в тканях, ускоряет эпителизацию. Перспективными в качестве фотосенсибилизаторов для антимикробной ФДТ эрозивноязвенных поражений представляются индотрикарбоцианиновые красители, которые активируются световым излучением в окне прозрачности биологических тканей.

В процессе заживления и регенерации тканей наиболее активно участвуют биологически активные вещества пептидной природы, относящиеся к классу липид-переносящих белков. Это происходит за счет взаимодействия с бислойными липидными мембранами при наличии в составе таких фосфолипидов, как диацилглицерол, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол.

В данной работе проведена разработка условий образования комплекса фотосенсибилизатора на основе индотрикарбоцианинового красителя [1] и липид-переносящим белком Ns-LTP1 [2], изучены его фотофизические свойства.

Осуществлен синтез комплекса индотрикарбоцианинового красителя с липидпереносящим белком Ns-LTP1. В основе методики получения комплекса — использование красителя в форме активированного эфира, что позволяет осуществить его связывание с аминок группой белка. Синтез осуществлялся в двухфазной системе белка путем размещения белка в натрий-калиевом фосфатном буфере с рН 7.4 и активированного эфира красителя в 1,2-дихлорэтаноле. Получение комплекса подтверждено на основе анализа фотофизических свойств красителя в фосфатно-солевом буфере, 1,2-дихлорэтаноле и в комплексе с белком в растворе в натрий-калиевом фосфатном буфере, а также на основании данных экстракции 1,2-дихлорэтаном.

Исследованы спектральные свойства красителя в составе полученного комплекса в фосфатносолевом буфере при нагревании и воздействии соляной кислоты при концентрациях, эквивалентных ее содержанию в желудочном соке. Установлено, что соляная кислота (0.1–0.5%) приводит к необратимой деструкции красителя. Предложено при пероральном введении комплекса использовать капсулы, которые выдерживают кислотность желудочного сока и растворяются в кишечнике.

## Библиографические ссылки

1. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics / A. A. Lugovski [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2016. Vol. 316. P. 31–36.

2. Аманликова Д. А., Ощепкова Ю. И. Влияние биологически активных веществ пептидной природы на течение экспериментального язвенного колита // Химико-фармацевтический журнал. 2021. Т. 55, № 7. С. 25–29.

# ДЕЙСТВИЕ ТЕТРАГИДРОБИОПТЕРИНА, УФ ОБЛУЧЕНИЯ И НАНОЧАСТИЦ Pt-Pd НА ТИРОЗИНАЗУ В СВЯЗИ С ПАТОГЕНЕЗОМ ВИТИЛИГО

Т. А. Телегина<sup>1</sup>, Ю. Л. Вечтомова<sup>1</sup>, А. А. Буглак<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Витилиго – это хроническое дерматологическое заболевание, характеризующееся образованием депигментированных пятен на коже вследствие нарушения биосинтеза меланина. Пусковой момент нарушений меланогенеза в меланоцитах, по-видимому, связан с функционированием тетрагидробиоптерина (H<sub>4</sub>Bip) – кофермента фенилаланингидроксилазы [1–3]. При витилиго в меланоцитах фиксируется 3-5 кратный избыток H<sub>4</sub>Bip, который ингибирует тирозиназу – ключевой фермент в синтезе меланина.

Показано, что наибольшее негативное влияние на тирозиназу и, по-видимому, на весь процесс синтеза меланина может оказывать присутствие избытка H<sub>4</sub>Bip. УФ облучение при 308 и 325 нм влияет на протекание ферментативного процесса относительно темного варианта, частично снимая ингибирующее влияние H<sub>4</sub>Bip путём перевода его в димеры дигидроптерина. При добавлении наночастиц Pt-Pd в реакционную систему с H<sub>4</sub>Bip активность тирозиназы восстанавливается на 87%, что обусловлено, в первую очередь, окислением H<sub>4</sub>Bip до дигидробиоптерина (H<sub>2</sub>Bip), который не является ингибитором тирозиназы. При действии УФ (308 и 325 нм) H<sub>2</sub>Bip *in situ* может взаимодействовать с хиноноидным дигидробиоптеринном (первым продуктом автоокисления H<sub>4</sub>Bip), образуя димеры дигидроптерина. Таким образом, проводя фото реакцию димеризации с высокой скоростью в присутствии наночастиц Pt-Pd можно добиться быстрого удаления H<sub>4</sub>Bip, негативно влияющего на биосинтез меланина при витилиго. Также следует отметить, что наночастицы Pt-Pd могут катализировать разложение пероксида водорода, вызывающего нарушение функционирования и потерю меланоцитов при витилиго [4].

Работа поддержана грантом РФФ № 20-73-10029.

## Библиографические ссылки

1. Фотоокисление тетрагидробиоптерина как основа фототерапии витилиго / Т. А. Телегина [и др.] // Оптика и спектроскопия. 2022. Т. 130, № 5. С. 761–767.
2. Insights into molecular structure of pterins suitable for biomedical applications / А. А. Buglak [et al.] // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, iss. 23. P. 15222.
3. Tetrahydrobiopterin as a trigger for vitiligo: phototransformation during UV irradiation / Т. А. Telegina [et al.] // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, iss. 17. P. 13586.
4. Oxidative deterioration of platinum nanoparticle and its prevention by palladium / Н. Okamoto [et al.] // Exp. Derm. 2012. Vol. 21. P. 5–7.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА УРОВНЕЙ МАРКЕРОВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА ПРИ НОРМАЛЬНОЙ БЕРЕМЕННОСТИ И ПРЕЭКЛАМПСИИ

**Ю. О. Теселкин, И. В. Бабенкова, С. Ю. Лебедева, Ю. В. Выхристюк,  
Р. И. Шалина, А. Н. Осипов**

*РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

Преэклампсия – специфичный для беременности клинический синдром, который является основной причиной материнской и неонатальной заболеваемости и смертности. Важную роль в патогенезе преэклампсии играет оксидативный стресс. Определение маркеров оксидативного стресса при преэклампсии позволяет оценить интенсивность свободно-радикальных реакций, состояние системы антиоксидантной защиты и имеет прогностическое значение. К числу таких маркеров относятся модифицированный ишемией альбумин (ischemia-modified albumin – IMA) и антиоксидантная способность (АОС) сыворотки крови. Вместе с тем известно, что нормальная беременность также сопровождается активацией оксидативного стресса, который является физиологически обусловленным. При этом уровень IMA в сыворотке крови у беременных женщин существенно выше, чем у небеременных. Что касается АОС сыворотки крови, то изменение этого маркера при нормальной беременности и преэклампсии, по данным разных авторов, носит противоречивый характер и нуждается в дальнейшем исследовании. Цель работы – сравнительное изучение содержания IMA в сыворотке крови и АОС сыворотки крови у здоровых беременных женщин и пациенток с преэклампсией.

Обследовано 140 женщин в возрасте 20–40 лет, среди них 30 здоровых небеременных и 110 беременных женщин, срок беременности –  $\geq 32$  недель, которые были разделены на четыре группы: 1-я – здоровые небеременные женщины ( $n=30$ ); 2-я – здоровые нормотензивные беременные женщины ( $n=30$ ); 3-я – пациентки с умеренной преэклампсией ( $n=40$ ); 4-я – пациентки с тяжелой преэклампсией ( $n=40$ ). Уровень IMA в сыворотке крови определяли, используя тест на связывание альбумином ионов кобальта. Кроме того, рассчитывали IMAR – отношение IMA к концентрации альбумина. АОС сыворотки крови измеряли методом кинетической хемилюминесценции [1].

Обнаружено увеличение уровней IMA и IMAR (в 1,3 и 1,5 раза,  $p<0,001$ ) в сыворотке крови здоровых беременных женщин по сравнению с небеременными. У пациенток с умеренной и тяжелой преэклампсией уровни IMA и IMAR были выше, чем у здоровых небеременных и беременных женщин ( $p<0,001$ ). Тяжелая преэклампсия отличалась от умеренной более высокими значениями IMAR (в 1,3 раза,  $p<0,01$ ). АОС сыворотки крови у женщин обследованных групп повышалась в ряду: здоровые небеременные, здоровые беременные, пациентки с умеренной преэклампсией, пациентки с тяжелой преэклампсией ( $p<0,001$ ). Выявлена положительная взаимосвязь между АОС сыворотки крови и содержанием мочевой кислоты: в 1-й группе  $r=0,450$  ( $p<0,05$ ), во 2-й группе  $r=0,719$  ( $p<0,001$ ), в 3-й группе  $r=0,667$  ( $p<0,001$ ), в 4-й группе  $r=0,477$  ( $p<0,01$ ).

Результаты исследования показывают, что оксидативный стресс при преэклампсии выражен значительно сильнее, чем при нормальной беременности. Повышение

АОС сыворотки крови при преэклампсии коррелирует со степенью тяжести патологического процесса и, по-видимому, обусловлено увеличением содержания в сыворотке крови мочевой кислоты. Это позволяет рекомендовать определение АОС сыворотки крови, наряду с IMA, для выявления преэклампсии и прогнозирования ее течения.

### **Библиографические ссылки**

1. A modified chemiluminescent method for determination of the antioxidant capacity of biological fluids and tissues / Yu. O. Teselkin [et al.] // Biophysics. 2019. Vol. 64. P. 708–716.

## ОКСИД АЗОТА (NO) ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

**В. Ю. Титов, А. Н. Осипов, И. В. Бабенкова, Ю. О. Теселкин, Р. И. Шалина,  
Ю. В. Выхристюк, С. Ю. Лебедева**

*ФГАОУ ВО Российский Национальный Исследовательский Медицинский  
Университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

Преэклампсия (ПЭ) является мультисистемным заболеванием. Она сопровождается артериальной гипертензией и симптомами полиорганной недостаточности [1]. Многие исследователи предполагают, что в патогенезе преэклампсии значительную роль играет оксид азота (NO), поскольку он является медиатором тонуса сосудов [1]. Но конкретного представления о его роли в патогенезе ПЭ до сих пор не существует. Главной причиной, на наш взгляд, является отсутствие возможности оперативного контроля содержания метаболитов NO в живых тканях [2]. И, прежде всего, так называемых соединений – доноров NO, в состав которых включается вновь синтезированный NO: S-нитрозотиолов (RSNO), динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), некоторых высокомолекулярных нитратов [2].

Разработанный нами высокочувствительный и высокоспецифичный ферментный сенсор основан на обратимом ингибировании каталазы нитритом и другими нитрозосоединениями и утрате этой способности под действием ряда веществ, различных для каждой группы нитрозосоединений. Он позволяет проводить оперативный контроль состава метаболитов NO в тканях организма [2].

В связи с этим целью данного исследования является выяснение особенностей метаболизма NO у беременных с диагностированной ПЭ.

Установлено, что плазма беременных, страдающих преэклампсией (ПЭ), содержит в несколько раз большую концентрацию соединений – доноров NO, чем плазма здоровых беременных. Концентрация нитрита и нетиолатных нитрозосоединений у 40% исследованных больных не превышает 100 нМ, как и у всех пациенток с нормальной беременностью. Появление этих соединений, как было показано ранее, есть следствие взаимодействия соединений-доноров NO с АФК. Последние продуцируются активированными лейкоцитами. Следовательно, симптомы ПЭ могут проявляться и в отсутствии воспалительного процесса. Применение гипотензивных средств, не основанных на эффектах NO, в ряде случаев способствовало нормализации артериального давления (АД) у беременных с ПЭ, но не способствовало достоверному снижению концентрации доноров NO в плазме. По-видимому, при ПЭ имеет место недостаточная доступность NO к физиологическим мишеням. Это может быть результатом поражения эндотелия.

Показатель концентрации доноров NO в плазме может быть существенным дополнительным критерием в диагностике ПЭ. Полученные результаты также подтверждают предположение, что спонтанная диссоциация доноров NO с его высвобождением в нормальных физиологических условиях, практически, отсутствует. Высвобождение происходит под воздействием мишени, имеющей сродство к NO [2].

### Библиографические ссылки

1. *Sutton E., Gemmel M., Powers R. Nitric oxide signaling in pregnancy and preeclampsia // Nitric Oxide. 2020. Vol. 95. P. 55–62.*
2. *Titov V. Yu. The enzymatic technologies open new possibilities for studying nitric oxide (NO) metabolism in living systems // Curr. Enzyme Inhibition. 2011. Vol. 7, iss. 1. P. 56–70.*

# КОНЦЕНТРАЦИЯ НИТРО- И НИТРОЗОСОЕДИНЕНИЙ В ПЛАЗМЕ КРОВИ МАТЕРИ – ВАЖНЕЙШИЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ВНУТРИУТРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ И ВОСПАЛЕНИЯ ПЛОДНЫХ ОБОЛОЧЕК

**В. Ю. Титов, А. Н. Осипов, Р. И. Шалина, А. А. Ананкина**

*Российский национальный исследовательский медицинский университет*

*им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия.*

Внутриутробное инфицирование связано с трудностью своевременной диагностики, поскольку протекает, практически, бессимптомно. Классически используемые показатели: содержание С-реактивного белка, СОЭ, показатель числа лейкоцитов зачастую не являются информативными.

Известно, что при взаимодействии супероксида, продуцируемого активированными лейкоцитами, с соединениями-донорами оксида азота (NO) образуется пероксинитрит, который затем превращается в устойчивые конечные продукты [1]. Ферментным сенсором, основанным на обратимом ингибировании каталазы всеми нитрозосоединениями и на потере ингибирующего эффекта под действием ряда факторов, различных для каждой группы соединений, эти продукты определялись как нитрит и нетиолатные нитрозосоединения ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ) [2]. Так как константа скорости взаимодействия супероксида с донорами NO: нитрозотиолами и динитрозильными комплексами железа (ДНКЖ) не менее  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [1], а плазма крови содержит ДНКЖ в концентрации нескольких мкМ [2], всякая активация лейкоцитов приводит к появлению  $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ . Это один из самых чувствительных показателей для ранней диагностики воспаления. Анализ образцов плазмы, полученных от более чем 100 беременных, показал, что плазма здоровых беременных по концентрации нитро- и нитрозосоединений достоверно не отличается от здоровых небеременных. Она содержит 15–20 мкМ ДНКЖ и 40–70 мкМ нитрата. Концентрация ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ) < 0,1 мкМ. Но во всех случаях диагностированного преждевременного разрыва плодных оболочек (ПРПО) регистрировалась повышенная концентрация ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ): от 0,5 до 4,0 мкМ [2]. Антибиотикотерапия приводила к снижению концентрации этих соединений до нормальной. Следовательно, повышение концентрации ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ) есть следствие активации лейкоцитов, вызванной бактериальной инфекцией. В ряде случаев, повышенная концентрация ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ) определялась до того, как развивалась клиническая картина ПРПО. В случаях внутриутробной пневмонии (ВП), диагностированной после родов, также имела место повышенная концентрация ( $\text{NO}_2^- + \text{RNO}$ ). Но все исследованные нами случаи ВП были сопряжены с ПРПО [2].

Таким образом, периодический контроль состава нитро — и нитрозосоединений плазмы видится важным, если не единственно возможным способом диагностировать воспалительные процессы при ПРПО.

## Библиографические ссылки

1. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes / K. Shumaev [et al.] // Nitric Oxide. 2008. Vol. 18. P. 37–46.
2. Возможности диагностики внутриутробного инфицирования по содержанию нитрита и нетиолатных нитрозосоединений в плазме материнской крови / В. Ю. Титов [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. 2022. Т. 67, № 11. С. 633–639.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИЙ A549 И ОКР-GS ИНДУЦИРОВАТЬ ОБРАЗОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК (NETs)

Е. В. Шамова<sup>1</sup>, Т. Г. Дубовская<sup>1</sup>, В. А. Шумский<sup>1</sup>, П. С. Стенникова<sup>2</sup>,  
А. Ю. Кохан<sup>1</sup>, А. Н. Свешникова<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, РФ

Значительную часть опухолевого микроокружения составляют клетки иммунной системы, среди которых наиболее многочисленной группой являются нейтрофилы. Показано повышение уровня нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs) в тканях и периферической крови у пациентов с солидными опухолями. NETs, с одной стороны, маскируют опухолевые клетки от иммунной защиты организма, а с другой стороны, способствуют тромбозам, что приводит к неблагоприятным исходам. Механизмы стимуляции NETs опухолевыми клетками до конца не изучены и во многом зависят от типа опухоли, ее микроокружения и других факторов. В настоящей работе исследована способность опухолевых клеток линий A549 (карцинома легкого) и ОКР-GS (карцинома почки) и их секрета индуцировать образование NETs.

Нейтрофилы выделяли из стабилизированной цитратом венозной донорской крови центрифугированием в двойном градиенте плотности. Нейтрофилы инкубировали с опухолевыми клетками либо их кондиционированной средой в течение 3,0–3,5 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С. Образование NETs детектировали посредством флуоресцентной микроскопии и анализа интенсивности флуоресценции на планшетном ридере с применением флуоресцентного зонда на ДНК SytoxGreen и флуоресцентно-меченного антитела против миелопероксидазы (МПО). В качестве положительного контроля для стимулирования NETs использовали РМА (200 нМ) и иономицин (1 мкМ).

Установлено, что через 3,0–3,5 часа инкубации нейтрофилов с опухолевыми клетками ОКР-GS наблюдалось достоверное увеличение интенсивности флуоресценции SytoxGreen на  $51,7 \pm 10,9\%$  относительно контроля (в отсутствии дополнительного стимула). Данный эффект был сравним с РМА-индуцированным нетозом ( $54,6 \pm 17,1\%$ ), однако значительно слабее влияния иономицина ( $146 \pm 31,6\%$ ). С помощью флуоресцентной микроскопии показано, что нейтрофилы, инкубированные с опухолевыми клетками ОКР-GS образуют тяжи внеклеточного ДНК, что подтверждается колоколизацией флуоресцентных сигналов на SytoxGreen и анти-МПО. При инкубации нейтрофилов с кондиционированной опухолевыми клетками средой (секретом опухолевых клеток) обнаружено, что секрет ОКР-GS достоверно ингибировал образование NETs на  $23,6 \pm 14,4\%$ . Анализ экспериментальных данных по влиянию опухолевых клеток A549 и их секрета не выявил достоверных различий. Полученные данные позволяют предположить существование нескольких механизмов регуляции функциональной активности нейтрофилов опухолевыми клетками ОКР-GS: индукция нетоза вероятно осуществляется при непосредственном взаимо-

действии клеток ОКР-GS и нейтрофилов, в то время как в секрете ОКР-GS содержатся биологически активные молекулы, негативно воздействующие на данный процесс.

Таким образом, в настоящей работе показано, что опухолевые клетки линии ОКР-GS при их инкубации с нейтрофилами индуцируют NETs, при этом секрет ОКР-GS, напротив, оказывает ингибирующее действие на данный процесс. Полученные данные свидетельствуют о существовании различных механизмов индукции и регуляции NETs.

Финансовая поддержка: грант №Б23РНФ-162; РНФ23-45-10039.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МНОГОКРАТНОГО ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

**Т. В. Шарабарина, Ю. И. Сливина, Е. С. Ефимова, Е. С. Тучина**

*СГУ им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия*

Развитие антимикробной фотодинамической терапии (АФДТ) как перспективного метода лечения инфекционных заболеваний привело к всестороннему изучению внутриклеточных реакций микроорганизмов в ответ на воздействие [1]. При этом, некоторыми авторами показано, что бактерии способны приобретать толерантность к действию АФДТ после 10–15 цикла облучения [2].

Цель настоящего исследования – изучение эффекта усиления фотодинамического воздействия фиолетового (405 нм) светодиодного излучения на клетки двух штаммов (антибиотико-чувствительного (AS) и антибиотико-резистентного (AR) *Staphylococcus aureus* при многократном повторении.

В качестве тест-культуры для проведения исследований использовали клинические штаммы *S. aureus*. В качестве источника излучения служил светодиод с максимумом спектра испускания  $\lambda=405\pm 15$  нм, плотностью мощности 80 мВт/см<sup>2</sup>. Одним (1) циклом облучения считали однократное облучение взвеси бактерий в течение 15 мин. Контрольные (не облученные) и облученные бактериальные взвеси высевали на поверхность ГРМ-агара. Через 24 ч подсчитывали число выросших колоний (КОЕ). На 0 (контроль), 10, и 20 цикле облучения оценивали резистентность культуры к действию пероксида водорода путем определения минимальной ингибирующей концентрации.

Показано, что происходит снижение численности обоих исследуемых штаммов *S. aureus* при повторяющемся облучении. С 1 по 5 цикл отмечено снижение числа КОЕ штамма *S. aureus* AS на 15–18%, с 5 по 10 цикл снижение числа клеток приобретало более выраженный характер – на 18–33%, затем, с 10 по 15 цикл установлено восстановление численности (снижение КОЕ относительно контроля на 28%), с 15 по 20 цикл значения выживаемости после облучения сохранялся на том же уровне (снижение КОЕ относительно контроля на 20%). Для штамма *S. aureus* AR установлено, что с 1 по 5 цикл снижение числа КОЕ происходит на 13–20%, с 5 по 10 цикл – на 20–36%, с 10 по 20 цикл так же показана стабилизация снижения численности (снижение КОЕ относительно контроля на 25%). Поскольку под действием излучения в ходе фотореакций I типа в клетках образуется пероксид водорода, была проведена оценка способности бактериальных клеток адаптироваться к данному соединению как фактору окислительного стресса. Наибольшей устойчивостью на 10 и 20 циклах облучения обладал *S. aureus* AS, МИК H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> для которого составляла 176 и 264 мкМ соответственно. Штамм *S. aureus* AR был в 1,5 раза менее устойчив к действию пероксида водорода после 10 и 20 циклов облучения, МИК H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> для него составляла 88 и 176 мкМ соответственно.

По результатам исследования можно сделать вывод, что антибиотико-устойчивый штамм *S. aureus* был более восприимчив к повреждающему действию АФДТ при 20-кратном повторении по сравнению с антибиотико-чувствительным штаммом.

### **Библиографические ссылки**

1. Photodynamic and antibiotic therapy in combination against bacterial infections: efficacy, determinants, mechanisms, and future perspectives / Y. Feng [et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021. Vol. 177. P. 113941.

2. Development of antimicrobial phototreatment tolerance: why the methodology matters / A. Rapacka-Zdonczyk [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* 2021. Vol. 22. P. 2224–2248.

## АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ТРАДИЦИОННОЙ КИТАЙСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Ч. Янг<sup>1</sup>, Г. Лю<sup>1</sup>, Х. Чжунжуй<sup>1</sup>, Е. Ю. Паршина<sup>1,2</sup>, А. А. Байжуманов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Университет МГУ–ППИ, Шэньчжэнь, Китай

<sup>2</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В норме активные формы кислорода (АФК) являются продуктами клеточного окислительного метаболизма и играют важную роль в жизнедеятельности клеток, процессах клеточной гибели, дифференциации, передаче сигналов клеток и выработке факторов, связанных с воспалением. Однако при гиперпродукции АФК развивается окислительный стресс, который считается причиной многих заболеваний. Влияя на содержание АФК можно подавлять развитие воспалительных процессов, а также успешно лечить онкологические заболевания или заболевания сердечно-сосудистой системы (1).

В данной работе исследовали антиоксидантные свойства водных и спиртовых экстрактов *Erycibe obtusifolia* Benth (ЕО), *Canavalia gladiata* (Jacq.) DC, *Bolbostemma paniculatum* (Maxim.) Franquet и *Sargentodoxa cuneata* (Oliv.) Rehd et Wils, которые традиционно используются в традиционной китайской медицине.

Антиоксидантную активность экстрактов оценивали методами FRAP и DPPH (2), количество полифенолов определяли методом Фолина-Чокальтеу. Для выявления основных компонентов экстрактов использовалась УФ- и ИК-Фурье-спектроскопии, спектроскопия комбинационного рассеяния.

Антиоксидантная активность исследованных образцов существенно различалась. Экстракты ЕО продемонстрировали более высокую антиоксидантную активность, чем другие образцы. Количество полифенолов в спиртовом экстракте ЕО также было выше, чем в остальных экстрактах.

Анализ УФ-спектров показал, что во всех экстрактах наблюдались характерные пики в области 270–280 нм, характерных для фенольных соединений. Интенсивные перекрывающиеся полосы в инфракрасной области 850–1250 см<sup>-1</sup> и пики в области комбинационного рассеяния света 1460–1330 см<sup>-1</sup> в первую очередь обусловлены колебаниями полисахаридов. Отчетливые полосы фенольных соединений при 1605 см<sup>-1</sup> в инфракрасном спектре и 1600–1520 см<sup>-1</sup> в спектре комбинационного рассеяния света, соответствующие колебаниям ароматического кольца (C=C или C–C в сочетании с C=C), подтверждают наличие фенольных соединений во всех экстрактах, при этом наиболее интенсивным этот пик был в экстракте ЕО.

Таким образом, можно предположить, что терапевтический эффект экстракта ЕО обусловлен его антиоксидантным действием и связан с высоким содержанием полифенолов.

### 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. P. 363–383.
2. Антиоксидантная активность некоторых водных экстрактов, применяемых в традиционной китайской медицине / А. А. Байжуманов [и др.] // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2022. Т. 77, № 1. С. 16–21.

**КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ, КЛЕТОЧНЫЕ  
ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ**

## **ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ НЕЙЛОНОВЫХ НАНОВОЛОКОН НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И РОСТ ШВАННОВСКИХ КЛЕТОК**

**О. Ю. Антонова, О. Ю. Кочеткова, И. Л. Канев**

*ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Пущино,  
Россия*

Протяженные повреждения периферических нервов верхних и нижних конечностей оказывают значительное влияние на качество жизни и часто приводят к полной или частичной нетрудоспособности пациента. Для лечения таких травм в качестве альтернативы аутотрансплантации участка нерва набирают популярность искусственные нервные кондуиты (ИНК). Известно, что топология внеклеточного матрикса влияет на поведение и рост клеток нервной ткани. Ориентированные пучки аксонов с направленными структурами играют ключевую роль в передаче нервных импульсов. Следовательно, введение в структуру ИНК биомиметических компонентов на основе ориентированных искусственных микроволокон может оказывать влияние на поляризацию Шванновских клеток (ШК) и ремиелинизацию аксонов и дополнительно повысить регенерационный потенциал нейроимплантата. Перспективным способом получения волокнистых материалов для данной цели служит электроспиннинг [1]. Ранее нами показано, что материал из ультратонких нейлоновых волокон (средний диаметр 100 нм) эффективно направляет и ускоряет рост отростков нейронов гиппокампа [2].

Целью данной работы было исследование влияние ультраструктуры материала из ориентированных ультратонких нейлоновых волокон на морфологию и пролиферацию ШК. Были изготовлены три типа подложек, состоящих из нановолокон со средним диаметром 60 нм, субмикронных волокон со средним диаметром 200 нм и композитного материала, состоящего из слоев ультратонких и субмикронных волокон. При анализе ультраструктуры полученных материалов подтверждена высокая степень ориентированности волокон: ширина пика углового распределения не превышает 10 градусов. Был исследован рост ШК, выделенных из седалищного нерва взрослой крысы при культивировании на разных подложках. Показано, что диаметр волокон материала не влияет на жизнеспособность клеток при длительном культивировании, которая остается на высоком уровне (>97%), что говорит о биосовместимости изготовленных материалов. При этом плотность клеток более чем в 2 раза увеличивается на волокнистых подложках по сравнению с контролем (стекло, покрытое поли-L-лизинем и ламинином). Анализируя направленность актиновых стрессовых волокон можно заключить, что все испытанные материалы и, в особенности, композитный тип подложек способны реорганизовать цитоскелет ШК и инициировать поляризацию клетки, т.е. определяют морфологию клеток. Также наблюдалось значительное удлинение отростков ШК вдоль волокон, что в целом приводило к формированию тканеинженерных конструкций, имитирующих полосы (ленты) Бюнгнера. Полученные данные демонстрируют, что структура композитного волокнистого материала способствует направленному росту и активной пролиферации ШК и перспективна для использования в составе ИНК.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00519.

### Библиографические ссылки

1. Regulation of nerve cells using conductive nanofibrous scaffolds for controlled release of *Lycium barbarum* polysaccharides and nerve growth factor / J. Wang [et. al.] // Regen Biomater. 2023. Vol. 20. P. 10:rbad038.
2. Antonova O. Y., Kochetkova O. Y., Shlyapnikov Y. M. ECM-mimetic nylon nanofiber scaffolds for neurite growth guidance // Nanomaterials. 2021. Vol. 11, iss. 2. P. 516.

## ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОСТИ КРИОХРАНЕНИЯ И СОСТАВА КРИОСРЕДЫ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЭКСПАНСИРОВАННЫХ ЕК КЛЕТОК

Е. П. Вашкевич, Е. А. Ласюков, Т. В. Шман

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Боровляны, Беларусь

Использование в терапевтических целях криоконсервированных естественных киллерных (ЕК) клеток имеет ряд преимуществ: возможность проведения многократных инфузий клеток, полученных в одной серии, однородное качество клеточного продукта для всех доз. Для хранения ЕК клеток используют замораживающие среды, содержащие диметилсульфоксид (ДМСО) в качестве криопротектора и эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС)/альбумин или АВ-сыворотку человека [1]. Важным показателем качества ЕК клеток после процедуры размораживания является сохранение их функциональной активности.

Целью данной работы был анализ влияния длительности криохранения на цитотоксическую активность (ЦТА) экспансированных *in vitro* ЕК клеток при использовании различных составов сред для криоконсервирования.

Материалы и методы. ЕК клетки получали путем культивирования мононуклеарных клеток периферической крови 6 доноров в присутствии интерлейкина (ИЛ)-2 и облученных фидерных клеток К-562-4-1BVL+мИЛ-21 в полной питательной среде в течение 14–17 сут. После проводили криоконсервирование полученных клеток автоматизированным способом с использованием 4 типов замораживающих сред, содержащих 20% ЭТС, 10% ДМСО в среде RPMI-1640 (№1), 2,5% человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), 10% ДМСО в 0,9% растворе натрия хлорида (№2), 40% ЭТС, 10% ДМСО в солевом растворе «Квинтасоль» (№3), 4,5% ЧСА, 5% ДМСО в 10% растворе «Реополиглюкина» (№4). Образцы хранили в парах жидкого азота в течение 1 и 6 мес. До и после криоконсервирования оценивали прямую ЦТА ЕК клеток против нативной линии К-562 методом проточной цитометрии. Соотношение эффектор:мишень составило 1:1, 5:1, 10:1. Все результаты представлены в виде медианы. Для оценки достоверности различий в группах ( $p < 0,05$ ) использовали непараметрические статистические критерии.

Результаты. В ходе проведения исследования выявлено, что ЦТА ЕК клеток достоверно не отличалась в зависимости от длительности криохранения, что справедливо для всех тестируемых замораживающих сред. Также ЦТА ЕК клеток после размораживания не зависела от типа используемой среды для криоконсервирования и составила от 8,1% до 13,6% при соотношении эффектор:мишень 1:1, от 43,3% до 70,7% при соотношении эффектор:мишень 5:1, от 62,4% до 87,6% при соотношении эффектор:мишень 10:1. Однако ЦТА была достоверно снижена ( $p < 0,05$ ) после криохранения как в течение 1, так и 6 мес., по сравнению с показателями ЦТА до замораживания, которые составили 33,3%, 90,5%, 92,3% при соотношении эффектор:мишень 1:1, 5:1 и 10:1, соответственно.

Заключение. Согласно полученным результатам, проведение процедуры криоконсервирования достоверно снижает ЦТА экспансированных ЕК клеток для всех исследованных замораживающих сред. ЦТА ЕК клеток не отличается при краткосрочном (1 мес.) и более длительном (6 мес.) хранении независимо от типа используемой среды для криоконсервирования.

### **Библиографические ссылки**

1. *Lee D. A.* Cellular therapy: adoptive immunotherapy with expanded natural killer cells // *Immunological Reviews*. 2019. Vol. 290, iss. 1. P. 85–99.

## АНАЛИЗ ИЗОБРАЖЕНИЙ КЛЕТОК ГЛИОМЫ С6 В КАМЕРЕ ГОРЯЕВА С ПРИМЕНЕНИЕМ НЕЙРОСЕТЕВЫХ МЕТОДОВ

**А. В. Волков<sup>1,2</sup>, А. А. Денисов<sup>1,2</sup>**

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

<sup>2</sup>*ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь*

Современные исследования в области клеточных технологий характеризуются интенсивно возрастающим уровнем автоматизации выполнения работ и проведения диагностических операций. Для подсчета количества клеток в суспензии используются различные автоматизированные цитометры. В то же время, для этого часто применяются и классические подходы, например, с применением камеры Горяева, благодаря их широкой распространенности и простым методикам работы. Использование камеры Горяева, однако, основано на ручном подсчете клеток и является трудоемкой процедурой, требующей концентрации внимания и сопряженной с ошибками при больших объемах работ. Вместе с тем, в настоящее время интенсивно развиваются методы нейросетевой обработки изображений, которые успешно применяются, в том числе, для распознавания различных биологических объектов. Целью данной работы была разработка методики детекции и подсчета клеток в камере Горяева с применением нейросетевых методов глубокого обучения.

Эксперименты проводили с клетками глиомы крысы С6. Для распознавания клеток на изображениях использовали нейросетевую модель на основе архитектуры U-Net с прогнозированием вертикальных и горизонтальных градиентов объектов. Использовали два базовых набора весов, полученных при обучении на наборах изображений ядер клеток (Nuclei) и дрожжевой суспензии (Yeast), а также наборы весов, полученные в результате дообучения после ручной сегментации изображений клеток С6 в камере Горяева при использовании объективов с увеличением 4x и 10x. В качестве мер эффективности распознавания использовали: точность P как отношение числа истинно-положительных результатов к сумме числа истинно-положительных и ложно-положительных результатов; полноту R как отношение числа истинно-положительных результатов к сумме числа истинно-положительных и ложно-отрицательных результатов; F как гармоническое среднее между точностью и полнотой.

Для проведения анализа разработано программное приложение, визуализирующее видеопоток цифровой камеры с возможностью получения фотографий и распознавания клеток в камере Горяева. При распознавании изображений при увеличении 4x с базовым набором весов Nuclei получены следующие значения метрик: P=0.846, R=0.434, F=0.571, для базового набора весов Yeast: P=0.997, R=0.348, F=0.514. После дообучения набора весов Nuclei получены следующие значения метрик для увеличения 4x: P=0.998, R=0.941, F=0.968, для набора весов Yeast: P=0.997, R=0.839, F=0.911. Для изображений с увеличением 10x с использованием дообученного набора Nuclei получены значения метрик: P=0.998, R=0.996, F=0.996. Так же для увеличения 10x проведен эксперимент по распознаванию расфокусированных изображений и получены значения метрик: P=0.991, R=0.971, F=0.981.

Таким образом, достигнута высокая эффективность распознавания клеток как для изображений с увеличением 10x, так и для менее детализированных изображений с увеличением 4x. Использование увеличения 4x позволяет сразу получать изображения практически всего поля камеры Горяева, и, таким образом, повысить производительность экспериментальной работы. Использование расфокусированных изображений не привело к существенному снижению качества распознавания, что свидетельствует об устойчивости применяемого метода по отношению к ошибкам оператора при получении изображений.

# АНАЛИТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНОГО КАНАЛА Kv1.2 И HgTx-L3-GFP ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕПТИДНЫХ БЛОКАТОРОВ

**А. А. Игнатова<sup>1</sup>, О. В. Некрасова<sup>1</sup>, А. В. Феофанов<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

Применение аффинных и высокоселективных пептидных блокаторов как ингибиторов активности калиевых потенциал-зависимых Kv1-каналов является перспективным подходом к изучению функционирования Kv1-каналов, а также разработке эффективных способов терапевтического воздействия на их активность. Использование высокочувствительных флуоресцентных методов для скрининга и изучения аффинности пептидных блокаторов Kv1-каналов является привлекательной альтернативой традиционным методам анализа (электрофизиологии, радиолигандному анализу).

В данной работе мы докладываем о создании аналитической системы с использованием клеток Neuro2a, экспрессирующих в мембране флуоресцентно-меченый канал Kv1.2 (Neuro2a/Kv1.2), и генетически кодируемого флуоресцентного пептидного блокатора хонготоксина 1 (HgTx-L3-GFP) и о результатах апробации этой системы для исследования аффинности пептидных блокаторов.

Исследование взаимодействий HgTx-L3-GFP с каналом Kv1.2 на мембране клеток Neuro2a показало, что он образует комплексы с каналами в наномолярном диапазоне концентраций, вытесняется из комплексов конкурирующими немечеными пептидными блокаторами канала Kv1.2 и не проявляет неспецифического связывания с иными компонентами мембраны клеток при исследованных концентрациях. По методике, разработанной нами ранее [1], была определена константа диссоциации комплекса  $K_d=0,11\pm 0,05$  нМ.

Используя аналитическую систему на основе Neuro2a/Kv1.2, методом конкурентного ингибирования связывания были измерены константы диссоциации  $K_i$  комплексов канала Kv1.2 с немечеными пептидными блокаторами, представителями различных семейств токсинов из яда скорпионов: харибдотоксином (ChTx,  $K_i=1,03$  нМ) агитоксином 2 (AgTx2,  $K_i=21,5$  нМ), хонготоксином 1 (HgTx1,  $K_i=20$  пМ) и маргатоксином (MgTx,  $K_i=14$  пМ). Активность ChTx, AgTx2 и HgTx1 впервые измерена на каналах Kv1.2 человека, и она значительно отличается от опубликованных данных, измеренных на каналах Kv1.2 крысы. Активность MgTx, измеренная нами, подтверждает результат, опубликованный ранее для каналов человека.

Таким образом, разработанная нами аналитическая система на основе клеток Neuro2a, экспрессирующих канал mKate2-Kv1.2, и HgTx-L3-GFP, позволяет проводить скрининг пептидных блокаторов Kv1.2 по способности связываться с внеклеточной областью порового домена канала и анализировать аффинность этих пептидов к каналу методом конфокальной флуоресцентной микроскопии.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00406.

## Библиографические ссылки

1. Combining mKate2-Kv1.3 channel and Atto488-hongotoxin for the studies of peptide pore blockers on living eukaryotic cells / N. A. Orlov [et al.] // *Toxins*. 2022. Vol. 14. P. 858.

## МИНИМАЛЬНО МАНИПУЛИРОВАННЫЕ В НЕЙРОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА

А. Г. Ионова, С. М. Космачёва, Н. В. Гончарова, М. П. Потапнев

*РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Республика Беларусь*

Пуповинный канатик является одним из наиболее перспективных источников мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека, поскольку его получение неинвазивно, а клетки из этого источника превосходят другие виды стволовых клеток по дифференцировке, миграции и защитным свойствам [1]. Известно, что МСК пуповины эффективно индуцируются в нейрогенном направлении *in vitro* при определенных методах индукции [2]. Предварительная стимуляция МСК *in vitro* может повысить их клиническую эффективность для пациентов с заболеваниями нервной системы.

Цель исследования – изучить обратимость индукции МСК пуповины человека в нейрогенном направлении *in vitro*.

МСК, выделенные из ткани пуповины новорожденных после кесарева сечения, индуцировали в нейрогенном направлении в среде KnockOut DMEM с добавкой StemPro Neural Supplement с применением ростовых факторов FGFb и EGF в течение 48 ч. В процессе дифференцировки МСК пуповины менялась их морфология и пространственное расположение – клетки становились умеренно вытянутыми, округлыми, треугольными и располагались в виде среднеячеистой сети. Увеличивалась экспрессия нейрональных маркеров – синтез мРНК генов: нестина (NES) в 4,6 раз, нейронспецифической енолазы (NSE) в 4,9 раза, холинацетилтрансферазы (CHAT) в 4,2 раза, белка, ассоциированного с микротрубочками (MAP) в 1,7 раз. Затем клетки переводили на полную питательную среду альфа-МЕМ без ростовых факторов (ППС). Через 6 ч после перевода клеток на ППС снижалась экспрессия мРНК генов: NES – в 3,8 раза, NSE – в 4,1 раза, CHAT – в 6,6 раз, MAP-2 – в 1,8 раз по сравнению с нейроиндуцированными клетками. Через 24 ч нахождения в ППС клетки возвращали исходную фибробластоподобную морфологию, экспрессия нейрональных маркеров продолжала снижаться (MAP-2) или достоверно не отличалась от значений после 6-часовой экспозиции в ППС.

Экспрессия поверхностных маркеров (CD90, CD105, CD34 и CD45) не менялась в течение нейрогенной дифференцировки МСК и при последующем переводе их на ППС через 6 и 24 ч.

Таким образом, нейроиндуцированные МСК пуповины человека изменяют свои свойства при отсутствии дифференцировочных факторов – снижается экспрессия нейрональных маркеров, восстанавливается морфология клеток. Процесс нейроиндукции МСК *in vitro* является обратимым, что расширяет возможности клеточной терапии на основе МСК при лечении заболеваний нервной системы.

### Библиографические ссылки

1. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in neurodegenerative disorders: from literature to clinical practice / S. Reyhani [et al.] // Regen. Med. 2020. Vol. 15, iss. 4. P. 1561–1578.
2. Plasticity of human mesenchymal stem cell phenotype and expression profile under neurogenic conditions / A. V. Shakhbazau [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2009. Vol. 147, iss. 4. P. 513–516.

## СРАВНЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПОРФТ/PRP В ОТНОШЕНИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫСЫ

О. В. Клименкова<sup>1</sup>, М. П. Потапнев<sup>1</sup>, О. А. Куделич<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГУ «РНПЦ трансфизиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Беларусь

<sup>2</sup>УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

**Введение.** Использование биопродуктов клеточного происхождения в медицине постоянно расширяется. За последние 20 лет одним из них стала плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ, аналог PRP – platelet-rich plasma). ПОРФТ/PRP хорошо известна как биопродукт с выраженным регенеративным действием. Уникальность ПОРФТ/PRP (в отличие от рекомбинантных ростовых факторов) определяется воздействием высококонцентрированного естественного комплекса ростовых факторов и других биологических медиаторов, регулирующих клеточные реакции (пролиферацию, хемотаксиса, миграции, дифференцировки и др.), направленных на регуляцию и стимуляцию процессов естественной регенерации [1, 2].

Цель настоящего исследования заключалась в сравнительной оценке влияния ПОРФТ/PRP на пролиферацию в культуре мезенхимальных стромальных клеток (МСК) или лимфоцитов селезенки крысы *in vitro*.

**Материалы и методы.** Получение ПОРФТ/PRP проводили модифицированным методом Yamaguchi R. с соавторами [3]. МСК получали из фракции мононуклеарных клеток (МНК) костного мозга бедренной кости крыс породы Wistar методом адгезии на пластике. Для экспериментов использовали МСК костного мозга 2 пассажа. Лимфоциты получали путем гомогенизации селезенки здоровых крыс с дальнейшим выделением мононуклеарных клеток на градиенте плотности 1,077 г/см<sup>3</sup>. МСК и лимфоциты селезенки культивировали в 12-луночных планшетах в течение 72 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при +37 °С и 5% CO<sub>2</sub> в присутствии ПОРФТ/PRP в концентрации 0,625%, 1,25% или 2,5% в полной питательной среде DMEM/F12 с 10% эмбриональной бычьей сывороткой. В лунки исходно высевали 9 тыс. МСК/мл или 1 млн. лимфоцитов/мл.

**Результаты и обсуждение.** В качестве контроля рассматривались культуры клеток МСК и лимфоцитов, культивируемые без добавления ПОРФТ/PRP. Для оценки влияния условий культивирования на пролиферацию МСК или лимфоциты культивировали в присутствии ПОРФТ/PRP в течение 3 суток, затем оценивали изменение их количества. В проведенных экспериментах (n=4) нами показано, что ПОРФТ/PRP обладал рост-стимулирующим действием в отношении МСК, но не лимфоидных клеток крыс. При этом более высокий прирост клеток отмечен при культивировании МСК в среде с добавлением ПОРФТ/PR в концентрации 1,25% (коэффициент прироста – 1,5, p=0,025).

**Вывод.** Сравнительные эксперименты показали, что крысиная ПОРФТ/PRP в концентрации 1,25% обладает рост-стимулирующим действием в отношении МСК, но не лимфоцитов, культивированных *in vitro*.

### Библіографічні посилання

1. Ріст-стимулююча активність препаратів тромбоцитів в відношенні мезенхімальних стоволових кліток *in vitro* / С. І. Ігнатенко [і др.] // Весці/Ізвестія НАНБ. 2016. № 1. С. 52–58.
2. *In vitro* evidence supporting applications of platelet derivatives in regenerative medicine / I. Giusti [et al.] // Blood Transfus. 2020. Vol. 18, iss. 2. P. 117–129.
3. Effects of platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor / R. Yamaguchi [et al.] // Gastrointestina. 2012. Vol. 173, iss. 2. P. 258–266.

## ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ТЕРМОПРАЙМИРОВАННЫХ АСЕПТИЧЕСКИХ ПРОРОСТКОВ *A. THALIANA* И *L. ERINUS* L.

А. С. Козячая, Е. Н. Крытынская

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Тепловой стресс серьезно на рост и развитие растений, ведет к термоморфогенным изменениям в архитектуре, ставя под угрозу качество экосистем и мировую продовольственную безопасность [1]. Считается, что стресс-реакция на гипертермию и, следовательно, термотолерантность различаются у растений, подвергнутых и не подвергнутых термопраймингу [2]. Термопрайминг индуцирует дифференциальную экспрессию генов по всему геному и альтернативные паттерны сплайсинга, создает «память сплайсинга», которая помогает *Arabidopsis thaliana* L. пережить последующий сильный тепловой стресс. Процесс прайминга модифицирует фенотипическое состояние организма и память о сплайсинге, индуцированная праймингом, может представлять собой общую особенность реакций на тепловой стресс у растений [3].

Мы решили это проверить в условиях *in vitro*, провести фенотипирование двух культур. Культура тканей – незаменимый инструмент биоинженерии растений. На двух культурах инициировали прайминг с несмертельным тепловым стрессом, подвергая 1–7-суточные асептические проростки *Arabidopsis thaliana* L. (WS-0) и *Lobelia erinus* L. (сорта Красный каскад) постепенному повышению температуры от 24 до 28 °C в течение 6 ч и от 28 до 38 °C той же продолжительности. Провели несколько фенотипических анализов, изучая ростовые реакции праймированных проростков (в период прорастания и раннего развития проростков) на умеренный (28±2 °C) и сильный (38±2 °C) тепловой стресс. Фенотипы анализировали систематически, используя две определяющие переменные теплового шока: температуру и время воздействия.

Установили, что умеренный тепловой стресс (28±2 °C) стимулирует рост корней праймированных асептических проростков двух видов в разной степени. Фенотипическая реакция при температуре 28±2 °C качественно подобна регистрируемой в условиях нормотермии: вплоть до 4 сут. длина корней проростков *L. erinus* уступала длине корней *A. thaliana*. На 5-е экспериментальные сут. в отношении двух видов разницы установлено не было, к 7 сут. корни асептических проростков *L. erinus* демонстрировали прирост. Роль ауксина в индуцированном гипертермией росте по-прежнему не подтверждена [4]. Температура вызывала отсроченное на сутки прорастание семян *L. erinus*.

Гипертермия (38±2 °C) в течение 4 сут. приводила к потере жизнеспособности асептических проростков *A. thaliana*, применение термопрайма на семенах не дало положительного эффекта. Для *L. erinus* отмечали низкие скорость прорастания корней, способность к прорастанию, и морфологические показатели роста растений. Проростки оставались жизнеспособными к 7 экспериментальным сут. Предварительная обработка имела преимущества с точки зрения всхожести семян *L. erinus*.

### Библиографические ссылки

1. *Bita C., Gerats T.* Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops // *Front. Plant Sci.* 2013. Vol. 4. P. 1–18.
2. Thermopriming triggers splicing memory in *Arabidopsis* / Y. Ling [et al.] // *J. of Experimental Botany.* 2018. Vol. 69. P. 2659–2675.
3. Phenotypic analysis of the *Arabidopsis* heat stress response during germination and early seedling development / J. Silva-Correia [et al.] // *Plant Methods.* 2014. Vol. 10, iss. 7. P. 179–205.
4. *Edelmann H. G.* Plant root development: is the classical theory for auxin-regulated root growth false? // *Protoplasma.* 2022. Vol. 259, iss. 3. P. 823–832.

## ВЫБОР НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНЫХ АНТИ-В7-Н3 ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Д. В. Луцкович, А. Н. Мелешко

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

**Введение.** Нейробластома – редкое онкологическое заболевание, которое поражает преимущественно младенцев и детей раннего возраста. Традиционные методы лечения, такие как химиотерапия и лучевая терапия, показали ограниченный успех в лечении нейробластомы высокой группы риска. Новый подход клеточной иммунотерапии, известный как терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR) открывает новые возможности терапии лейкозов и солидных опухолей. Одним из наиболее изученных мишеней для CAR-T терапии солидных опухолей является белок CD276 (B7-H3).

**Цель.** Получение двух вариантов анти-B7-H3 CAR-T клеток функционально активных в отношении нейробластомы человека.

**Материалы и методы исследования.** Синтетические последовательности ДНК рецептора (Synbio, Китай) были клонированы в лентивирусный вектор pWPXL методом рестрикции и лигирования. Получение лентивирусных частиц проведено путем ко-трансфекции клеток HEK293T. Выделение Т-клеток производили коммерческим набором EasySep (ThermoFisher) из периферической крови донора путем отрицательной селекции. Активацию Т-клеток производили частицами CD3/CD28 Dynabeads (ThermoFisher). Трансдукцию активированных Т-клеток производили при помощи RetroNectin (TakaraClontech, США) с множественностью инфекции 10. Т-клетки культивировали в среде RPMI с L-глутамином с добавлением 10% эмбриональной телячьей сывороткой и 300U ИЛ-2. Для постановки функционального (цитотоксического) теста (ЦТТ) использовали B7-H3 положительные клетки-мишени нейробластомы человека – SK-N-BE(2) и две остеосаркомы человека – KHOS и 143В окрашенные CellTrace™ для отделения мишеней от эффекторов, с добавлением витального красителя 7AAD для окраски мертвых клеток. ЦТТ анализировался в трех соотношениях 2:1, 1:1 и 1:2 эффектор:мишень. Отрицательным контролем выступали не трансдуцированные Т-лимфоциты (МОСК). Цитотоксическая активность рассчитывалась как разница клеток в тесте с CAR и МОСК контролем.

**Результаты.** Было получено два варианта CAR-T второго поколения с одним антигенсвязывающим антительным доменом (8H9) к мишени B7-H3, первый вариант с дополнительными вставочными доменами иммуноглобулина CH2-CH3 (8H9L), второй без (8H9S). Функциональный титр лентивирусных частиц составил: для 8H9L –  $7 \times 10^7$ , для 8H9S –  $7,2 \times 10^7$  на мл. Популяционный состав исходного Т-клеточного продукта составил: Tnaive+Tscm – 33,5%, Tcm – 59,7%, Tem+TeffRA – 6,7%. Соотношения CD4 и CD8 50%. Эффективность трансдукции составила: 8H9L – 30,7%, 8H9S – 35,5%. Эффективность цитотоксического теста против клеток SK-N-BE(2) составила: для рецептора 8H9L – 2,1%, 2,6% и 21% при соотношениях 2:1, 1:1 и 1:2, соответственно. С рецептором 8H9S – 55,1%, 55,9% и 57,2%. Эффективность цитотоксического теста против клеток KHOS составила: для рецептора 8H9L – 11,1%, 13,2% и 9% при соотношениях 2:1, 1:1 и 1:2, соответственно. С рецептором 8H9S – 33,7%, 38,1% и 30,5%. Эффективность цитотоксического теста против клеток 143В составила: для рецептора 8H9L – 24%, 32,4% и 26,5% при соотношениях 2:1, 1:1 и 1:2, соответственно. С рецептором 8H9S – 50%, 47,9% и 46,3%.

**Заключение.** Наиболее высокой цитотоксической активностью обладает вариант анти-B7-H3 CAR-T клеток без дополнительных вставочных доменов против B7-H3+ клеточных линий. Различия в эффективности на разных клеточных линиях объясняется плотностью антигена.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛИЯНИЯ МСК ПУПОВИНЫ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРИ 35 °С, НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ Т-ЛИМФОЦИТОВ

В. И. Малахов, А. В. Максимович, Н. В. Гончарова

*РНПЦ трансфизиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь*

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) с 1995 года являются основой клеточной терапии многих аутоиммунных и воспалительно-дегенеративных заболеваний человека. МСК оказывают паракринное действие, моделируя функционирование других типов клеток, например, клеток иммунной системы.

**Цель исследования:** изучить влияние МСК пуповины, культивируемых при 35 °С, на Т-лимфоциты периферической крови человека.

**Материалы и методы.** В первой исследуемой группе МСК пуповины человека культивировали при стандартных условиях в питательной среде (ПС)  $\alpha$ -МЕМ с 10% АВ(IV) сывороткой человека, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при влажности 95% и температуре 37 °С до достижения конfluenceности 80%. Второй исследуемой группой были МСК, культивированные в условиях пониженной температуры (35 °С). Мононуклеары выделяли из периферической крови здоровых доноров по стандартной методике на градиенте плотности Lymphocyte Separation Medium, 1,077 г/мл, LTSM100. Стимуляцию Т-лимфоцитов производили внесением ФГА в концентрации 1 мкг/мл и сокультивированием с исследуемыми группами МСК в течение 72 ч при температуре 37 °С. Пролиферативную активность CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов оценивали по включению флуоресцентной метки CFSE, концентрация в рабочем растворе – 5 мкМ.

Аналитическая цитометрия проводилась на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II, программное обеспечение FACSDiva v. 7.0. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного пакета STATISTICA 10.

**Результаты и их обсуждение.** Оценивали пролиферацию Т-лимфоцитов, индуцированную ФГА, при сокультивировании с МСК двух групп. Для первой группы, количество пролиферирующих Т-лимфоцитов (CFSE-положительных) составило 24,56±5,65% (n=5). Для второй группы количество пролиферирующих Т-лимфоцитов составило 21,62±13,50% (n=5).

Для контрольной группы Т-лимфоцитов, культивировавшихся в отсутствие МСК, количество пролиферирующих клеток, составило 64,46±25,56% (n=5).

Были выявлены статистически значимые различия между пролиферацией Т-лимфоцитов в обеих исследуемых группах по сравнению с контрольной группой Т-лимфоцитов. Для первой группы наблюдалось статистически значимое (p=0,011) снижение количества пролиферирующих Т-лимфоцитов относительно контроля. Для второй группы наблюдалась аналогичная ситуация при p=0,009. Таким образом МСК в обеих группах обладали высокой способностью к подавлению пролиферации Т-лимфоцитов.

При сравнении способности подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов между исследуемыми группами статистически значимых отличий не обнаружено (p=0,665). Таким образом культивирование МСК при пониженной температуре не оказывает значительного влияния на их способность подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов.

**Заключение.** МСК пуповины обладают выраженной способностью к подавлению пролиферативной активности Т-лимфоцитов. Культивирование МСК при 35 °С не оказывает значительного влияния на их способность к подавлению пролиферации Т-лимфоцитов.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСФЕКЦИИ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ МСК И ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМЫ МЕТОДАМИ ЛИПОФЕКЦИИ И ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ

А. Ю. Мисюкевич, А. Г. Полешко

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

В настоящее время в клеточной инженерии актуально направление, связанное с возможностью генетической модификации соматических клеток человека, биомассу которых можно получать *in vitro*. Что предполагает введение в клетки экзогенного генетического материала. Среди наиболее эффективных способов доставки трансгенов в соматические клетки человека являются трансфекция методами липофекции и электропорации, а также трансдукция. Стоит отметить, что с точки зрения биобезопасности использование трансфекции при разработке биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) на основе биомассы генетически модифицированных клеток более перспективно. В связи с этим цель данной работы – провести сравнительную оценку эффективности таких методов трансфекции как липофекция и электропорация в отношении культивированных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и фибробластов дермы (ФД) человека, как наиболее часто используемых клеточных объектов при разработке БМКП, и подобрать оптимальные для введения в клетки трансгена их режимы.

В работе использовали культивированные в стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37 °С, 100% влажность) с использованием стандартных протоколов МСК жировой ткани (n=3) и ФД (n=3) человека не старше 3 пассажа. Эффективность трансфекции оценивали по проценту жизнеспособных клеток со встроенной активной экспрессионной кассетой, выступающей в качестве генетического экзогенного материала от общего количества клеток, подвергшихся трансфекции. Экспрессионная кассета включала ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) как селективного маркера и входила в состав рекомбинантного плазмидного вектора (pX458). Электропорацию МСК и ФД проводили с использованием системы Neop<sup>TM</sup> (Invitrogene, США), согласно рекомендациям производителя. Всего было протестировано 24 режима электропорации с разными значениями напряжения, ширины импульса, его количеством для каждого типа клеток. Липофекцию проводили с использованием коммерческого набора Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 Reagent kit (Life Technologies, США), согласно рекомендациям производителя. Спустя 48 ч культивирования после проведения липофекции и электропорации МСК и ФД открепляли от пластика стандартным способом и оценивали количество GFP-позитивных жизнеспособных клеток с помощью проточной цитометрии. Показано, что наиболее оптимальными режимами электропорации в отношении ФД являются – 1 импульс напряжением 1600 V/1700 V и временем воздействия 20 мс, 3 импульса напряжением 1400 V и временем воздействия каждого 10 мс; в отношении МСК – 1 импульс напряжением 1700 V и временем воздействия 20 мс, 2 импульса напряжением 1300 V/1400 V и временем воздействия 20 мс. При указанных режимах электропорации эффективность трансфекции составила 16–19% – для МСК и 26–39% – для ФД. В то же время использование липофекции позволило добиться эффективности трансфекции порядка 3% – для ФД и 15% – для МСК, что значительно ниже, по сравнению с электропорацией, что свидетельствует о более высокой эффективности последней для культивированных МСК и ФД ранних пассажей. Полученные данные позволяют повысить эффективность введения трансгена в культивированные МСК и ФД и тем самым оптимизировать процесс получения на их основе генетически модифицированных клеточных продуктов.

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОКАУТА Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА И МНСІ В КЛЕТКАХ Т-ЛИМФОЦИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ЭКСПРЕССИОННЫХ КАССЕТ

Е. С. Покладок, А. Н. Мелешко, Е. В. Кушнерова

*РНПЦ Детской онкологии гематологии и иммунологии, д.Боровляны,  
Республика Беларусь*

Адаптивная клеточная терапия Т-лимфоцитами ограничена аутологичным получением клеток, поскольку аллогенные Т-лимфоциты провоцируют развитие реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и сопровождающий любого рода трансплантацию синдром отторжения трансплантата [1, 2]. Эффект РТПХ опосредован наличием на мембране клеток донора Т-лимфоцитов Т-клеточного рецептора, который способен связываться с чужеродным для него антигеном, присутствующим на клетках реципиента [3]. Отторжение трансплантата связано с презентацией антигенов донора в составе МНСІ и распознавание их Т-лимфоцитами реципиента.

Элиминация данных рецепторов способна решить вопрос с аллогенной трансплантацией Т-лимфоцитов, в частности в разработке аллогенных CAR-T. Получение CAR-T с использованием здоровых клеток донора решает многие проблемы аутологичной CAR-T-терапии: высокая стоимость, длительность производства и, собственно, невозможность производства CAR-T из собственных клеток пациента [4]. Белковый продукт гена TRAC является константным доменом  $\alpha$  цепи Т-клеточного рецептора. Продукт гена B2M – компонент легкой цепи МНСІ. Нокаут данных генов приведет к потере экспрессии Т-клеточного рецептора и МНСІ.

Целью работы является оценка эффективности редактирования генов TRAC и B2M CRISPR/Cas9 системой с использованием собранных нами экспрессионных кассет.

Материалы и методы: в качестве модельной культуры была использована клеточная линия Т-лимфоцитов Jurkat. Выбор наилучших sgRNA B2M3 и TRAC2 проведен на предыдущем этапе работы [5]. Нами были собраны 4 варианта экспрессионных кассет: PTG2g–sgRNA B2M3 и TRAC2 находятся под одним человеческим промотором U6 и разделены tRNA; 2hU6 – обе sgRNA находятся под человеческими промоторами U6 и на одной цепи; mhU6\_MM – sgRNA B2M под мышинным промотором U6, sgRNA TRAC под человеческим промотором U6, на одной цепи; mhU6\_PM – sgRNA TRAC под промотором человека U6 на минус цепи, sgRNA B2M под мышинным промотором U6 на плюс цепи. Вектором доставки выступал LentiCRISPR-EGFP-Cas9, клонирование описанных фрагментов в который осуществлялось по сайтам рестрикции KpnI и EcoRI. Собранные векторные конструкции использовались для получения вирусных частиц, трансфекция проводилась на культуре HEK293T. Полученные вирусные частицы использовались для доставки sgRNA и Cas9 в Т-лимфоциты методом трансдукции. Эффективность нокаута оценивалась на проточном цитометре на 3 сут. после трансдукции после окрашивания модифицированных культур антителами anti-CD3-PacificOrange и anti-B2M-PerCP-Cy5.5.

Результаты: эффективность нокаута PTG2g – для B2M 0%, для TRAC 23,1%; 2hU6 – для B2M 1%, для TRAC 56%; mhU6\_MM – для B2M 11,6%, для TRAC 63,9%;

mhU6\_PM – для B2M 4,6%, для TRAC 42,7%. Наиболее успешным вариантом сочетания промоторов и sgRNA стала конструкция с человеческим и мышиным промотором, лежащим на одной цепи ДНК – mhU6\_MM.

### **Библиографические ссылки**

1. Donor regulatory T cells rapidly adapt to recipient tissues to control murine acute graft-versus-host disease / D. J. Dittmar [et al.] // *Nat. Commun.* 2024. Vol. 15, iss. 1. P. 3224.
2. Graft-versus-host disease modulation by innate T cells / Y. Fang [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, iss. 4. P. 4084.
3. Potential of TCR sequencing in graft-versus-host disease / M. Goel [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* 2023. Vol. 58, iss. 3. P. 239–246.
4. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells / J. Zhao [et al.] // *J. Hematol. Oncol.* 2018. Vol. 11. P. 1–11.
5. Нокаут генов Т-клеточного рецептора и HLA класса I в клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9 / Е. В. Кушнерова [и др.] // *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2022. № 2. С.19–26.

## ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ИХ СПОСОБНОСТЬ К ПРОДУКЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

А. Г. Полешко, А. В. Водопьянова, С. В. Пинчук, О. И. Чиж, З. Б. Квачева

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

На сегодня актуальным является разработка оптимальных протоколов получения терапевтически активных внеклеточных везикул (ВВ) культивированных мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (МСК) из их кондиционированной среды. При этом важным этапом является подбор и стандартизация условий культивирования клеток с целью получения большого количества ВВ за минимальное количество раундов пассирования без потери биологических свойств ВВ. В связи с этим целью данной работы явилось оценить влияние посевной дозы МСК и времени их культивирования в питательной ростовой среде на способность к продукции клетками ВВ.

Культуру МСК жировой ткани (ЖТ) (CD29+/CD44+/CD73+/CD90+/CD105+/CD34-/CD45-/HLADR-) человека культивировали по стандартной методике (37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, 100% влажность,  $\alpha$ -MEM, 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 2 мМ глутамина, 1% смеси антибиотиков-антимикотиков) до 2-го пассажа. После этого клетки пассировали в различных посевных дозах, которые вызывали на следующий день формирование клеточного монослоя с конфлюентностью порядка 50%, 80% и 100%. МСК переводили на ростовую среду того же состава, но с добавлением 10% обедненной по экзосомам ФБС и инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч, после чего полученную кондиционированную среду собирали и подвергали процессингу с использованием подхода дифференциального центрифугирования с этапом ультрацентрифугирования. Количество и подлинность (экспрессия CD9, CD63, CD81) полученных ВВ оценивали с использованием проточной цитофлуориметрии.

В результате было выявлено, что наиболее оптимальной с точки зрения получения большого количества ВВ МСК ЖТ из их кондиционированной среды является посевная доза клеток, при которой за сутки после пассирования формируется клеточный монослой с конфлюентностью порядка 80%. В этом случае выход ВВ за 72 ч культивирования МСК ЖТ 3-го пассажа составляет на 40% и 20% больше, по сравнению с таковым для клеток, посаженных с исходной плотностью монослоя 50% и 100%, соответственно. Это можно объяснить тем, что при 70–80% конфлюентности монослоя клетки, находясь в логарифмической фазе роста, максимально функционально активны и при культивировании продуцируют в среду роста наибольшее количество ВВ. Кроме того было показано, что оптимальное время культивирования МСК ЖТ в плотности клеточного монослоя 80% для максимального выхода ВВ является период в 48 ч. При 24-х часовом культивировании продукция ВВ клетками была в 1,4 раза меньше, а при 72-х – не увеличивалась, что скорее всего связано с формированием 100% клеточного монослоя и началом контактного торможения МСК ЖТ, что приводит к снижению их функциональной активности.

Таким образом, можно сделать вывод, что для получения ВВ МСК в большом количестве, важными параметрами для контроля являются посевная доза клеток при пассировании и интервал их инкубирования в ростовой питательной среде в стандартных для клеток условиях культивирования, что позволит оптимизировать протокол получения ВВ культивированных МСК ЖТ.

# ОСНОВАНИЯ МАННИХА ПРОИЗВОДНЫХ 4-ТРЕТ- БУТИЛПИРОКАТЕХИНА: РАДИКАЛРЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

И. С. Туромша<sup>1,2</sup>, М. Ю. Гвоздев<sup>1</sup>, Е. Ю. Варфоломеева<sup>3</sup>, Р. А. Ковалев<sup>3</sup>,  
Н. Д. Федорова<sup>3</sup>, Н. П. Осипович<sup>2</sup>, Г. А. Ксендзова<sup>2</sup>, Н. В. Логинова<sup>1,2</sup>,  
Р. Л. Свердлов<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химических проблем, Минск, РБ

<sup>3</sup>НИЦ “Курчатовский институт” – ПИЯФ, Гатчина, Россия

Производные пирокатехина (1,2-дигидроксibenзола) играют важную роль в протекании ряда биохимических и патофизиологических процессов, таких как внутриклеточная сигнализация, иммунный ответ, атеросклероз, болезни Паркинсона и Альцгеймера [1]. Актуальность современных исследований фенольных соединений обусловлена их выраженными антиоксидантными свойствами. Пирокатехиновые производные способны нейтрализовывать радикальные частицы *in vitro* и *in vivo*, включая активные формы кислорода (АФК) (супероксидный анион-радикал, гидроксильный и пероксильные радикалы) и азота (монооксид азота, пероксинитрит) [2]. В то же время фенольные соединения могут проявлять прооксидантную активность: гиперпродукция АФК может приводить к нарушению внутриклеточного редокс-гомеостаза, а также к повреждению структуры ДНК, белков и мембранных липидов, что служит причиной цитотоксического действия производных пирокатехина. Цитотоксичность производных 1,2-дигидроксibenзола, связанная с генерацией радикальных частиц, обуславливает антимикробную и противоопухолевую активность соединений данной группы [3].

В данной работе исследуются антиоксидантные и прооксидантные свойства фенольных оснований Манниха производных 4-трет-бутилпирокатехина. Оценка антиоксидантной активности соединений *in vitro* проводилась на модели с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразильным радикалом, в тестах на медьвосстановительную активность и железохелатирующую активность, а также методом циклической вольтамперометрии. Для определения цитотоксичности соединений использовались оценка пролиферативной активности и выживаемости дермальных фибробластов человека клеточной линии DF-2, влияния исследуемых веществ на пролиферацию активированных лимфоцитов, а также на реакцию респираторного взрыва в нейтрофилах. Полученные результаты рассматриваются в корреляции с параметрами структуры и электродными потенциалами окисления соединений с целью выявления взаимосвязи структура-активность. Изучение радикалрегуляторных свойств пирокатехиновых производных, способных оказывать как анти-, так и прооксидантный эффект, представляет интерес с точки зрения дизайна новых химиотерапевтических агентов, а также оценки цитотоксичности фенольных антиоксидантов при потенциальном медицинском применении.

## Библиографические ссылки

1. Oxidative Stress and Antioxidant Protection: The Science of Free Radical Biology and Disease. Ed. by D. Armstrong, R.D. Stratton. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2016. – 609 p.
2. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Oxford University Press, 2015. – 5th edition. – 961 p.
3. Pro- and anti-oxidant properties of redox-active catechol-chitosan films / E. Kim [et al.] // Frontiers in chemistry. 2019. Vol. 7, iss. 541. P. 1–7.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФИБРОБЛАСТОВ ЛЁГКОГО КРЫСЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ИХ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СРЕД DMEM И DMEM/F12

А. Н. Шклярова<sup>1</sup>, А. Е. Сусленкова<sup>1</sup>, М. Н. Стародубцева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Институт радиобиологии НАН Беларуси, г. Гомель, Беларусь*

<sup>2</sup>*Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, Беларусь*

Фибробласты являются основными клеточными элементами собственно соединительной ткани организма и выполняют важные функции в процессах развития и поддержания функционирования тканей, заживления ран и другое. Культуры фибробластов считаются эффективной биологической моделью для оценки действия различных факторов (новых лекарственных агентов, факторов внешней среды). При культивировании культур фибробластов используются среды с разным составом, присутствие или отсутствие определенных веществ в них оказывают влияние на состояние фибробластов, их функциональные возможности в планируемых в дальнейшем экспериментах. Целью работы было выявление различия механических свойств фибробластов лёгкого крысы при использовании сред DMEM и DMEM/F12. Культура первичных фибробластов была получена из лёгкого 3-х мес. крысы линии Wistar. Выращивали клетки на двух различных средах DMEM и DMEM-F12 с добавлением 10% бычьей сыворотки и 1% антимикотика (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В). Кусочки лёгкого помещали в чашку Петри (35 мм) до достижения конfluence вышедших клеток 75% (1 x фосфатно-солевой буфер с добавлением раствора Хэнса). Механические параметры поверхности клеток 0 пассажа изучали с помощью атомно-силового микроскопа Bruker BioScope Resolve. Сканирование проводили с использованием прекалиброванной иглы PFQNM-LC-A-CAL в режиме ForceVolume.

Скорость пролиферации клеток существенно отличалась для образцов фибробластов, культивированных с использованием различных сред. Наиболее быстрый выход фибробластов наблюдали для среды DMEM/F12. Состояние клеток, а именно, их цитоскелета различалось, о чем свидетельствовали результаты оценки упругих свойств клеточной поверхности. Модуль упругости фибробластов, культивированных в разных средах, различался примерно в 6,5 раз.  $E=11,86(8,63;14,86)$  кПа для среды DMEM и  $1,81(1,43;3,33)$  кПа для среды DMEM/F12 ( $p<0,05$ , критерий Манна-Уитни). Характеристика распределения упругих свойств в глубину клетки (зависимость модуля упругости от глубины индентирования) показывает пространственное распределение областей с повышенной плотностью цитоскелета. Эта зависимость более крутая для фибробластов в среде DMEM, чем для клеток в среде DMEM/F12, что указывает на формирование у фибробластов в среде DMEM дополнительных актиновых структур, таких как, например, стрессовые фибриллы. Из-за отсутствия в среде DMEM фактора Nam-12, клетки подвергались большему стрессу, что вызвало повышенную активность цитоскелета и усиление механических свойств клеток. Культивирование фибробластов в среде DMEM/F12 способствует меньшей активации клеток, включая случай их активации при взаимодействии с подложками. Фибробласты в этой среде проявляют вязкоупругие свойства, в то время как при культивировании фибробластов в среде DMEM из-за активации актинового цитоскелета клетки, в большей степени, проявляют механические свойства, характерные для упругого объекта.

Работа выполнена в рамках темы задания 3.01.2 ГПНИ «Природные ресурсы и окружающая среда» (№ГР 20210231 от 15.03.2021).

## ИЗУЧЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛИНИИ ZR-75 С ПОМОЩЬЮ АСМ

А. Н. Шклярова<sup>1</sup>, И. А. Челнокова<sup>1</sup>, М. Н. Стародубцева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт радиобиологии НАН Беларуси, Беларусь

<sup>2</sup>Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь

Механические свойства живых клеток существенно зависят от температуры. Большинство исследований по клеточной механике проводятся либо при физиологических температурах (37 °С), либо при комнатной температуре (около 25 °С). Работ по изучению влияния гипер-, а также и гипотермии на параметры механических свойств раковых клеток, измеренные с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ), в современной литературе мало, хотя знание этих закономерностей необходимо для более глубокого понимания канцерогенеза и разработки новых, более эффективных методов лечения рака молочной железы. Клетки рака молочной железы линии ZR-75 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% антимикотика в стандартных условиях: 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки высаживали в чашки Петри и помещали на термощейкер на 30 мин при различных температурах (34–48 °С с шагом 1 °С) с последующей 24-ч-инкубацией при стандартных условиях. АСМ в режиме Force Volume (FV) проводили с помощью приборного комплекса Bruker BioScope Resolve (Bruker) и прекалиброванного зонда PFQNM-LC-A-CAL ( $k=0,088$  и  $0,098$  Н/м) в термоячейке при температуре, соответствующей их тепловой предобработки. Модуль упругости поверхности клеток линии ZR-75, рассчитанный по силовым кривым с использованием модели Герца, увеличивается при температурах 38–41 °С в сравнении с значением при 37 °С. При достижении температуры в 46 °С и выше имеет место массовый некроз клеток линии ZR-75. Тангенс потерь (отношение модуля потерь к модулю накоплений –  $G''(\omega)/G'(\omega)$ ) служат мерой относительного вклада вязкой и упругой составляющих в динамический модуль упругости. Его часто используют как индикатор наличия, положения и относительной величины переходов между различными состояниями. Небольшой тангенс потерь (меньше единицы) отражает доминирующее твердотельное упругое поведение, которое позволяет клеткам сохранять свою форму в ответ на деформацию. Анализ средних значений тангенса потерь при разных температурах не выявил статистически значимых различий между ними. Медианные значения тангенса потерь для изученного диапазона температур колебались от 0,09 до 0,18. При анализе частотной зависимости тангенса потерь выявлено, что имеется зависимость от температуры тенденция к снижению этого параметра при частотах 10–17 Гц. При этих частотах увеличивается вклад упругого компонента в механические свойства клеток, следовательно, поведение клеток более становится еще больше похожим на поведение твердого тела. В литературе имеются сведения о влиянии низкочастотных механических колебаний на жизнеспособность раковых клеток. На основе анализа параметров упругих и вязкоупругих свойств поверхности раковых клеток линии ZR-75 установлена чувствительность упругих свойств к повышению температуры и тангенса потерь к низкочастотным вибрационным воздействиям с максимальным преобладанием упругих свойств над вязкостными в интервале инфразвуковых частот.

Работа выполнена в рамках проекта БРФФИ Б22М-087 «Определить с помощью атомно-силовой микроскопии закономерности влияния температуры на механические свойства клеток рака молочной железы».

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЕНТИВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ

**Т. В. Шман, Т. И. Ермилова, Ю. В. Лебедева, А. В. Клыч, А. С. Мухаметшина, Е. И. Горбач, Е. П. Вашкевич**

*ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Беларусь*

Преимуществами использования естественных киллерных (ЕК) клеток в онкологии является их врождённая высокая противоопухолевая активность и безопасность для пациента. Успешное применение ЕК-иммунотерапии ограничивается непродолжительной персистенцией ЕК клеток в организме реципиента и способностью опухолевых клеток избегать распознавания ЕК клетками. Решение этих проблем возможно путем генетической модификации исходных свойств ЕК-клеток. Однако, существуют методологические сложности доставки генетического материала в эти клетки, что затрудняет разработку иммунотерапии на основе ЕК клеток.

Цель работы – проанализировать эффективность модификации ЕК клеток человека *in vitro* методом лентивирусной трансдукции с использованием различных псевдотипированных лентивирусных частиц и условий трансдукции.

**Материалы и методы.** Сборку вирусных частиц проводили с применением ко-трансфекции пакующей клеточной линии НЕК293Т. Тестировали два варианта лентивирусных частиц – VSV-G- и ВаEV-псевдотипированные. В качестве трансфер-плазмиды использовали рWPXL, в составе которой закодирован флуоресцентный белок eGFP. Исследовали три варианта трансдукции: двойная спинокуляция (осаждение части вируса, после чего клетки смешивали со второй частью вируса и проводили второе осаждение); однократная спинокуляция (клетки смешивали с вирусом и осаждали); суспензионный вариант (клетки смешивали с вирусом с добавлением вектофузина). Уровень трансдукции оценивали по экспрессии eGFP в ЕК клетках через 72 часа – 10 сут. после трансдукции методом проточной цитофлуориметрии.

**Результаты.** При использовании VSV-G-псевдотипированных частиц уровень трансдукции ЕК клеток не превышает 5% даже при использовании MOI (множественность инфекции) 5. При использовании ВаEV-псевдотипированных частиц уровень трансдукции был выше 30% при MOI 1 и повышался при увеличении множественности инфекции. При MOI 10 уровень инфекции ЕК клеток достигал 70%. Уровень трансдукции при использовании VSV-G-псевдотипированных лентивирусных частиц был низким при всех вариантах проведения трансдукции. При использовании ВаEV-псевдотипированных лентивирусных частиц уровень трансдукции был достоверно выше по сравнению с VSV-G, однако достоверно не отличался между вариантами проведения трансдукции – количество трансдуцированных ЕК клеток находилось в диапазоне от 30% до 35% при всех тестируемых вариантах при MOI 1. При этом дальнейшее культивирование трансдуцированных клеток на протяжении 10 дней не приводит к достоверному снижению количества модифицированных ЕК клеток при использовании различных вариантов проведения трансдукции.

**Заключение.** Метод трансдукции с использованием ВаEV-псевдотипированных лентивирусных частиц при пятикратной множественности инфекции позволяет получить до 70% генно-модифицированных ЕК клеток с высоким уровнем жизнеспособности и стабильностью экспрессии трансгена не менее 10 дней.

## ЭКСПРЕССИЯ И СЕКРЕЦИЯ ЭФФЕКТОРОВ СИСТЕМЫ СЕКРЕЦИИ III ТИПА SipV И SopE САЛЬМОНЕЛЛ

**М. А. Яроцкая<sup>1</sup>, А. В. Качан<sup>2</sup>, А. Н. Мелешко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Отличительная черта *Salmonella enterica Typhimurium* заключается во внутриклеточном паразитизме данных бактерий и наличии у них сразу двух разновидностей системы секреции III типа, которые обеспечивают вирулентность бактерий на разных этапах жизненного цикла. Обе эти системы секреции предлагались ранее [1] для конструирования живых вакцин, экспрессирующих белки-химеры эффекторов системы секреции III типа и антигенов.

Целью данной работы была оценка возможности экспрессии и секреции белка-эффектора для конструирования пероральной противоопухолевой вакцины на основе штамма *Salmonella enterica Typhimurium* ATCC 14028 в различных условиях. Экспрессионная кассета включала 160- и 100-аминокислотные фрагменты N-концевых домена эффекторов сальмонелл SipV и SopE, соответственно, для которых ранее [2, 3] была продемонстрирована возможность доставки антигена. В качестве репортера экспрессии был выбран флуоресцентный белок sfGFP (англ. superfolded green fluorescent protein), который отличается от других флуоресцентных белков своей способностью транспортироваться в периплазму клеток бактерий, не теряя своих флуоресцентных свойств [4]. Метка FLAG для иммуноблоттинга была включена в белок между SipV/SopE и sfGFP. Экспрессия контролировалась синтетическим промотором proD, обеспечивающим высокий уровень конститутивной экспрессии [5]. Векторами для данных экспрессионных кассет были выбраны pET20b и pACYC184. 16-часовые ночные культуры бактерий разбавляли в 30 раз и выращивали в 2-х вариантах условий индукции в питательной среде LB с повышенным содержанием NaCl с аэрацией или без. Контролем служили клетки того же штамма с плазмидой без sfGFP.

Экспрессия химерного белка SipV(160)-FLAG-sfGFP и SopE(100)-FLAG-sfGFP оценивалась по флуоресценции белка sfGFP в суспензии клеток по завершению 6 ч индукции в диапазоне 514–567 нм. Флуоресценция бактерий с конструкцией SipV составляла 7100-9274 ОЕ, что превышало контроль в 18–24 раза. Флуоресценция бактерий с SopE составляла 11401-1424 ОЕ, что превышало контроль в 30–37 раз. В обоих случаях максимум флуоресценции наблюдался в условиях индукции с 1,75% NaCl и аэрацией.

Иммуноблот с антителами к метке FLAG для химеры SipV продемонстрировал накопление в клетках полноразмерного белка массой около 45 кДа и преобладающей фракции ограниченного белка массой около 32 кДа. В культуральной среде определялась секреторная фракция белка 32 кДа в количестве около 1/5 от клеточной фракции без выраженной зависимости от условий индукции. Иммуноблот с антителами к метке FLAG для химеры SopE показал выраженную экспрессию белка около 30 кДа в клеточной фракции и секреторную фракцию примерно в равном соотношении.

Таким образом, оба эффектора SipV и SopE обеспечивают экспрессию химерного белка с sfGFP. Секреция эффектора SopE более эффективна, но связана с ограниченным протеолизом белка. Химерные конструкции эффекторов секреции III типа SipV и SopE с опухоль-ассоциированными антигенами рассматриваются перспективными для получения живых пероральных вакцин.

### Библиографические ссылки

1. Application of genetically engineered *Salmonella typhimurium* for interferon-gamma-induced therapy against melanoma / W. Yoon [et al.] // Eur. J. Cancer. 2017. Vol. 70. P. 48–61.
2. Expression and delivery of tetanus toxin fragment C fused to the N-terminal domain of SipB enhances specific immune responses in mice / J. I. Jang [et al.] // Microbiol. Immunol. 2012. Vol. 56, iss. 9. P. 595–604.
3. Safety and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* delivering an HIV-1 Gag antigen via the *Salmonella* Type III secretion system / C. N. Kotton [et al.] // Vaccine. 2006. Vol. 24, iss. 37. P. 6216–6224.
4. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein / J. D. Pédelacq [et al.] // Nat. Biotechnol. 2006. Vol. 24, iss. 1. P. 79–88.
5. Davis J. H., Rubin A. J., Sauer R. T. Design, construction and characterization of a set of insulated bacterial promoters // Nucleic Acids Res. 2011. Vol. 39, iss. 3. P. 1131–1141.

# **НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ**

# МАГНИТНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В УПРАВЛЕНИИ ЛОКАЛИЗАЦИЕЙ КОЛЛОИДНЫХ ЧАСТИЦ В БИОПОДОБНЫХ СИСТЕМАХ

**А. А. Баскаев, Г. Б. Хомутов**

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

На сегодняшний день актуальной проблемой является поиск новых способов лечения заболеваний. Одним из развивающихся направлений в лекарственной терапии является адресная доставка лекарственных препаратов к месту назначения: органу или участку ткани. Решением является применение коллоидных частиц в качестве лекарственных препаратов благодаря их способности увеличивать растворимость лекарственных веществ, улучшать их биодоступность и уменьшать побочные эффекты. Это позволяет повысить эффективность терапии и снизить применяемую дозу препарата.

Коллоидные системы для доставки, по сути, являются контейнерами для переноса лекарств, локализацией которых можно управлять. Популярным методом пространственной локализации являются магнитные взаимодействия, позволяющие концентрировать магниточувствительные коллоидные частицы в нужном месте.

Использование наночастиц в качестве систем-носителей для лекарств или других биоактивных терапевтических молекул исследуется с целью улучшения терапевтического эффекта и снижения побочных эффектов. Широко используются наночастицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Они легко агрегируются и окисляются, поэтому их часто изготавливают с различными покрытиями для реализации свойств для адресной доставки лекарств/генов [1].

Липосомы представляют собой самособирающиеся лекарственные везикулы на основе липидов/фосфолипидов, которые образуют двухслойные (однослойные) и/или концентрический ряд из нескольких слоев (многослойные), имеющие внутренний объем. Размер липосом варьирует от 30 нм до микрометров, толщина фосфолипидного бислоя составляет 4–5 нм [2]. Используются как средства доставки низкомолекулярных лекарств, белков и нуклеиновых кислот. Обладают рядом преимуществ, такими как, защита инкапсулированных веществ от физиологической деградации, контроль высвобождения молекул лекарственного средства, биосовместимость.

В ходе работы были измерены спектры ЭПР магнитных наночастиц. Также была рассчитана скорость движения липосом в покоящемся потоке в кровеносном капилляре и исследовано распределение липосом в капилляре при неоднородном магнитном поле.

## **Библиографические ссылки**

1. *Thomsen L. B., Thomsen M. S., Moos T. Targeted drug delivery to the brain using magnetic nanoparticles // Therapeutic Delivery. 2015. Vol 6, iss. 1. P. 1145–1155.*
2. *Liu P., Chen G., Zhang J. A review of liposomes as a drug delivery system: current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives // Molecules. 2022. Vol. 27, iss. 4. P. 1372.*

## ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОСЕЛЕНА И УСКОРЕННЫХ ИОНОВ УГЛЕРОДА НА КЛЕТКИ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА *EX VIVO*

Т. А. Белякова<sup>1,2</sup>, О. М. Розанова<sup>1</sup>, Е. Н. Смирнова<sup>1</sup>, Н. С. Стрельникова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

<sup>2</sup>ФГБУ Институт физики высоких энергий им. А.А. Логунова Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Протвино, Россия

<sup>3</sup>“Физико-технический центр” ФГБУ науки Физического института им. П.Н. Лебедева РАН, Протвино, Россия

Для развития и совершенствования ионной терапии опухолей разрабатываются методы модификации действия ионов углерода ( $^{12}\text{C}$ ) для снижения побочных эффектов на здоровые ткани и усиления радиотерапии с помощью нанознхансеров. Целью работы являлось изучение частоты индукции и скорости роста солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) при инокуляции асцитных клеток, облученных *ex vivo* пучком ионов  $^{12}\text{C}$  в присутствии наночастиц селена (SeNPs).

Эксперименты проводили на 2-месячных самцах мышей линии SHK (30–34 г). Всего было использовано 80 мышей. В качестве модели опухолевого роста была выбрана солидная форма АКЭ. Опухолевые клетки получены из криобанка культур ИБК РАН (Пущино, Россия). Клетки АКЭ асептически выделяли на 7-ой день после внутривентриальной инокуляции мышам и переносили в эппендорфы в концентрации  $20 \cdot 10^6/\text{мл}$ . В части вариантов к суспензии клеток добавляли раствор SeNPs в конечных концентрациях 0.17 и 0.34 мг/мл и выдерживали при комнатной температуре не менее 1 ч. SeNPs были получены методом лазерной абляции массивных мишеней селена в деионизированной воде ( $\Omega=18 \text{ МОМ} \times \text{см}$ ) (Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва). Средний гидродинамический диаметр наночастиц селена составлял порядка 100 нм, полуширина находилась в пределах 70–130 нм. Суспензию клеток АКЭ облучали ионами углерода в узком пике Брэгга шириной 2.5 мм (ЛПЭ ~ 150 кэВ/мкм) в дозах 10 Гр и 20 Гр при средней мощности дозы 3 Гр/мин на моноэнергетическом пучке с энергией 400 МэВ/нуклон ускорительного комплекса У-70 на базе НИЦ “Курчатовский институт” – ИФВЭ (Протвино). Затем мышам в бедро внутримышечно имплантировали  $2 \cdot 10^6$  асцитных клеток для получения солидной формы АКЭ и регистрировали в течение 30 сут частоту индукции опухолей и скорость их роста.

Показано, что в группах мышей, которым были перевиты необлученные клетки АКЭ или обработанные SeNPs в концентрации 0.17 мг/мл на 5-й день у 100% появлялись опухоли, а при обработке SeNPs в концентрации 0.34 мг/мл на 10 сут только у 20% были опухоли, а к 30 сут – у 90%. В группах мышей, которым вводили облученные 10 Гр клетки без SeNPs и при обработке низкой концентрацией SeNPs, на 12 сут наблюдали опухоли у 100% мышей, а при SeNPs (0.34 мг/мл) на 17 сут 10% мышей были с АКЭ, а через 30 сут доля мышей с АКЭ составила 30%, что близко к частоте индукции опухолей при облучении клеток ионами  $^{12}\text{C}$  в дозе 20 Гр. Скорость роста индуцированных солидных АКЭ во всех группах была одинакова. Полученные результаты выявили противоопухолевую активность SeNPs и значительное усиление с помощью SeNPs противоопухолевого действия  $^{12}\text{C}$ -излучения при облучении клеток АКЭ *ex vivo*.

## СЕРЕБРЯНО-ЦИСТЕИНОВЫЕ НАНОКОМПЛЕКСЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СРЕДСТВА

Ан. А. Богданов, В. М. Моисеенко, А. А. Богданов

ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр  
специализированных видов медицинской помощи (онкологический)  
им. Н.П. Напалкова»,  
Санкт-Петербург, Российская Федерация

Наночастицы и соединения серебра, такие как нитрат серебра, представляют большой интерес для исследования их противоопухолевой активности. Однако нитрат серебра обладает системной и местной токсичностью, что ограничивает его применение. Для преодоления этого недостатка мы предложили синтез новых неметаллических серебряно-аминокислотных комплексов, не содержащих токсичных нитрат-ионов.

Был разработан метод синтеза серебряно-цистеиновых наноккомплексов из растворов цистеина и нитрата серебра. Физические свойства полученных наноккомплексов исследовали методом динамического светорассеяния. Было показано образование наноразмерных комплексов, размеры и электрокинетический потенциал которых варьировались в зависимости от соотношения компонентов в растворе. Для оценки цитотоксической активности *in vitro* использовали методы проточной цитофлуорометрии и МТТ-тест. Исследование цитотоксичности серебряно-цистеиновых комплексов *in vitro* на различных опухолевых клеточных линиях (К-562, HeLa, СТ-26) показало значения  $IC_{50}$  в диапазоне 9–22 мкг/мл. При этом токсичность в отношении нормальных клеток (моноклеарные клетки периферической крови человека) не наблюдалась, что указывает на селективное действие комплексов в отношении опухолевых клеток. Далее, в попытке уменьшить количество стадий синтеза и очистки, мы разработали метод синтеза серебряно-цистеиновых наноккомплексов из растворов цитрата серебра и цистеина. Было показано, что полученные наноккомплексы обладают аналогичными физико-химическими характеристиками и биологической активностью.

Таким образом, нами был предложен метод синтеза неметаллических серебряно-цистеиновых наноккомплексов, обладающих цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам и пониженной токсичностью по сравнению с нитратом серебра. Полученные результаты демонстрируют перспективность использования данных комплексов в качестве противоопухолевых агентов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга для ГБУЗ «СПб КНпЦСВМП(о) имени Н.П. Напалкова».

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БОР-НИТРИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ С ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ

**А. В. Богданова<sup>1,2</sup>, В. К. Кулик<sup>1</sup>, С. В. Корень<sup>3</sup>, Е. Г. Фомина<sup>3</sup>, А. Н. Бугай<sup>4</sup>,  
Т. А. Кулагова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> НИУ «Институт ядерных проблем» БГУ, Минск, Беларусь

<sup>2</sup> МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ, Минск, Беларусь

<sup>3</sup> РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

<sup>4</sup> Лаборатория радиационной биологии, ОИЯИ, Дубна, Россия

Бор-нитридные наночастицы (БННЧ) – частицы нанометрового размера, которые имеют графеноподобную структуру, образованную шестичленными кольцами, содержащими атомы бора и азота в вершинах. Они малотоксичные и обладают уникальными фотофизическими свойствами, обеспечивающими обнаружение их накопления в клетках спектрофлуориметрическими методами, в том числе методом флуоресцентной микроскопии. Вариативность функционализации поверхности и краев БННЧ позволяет не только улучшать их люминесцентные свойства для использования в качестве агента для биовизуализации клеток, но и рассматривать данные наночастицы как перспективные материалы для адресной доставки лекарств [1]. Более того, БННЧ могут выступать в качестве нанопрепаратов для бор-нейтронозахватной терапии – неинвазивного метода лечения труднодоступных опухолей [2]. Целью данной работы стала разработка одностадийного воспроизводимого синтеза биосовместимых БННЧ и исследование возможности их использования для биовизуализации клеток *in vitro*.

БННЧ были синтезированы гидротермическим методом с использованием борной кислоты, в качестве прекурсора атомов бора, и мочевины, в качестве прекурсора атомов азота. Синтез проводился в тefлоновом реакторе при 200 °С в течение 12 ч. Синтезированные в таких условиях наночастицы обладают максимумом флуоресценции на длине волны 405 нм при возбуждении на длине волны 320 нм и квантовым выходом флуоресценции 6%. С помощью адсорбции на хлопковых волокнах была показана возможность визуализации наночастиц с помощью флуоресцентного микроскопа при возбуждении на длине волны 365 нм. Клетки почки мартышки Vero и почки собаки MDCK были получены из коллекции культур РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (г. Минск). К монослою культуры клеток MDCK и Vero в культуральной среде DMEM добавляли водный раствор БННЧ и инкубировали при 37 °С в течение 6–24 ч. Методом флуоресцентной микроскопии при возбуждении на длине волны 365 нм оценивали накопление БННЧ в клетках. Выявлено, что при инкубировании клеток Vero и MDCK с БННЧ в диапазоне концентраций от 10 до 200 мкг/мл жизнеспособность клеток не нарушается, сохраняется способность к формированию монослоя. Флуоресценция БННЧ визуализировалась только в монослое клеточной линии Vero, инкубируемой с наночастицами в концентрации 200 мкг/мл в течение 24 ч. Это, вероятно, обусловлено низким квантовым выходом флуоресценции БННЧ. Дальнейшее оптимизирование условий синтеза БННЧ для повышения квантового выхода, а также сдвига максимума их люминесценции в длинноволновую область спектра, значительно расширит потенциал биомедицинского применения наночастиц.

Авторы выражают благодарность БРФФИ за финансовую поддержку, грант Х24МП-006.

### **Библиографические ссылки**

1. Hexagonal boron nitride quantum dots: Properties, preparation and applications / X. Zhang [et al.] // Mater. Today Chem. 2021. Vol. 20. P. 1–17.

2. Boron neutron capture therapy: a review of clinical applications / T. D. Malouff [et al.] // Front. Oncol. 2021. Vol. 11. P. 601820.

# НАНОСТРУКТУРЫ СЕРЕБРА И ЗОЛОТА КАК НАНОСЕНСОРЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БИОМОЛЕКУЛ

А. А. Буглак, В. А. Помогаев, Т. С. Сыч, А. И. Кононов

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

В последние годы биополимерные матрицы активно используются для синтеза кластеров серебра и золота. Чувствительность кластеров к молекулярному окружению открывает возможности их применения для детекции различных аналитов в водных растворах и биологических жидкостях. Мы исследовали физико-химические свойства и фотонику металлических наночастиц и нанокластеров (НК). Последние обладают интенсивной люминесценцией и способны менять свои оптические свойства вместе с изменением окружения, что позволяет использовать их для детекции различных биомаркеров.

Так, установлен механизм сенсорной активности кластеров серебра на ДНК, используемый для детекции специфических последовательностей нуклеиновых кислот. Кроме того, продемонстрирована возможность использования для синтеза НК белков. Так, нами успешно получены НК на сывороточном альбумине и иммуноглобулинах [1]. Данные НК можно использовать в качестве люминесцентных сенсоров для детекции полипептидов.

Для понимания природы взаимодействия кластеров и биополимерных матриц проведено моделирование *in vitro* и *in silico* взаимодействий кластеров и низкомолекулярных соединений: азотистых оснований и аминокислот. Показано, что цистеин наиболее активно вступает в реакцию с серебром и золотом и, как следствие, цистеиновые остатки в составе белков стабилизируют кластеры в белковых матрицах. Помимо цистеина и других тиолов благородные металлы активно взаимодействуют с депротонированными тирозином, глутаминовой и аспарагиновой кислотами. При этом энергия взаимодействия аминокислот и серебра/золота выше, чем энергия взаимодействия серебра/золота и азотистых оснований, что свидетельствует о различном характере связи металлов с белками и нуклеиновыми кислотами.

Также взаимодействие кластеров с низкомолекулярными лигандами важно было исследовать с точки зрения детекции последних. Для этого подробно исследованы комплексы серебра и диоксифенилаланина [2], комплексы золота и птерина [3]. Показано, что возможна детекция данных аналитов как на основании колориметрии и флуоресцентной спектроскопии, так и с применением Рамановского рассеяния.

Работа поддержана Российским Научным Фондом, грант № 20-73-10029 (<https://rscf.ru/project/20-73-10029/#!>).

## Библиографические ссылки

1. Quantitative determination of albumin and immunoglobulin in human serum using gold nanoclusters / T. S. Sych [et al.] // Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 2023. Vol. 298. P. 122796.
2. Rapid and selective colorimetric determination of L-DOPA in human serum with silver nanoparticles / Z. V. Reveguk [et al.] // Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 2023. Vol. 299. P. 122810.
3. Pterin interactions with gold clusters: A theoretical study / P. P. Chebotaev [et al.] // Dye. Pigment. 2023. Vol. 216. P. 111323.

## МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НА КЛЕТКИ ЛИНИИ HeLa ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

**В. В. Войнаровский, И. В. Мартинович, А. А. Богданёнок, Г. Г. Мартинович**

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

Окислительный стресс является причиной нарушения функционирования и гибели клеток при многих патологических состояниях организма, включая нарушения иммунитета, нейродегенеративные, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания. Раскрытие механизмов окислительного стресса и поиск эффективных средств защиты клеточных структур от окислительного повреждения является актуальной проблемой биофизики на протяжении многих лет [1]. Перспективными регуляторами внутриклеточных редокс-процессов являются наночастицы диоксида церия, способные проявлять антиоксидантные и прооксидантные свойства при разных физико-химических условиях окружения. В данной работе исследованы механизмы действия наночастиц диоксида церия на внутриклеточную продукцию активных форм кислорода клетками линии HeLa в зависимости от свойств поверхности наночастиц.

Наночастицы диоксида церия синтезировали методом гомогенного осаждения из нитрата церия с применением гексаметилентетрамина [2]. В работе использовали наночастицы церия размером около 50 нм, стабилизированные цитратом натрия и без стабилизатора. Размеры наночастиц диоксида церия и их качественный элементный состав определяли с применением растрового электронного микроскопа LEO-1455 VP (Carl Zeiss) с приставкой энергодисперсионного спектрометра Aztec Energy Advanced X-Max 80 (Oxford Instruments). Оценку внутриклеточной продукции активных форм кислорода проводили на основе анализа скорости окисления флуоресцентного зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина. Жизнеспособность клеток определяли с применением МТТ-теста после 24 часов инкубирования в присутствии пероксида водорода и/или наночастиц диоксида церия.

В результате исследований показано, что при действии пероксида водорода в концентрации 50–400 мкМ наблюдается дозозависимое снижение числа жизнеспособных клеток. Добавление наночастиц диоксида церия, стабилизированных цитратом натрия, в концентрации 5–40 мкг/мл приводило к снижению токсичности пероксида водорода. В суспензии клеток показано, что в условиях индуцированного пероксидом водорода окислительного стресса наночастицы диоксида церия снижали уровень внутриклеточных активных форм кислорода. Обнаружено, что антиоксидантные свойства наночастиц диоксида церия зависят от свойств поверхности: стабилизированные цитратом натрия наночастицы проявляли более выраженные антиоксидантные свойства в сравнении с наночастицами без стабилизатора.

### Библиографические ссылки

1. *Мартинович Г. Г.* Активные формы кислорода в регуляции функций и свойств клеток: явления и механизмы. Минск: БГУ, 2021. – 239 с.
2. *Ярошинская Н. В., Полежаева О. С., Иванов В. К.* Синтез нанокристаллического диоксида церия с контролируемым размером частиц и шириной запрещенной зоны // *Альтернативная энергетика и экология*. 2008. Т. 1. С. 58–62.

## ВЛИЯНИЕ НАНОАЛМАЗОВ ДЕТОНАЦИОННОГО СИНТЕЗА С РАЗЛИЧНЫМ СОСТАВОМ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП НА КЛЕТКИ КРОВИ

И. В. Горудко<sup>1</sup>, Д. В. Григорьева<sup>1</sup>, Д. Е. Ивашкевич<sup>1</sup>, В. А. Пархоменко<sup>2</sup>,  
А. А. Луговский<sup>2</sup>, Г. А. Гусаков<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Институт прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко БГУ, Минск, Беларусь

Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза (ДНА) обладают большой удельной площадью поверхности, малыми размерами, биосовместимостью, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных средств для доставки лекарственных соединений. Высокая дисперсность и наличие функциональных групп на поверхности ДНА – два основных параметра, от которых зависит их взаимодействие с молекулами и клетками организма и успешное применение в биомедицинских исследованиях. Цель работы – исследовать влияние функционализированных ДНА с различным составом кислородсодержащих групп на свойства клеток крови.

**Методы.** В работе использовался исходный ДНА марки УДА-ГО производства ЗАО «Синта» (Минск, Беларусь) (ДНА 0). Для модификации функционального состава поверхности ДНА было проведено его окисление путем термообработки на воздухе при температурах 350 °С (ДНА 1) и 400 °С (ДНА 2) в течение 5 ч. Цитотоксичность ДНА определяли по способности вызывать гемолиз, который оценивали по спектрам поглощения гемоглобина в надосадочной жидкости эритроцитов. Жизнеспособность нейтрофилов оценивали методом проточной цитометрии с использованием пропидиум йодида (PI). Устойчивость эритроцитов к кислотному и НОСІ-индуцированному гемолизу оценивали турбидиметрическим методом.

**Результаты.** По данным ИК-спектроскопии образец ДНА 0 содержит большое количество различных кислородсодержащих функциональных групп, среди которых преобладают карбоксильные группы. После термообработки на воздухе количество кислородсодержащих групп на поверхности ДНА увеличивается. При этом наблюдается трансформация карбоксильных групп в форму лактонов (ДНА 1) или кислотных ангидридов (ДНА 2). Показано, что после добавления исходных или функционализированных ДНА в суспензию эритроцитов морфология клеток сохранялась, гемолизированных эритроцитов не обнаруживалось. При изучении влияния тестируемых ДНА на нейтрофилы во всем исследованном диапазоне концентраций (вплоть до 10% по объему) количество PI-положительных событий не увеличивалось. В присутствии ДНА 0 устойчивость эритроцитов к НОСІ-индуцированному и кислотному гемолизу не изменялась, в то время как ДНА 1 и ДНА 2 концентрационно-зависимым образом ингибировали оба типа гемолиза, причем защитный эффект ДНА 2 на эритроциты проявлялся сильнее по сравнению с действием ДНА 1. В бесклеточной среде флуоресцентным методом с использованием скополетина было показано, что все три типа ДНА не проявляли антиоксидантных свойств. Следовательно, стабилизирующий эффект ДНА 1 и ДНА 2 обусловлен их непосредственным взаимодействием с поверхностными структурами эритроцитов. Этому может способствовать уменьшение после

термообработки ДНА на их поверхности количества карбоксильных групп, препятствующих взаимодействию ДНА с эритроцитами, несущими отрицательный заряд.

**Вывод.** ДНА, полученные путем термообработки на воздухе при температурах 350 °С и 400 °С и характеризующиеся разным составом кислородсодержащих функциональных групп, не обладают цитотоксичностью по отношению к эритроцитам и нейтрофилам и оказывают выраженный стабилизирующий эффект на мембрану эритроцитов, повышая устойчивость клеток к гемолизу. Исследованные ДНА могут быть использованы при создании диагностических и лекарственных средств.

## СТЕРЖНЕВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ СЕЛЕНА АКТИВИРУЮТ НЕЙТРОФИЛЫ

**И. В. Горудко<sup>1</sup>, Д. В. Григорьева<sup>1</sup>, В. Е. Реут<sup>1</sup>, Е. В. Сак<sup>1</sup>, Л. В. Баран<sup>1</sup>,  
А. С. Барышев<sup>2</sup>, А. В. Симакин<sup>2</sup>**

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

<sup>2</sup>*Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия*

Наночастицы селена, жизненно важного элемента в организме человека, находят все более широкое применение в биомедицинских исследованиях благодаря антиоксидантной, иммунорегуляторной, противоопухолевой, нейропротекторной, антимицробной и др. активностям. Традиционно используют сферические наночастицы селена (SeSps), однако в последние годы особое внимание уделяется получению анизотропных форм наночастиц селена с целью улучшения их физико-химических свойств и биологической активности. В этом плане перспективными являются наночастицы селена в виде стержней (SeNrs), которые обладают более пролонгированным действием. Цель работы – исследовать влияние SeNrs на структурно-функциональные свойства клеток крови и сравнить их эффекты с SeSps.

**Методы.** SeSps (214 нм) и SeNrs (длина 1 мкм и диаметр 100 нм) были получены методом лазерной абляции в деионизированной воде. Морфологию эритроцитов оценивали методом атомно-силовой микроскопии; гемолиз регистрировали по спектрам поглощения гемоглобина в супернатантах эритроцитов, а также турбидиметрическим методом. Жизнеспособность нейтрофилов оценивали методом проточной цитометрии с использованием пропидиум йодида. Дегрануляцию нейтрофилов оценивали методом проточной цитометрии с использованием анти-CD66b-FITC и анти-CD63-APC – маркеров дегрануляции специфических и азурофильных гранул, соответственно. Продукцию активных форм кислорода (АФК) регистрировали в суспензии изолированных нейтрофилов флуоресцентным методом с использованием скополетина, а также методом проточной цитометрии с использованием 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата.

**Результаты.** Установлено, что после добавления SeSps или SeNrs в суспензию эритроцитов их морфология сохранялась. Кроме того, в присутствии SeSps или SeNrs эритроциты становились более устойчивы к НОС1-индуцированному гемолизу, в то время как стабилизирующее действие на кислотный гемолиз было выявлено только для SeSps. В присутствии SeSps и SeNrs сохранялась жизнеспособность нейтрофилов. При этом SeSps и SeNrs дозо-зависимым образом стимулировали дегрануляцию, а также продукцию АФК нейтрофилами, которая ингибировалась в присутствии хлорида дифенилениодония – ингибитора сборки НАДФН-оксидазы; вортманнина – ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы; генистеина – ингибитора тирозинкиназ; PP2 – ингибитора Src-киназ, цитохалазина В – ингибитора полимеризации актина. Активирующее действие наночастиц селена на нейтрофилы может быть обусловлено их актин-зависимым эндоцитозом. Более выраженный эффект на функциональные свойства нейтрофилов оказывали SeNrs, что согласуется с данными литературы о том, что стержневые наночастицы легче проникают в клетки.

**Вывод.** SeNrs не обладают цитотоксичностью по отношению к эритроцитам и нейтрофилам и оказывают выраженное активирующее действие на дегрануляцию и

продукцию АФК нейтрофилами, что может быть использовано для разработки на их основе иммуномодулирующих средств. Следовательно, дальнейшее исследование свойств наночастиц селена в анизотропной форме представляется перспективной для биомедицинских применений.

Работа поддержана грантами БРФФИ (Б24МВ-014 и Б24М-023) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-15-2022-315 на организацию и развитие Научного центра мирового уровня “Фотоника”).

# МЕМБРАННАЯ СИСТЕМА КАК КЛЮЧЕВОЙ ЭЛЕМЕНТ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОГИБРИДНЫХ НАНОКОМПЛЕКСОВ С ПРОТИВОМИКРОБНОЙ И ПРОТИВОРАКОВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Ю. Е. Горшкова

*Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, Россия*

Разработаны новые биогибридные наноконплексы для адресной доставки лекарств, действие которых нацелено на борьбу с устойчивыми микроорганизмами или имеющих высокий потенциал в борьбе с раковыми опухолями, на основе природных компонент: липосом соевого лецитина, хитозана и наночастиц (НЧ) серебра/хлорида серебра. Для уменьшения токсичности наночастиц в работе был применен «зеленый» синтез НЧ – получение НЧ из экстрактов растений (корневища куркумы или листьев винограда и мяты).

Морфологические (атомно-силовая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия) и структурные (малоугловое нейтронное и рентгеновское рассеяние) методы анализа подтвердили наноразмерный масштаб компонентов полученных биокомпозитов. Присутствие гибридных Ag/AgCl НЧ было определено методами рентгеновской дифракции и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. С помощью оптической и ИК-Фурье спектроскопии, измерения дзета-потенциала было подтверждено образование стабильных биогибридных наноконплексов. В результате комплементарных исследований была предложена модель формирования биокомплексов и определены наиболее устойчивые системы, что позволило существенно сократить время проведения *in vitro* тестов для выявления потенциала разработанных материалов в различных областях медицины.

Созданные наногибриды продемонстрировали высокую антимикробную активность в отношении различных бактерий, как Gram (+) bacteria (*Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus*), так и Gram (-) bacteria (*Escherichia coli*). Разработанные биогибридные наносистемы показали высокую антипролиферационную активность (при отсутствие гемолитической активности) для раковых клеток HT-29 и HepG2, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных адъювантов при лечении рака печени и рака прямой кишки.

## Библиографические ссылки

1. Characterization and antitumoral activity of biohybrids based on turmeric and silver/silver chloride nanoparticles / M. E. Barbinta-Patrascu [et al.] // Materials. 2021. Vol. 14. P. 4726.
2. Biological performances of plasmonic biohybrids based on phyto-silver/silver chloride nanoparticles / Y. Gorshkova [et al.] // Nanomaterials. 2021. Vol. 11. P. 1811.

## СЕКРЕТОРНАЯ ДЕГРАДУЛЯЦИЯ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ БИОПОЛИМЕРАМИ МИКРОЧАСТИЦ ВАТЕРИТА

Д. В. Григорьева<sup>1</sup>, М. В. Матусевич<sup>1</sup>, Д. А. Ванина<sup>1</sup>, Е. В. Михальчик<sup>2</sup>,  
Н. Г. Балабушевич<sup>3</sup>, О. М. Панасенко<sup>2</sup>, И. В. Горудко<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва,  
Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет им.М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Важнейшую роль в реализации функций нейтрофилов играют гранулярные белки, секретируемые во внеклеточное пространство. Дегрануляция нейтрофилов является показателем изменения функционального состояния этих клеток при различных воздействиях. Цель работы – исследовать экзоцитоз миелопероксидазы (МПО) и лизоцима при действии на нейтрофилы функционализированных биополимерами (декстрансульфатом, хондроитинсульфатом, гепарином, пектином, фукоиданом, муцином) микрочастиц ватерита как перспективных средств доставки целевых биологически активных молекул.

Нейтрофилы инкубировали с тестируемыми препаратами в течение 15 мин при 37 °С. В клеточных супернатантах оценивали активность лизоцима (турбидиметрическим методом по скорости лизиса бактериальных клеток *M. lysodeikticus*) и пероксидазную активность МПО (спектрофотометрическим методом по скорости окисления *o*-дианизидина).

Выявлено повышение активности МПО в супернатантах нейтрофилов после их инкубации с гибридными микрочастицами ватерита (0,25 мг/мл), функционализированными гепарином, пектином, фукоиданом или муцином, а также после инкубации с самими биополимерами (0,25 мг/мл). Выраженность активирующих экзоцитоз МПО эффектов самих биополимеров коррелировала с эффектами функционализированных этими молекулами микрочастиц ватерита. По степени выраженности эффекта их можно расположить в следующей последовательности: гепарин>фукоидан>муцин>пектин. Необходимо отметить, что сами биополимеры не увеличивали активность изолированного фермента, напротив, пектин, фукоидан и муцин ингибировали пероксидазную активность МПО.

После инкубации нейтрофилов со всеми тестируемыми гибридными микрочастицами ватерита в супернатантах не была выявлена повышенная активность лизоцима; кроме того, после инкубации с микрочастицами ватерита, функционализированными гепарином, активность лизоцима снижалась на ~ 40%. После инкубации с декстрансульфатом или гепарином активности лизоцима в супернатантах нейтрофилов снижалась, остальные биополимеры не влияли на экзоцитоз лизоцима из гранул нейтрофилов. Данное снижение, по всей вероятности, обусловлено ингибированием активности самого лизоцима, поскольку при добавлении декстрансульфата или гепарина к очищенному лизоциму его способность лизировать бактериальные клетки снижалась. Таким образом, при использовании в качестве средств доставки гибридных микрочастиц ватерита необходимо учитывать влияние применяемых для их функционализации биополимеров не только на процессы активации нейтрофилов, но и на биологическую активность гранулярных белков этих клеток, играющих важную роль при воспалительных заболеваниях.

Работа поддержана грантом Министерства образования Республики Беларусь (договор № 002/2024-БГУ), совместным грантом РФФИ (№ 23-45-10026) и БРФФИ (№ Б23РФ-093); микрочастицы ватерита получали при частичной поддержке темы 121041500039-8 МГУ им. М.В. Ломоносова.

## ВЛИЯНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ И ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ ИМИ МИКРОЧАСТИЦ ВАТЕРИТА НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

Д. В. Григорьева<sup>1</sup>, Е. В. Михальчик<sup>2</sup>, Н. Г. Балабушевич<sup>3</sup>, М. А. Мурина<sup>2</sup>,  
О. М. Панасенко<sup>2</sup>, А. В. Соколов<sup>2,4</sup>, И. В. Горудко<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>4</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Микрочастицы ватерита, представляющие собой метастабильную форму карбоната кальция, являются перспективными формами доставки лекарственных соединений. В настоящее время разрабатываются препараты с включением в ватерит тромбина и транексамовой кислоты для терапии геморрагических состояний. Однако для более эффективной доставки целевых молекул (увеличения включения и удерживания) микрочастицы ватерита необходимо функционализировать биополимерами. Цель работы – исследовать влияние полисахаридов (декстрансульфата, хондроитинсульфата, гепарина, пектина, фукоидана), муцина и микрочастиц ватерита, а также гибридных микрочастиц ватерита с вышеупомянутыми биополимерами на агрегационную активность тромбоцитов.

**Методы.** Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП), а также изолированные тромбоциты выделяли из донорской крови, стабилизированной цитратом натрия. ОТП получали центрифугированием крови при 200 g в течение 10 мин. Отмытые тромбоциты выделяли путем двукратного центрифугирования ОТП при 1600 g в течение 3 мин с последующим отмыванием осадка в трис/ЭДТА-буфере, содержащем 13,3 мМ трис, 120 мМ NaCl, 15,4 мМ KCl, 6 мМ D-глюкозы и 1,5 мМ ЭДТА (pH 6,9). Агрегацию тромбоцитов исследовали турбидиметрическим методом, регистрируя изменение светопропускания клеточных суспензий на длине волны 540 нм при 37 °С и постоянном перемешивании.

**Результаты.** Установлено, что фукоидан, гепарин, декстрансульфат (при внесении в ОТП) и муцин (при добавлении к изолированным тромбоцитам) индуцировали агрегацию клеток. Пектин и хондроитинсульфат дозо-зависимым образом ингибировали АДФ- и тромбин-индуцированную агрегацию, муцин подавлял АДФ-индуцированную, а декстрансульфат – тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Микрочастицы ватерита в концентрации 0,1–1 мг/мл не влияли на агрегацию изолированных тромбоцитов, но вызывали 10–15%-ую агрегацию клеток в плазме; при этом в концентрации 1 мг/мл микрочастицы ватерита на ~ 30% препятствовали агонист-индуцированной агрегации клеток. Установлено, что гибридные микрочастицы ватерита с фукоиданом или гепарином при внесении как в ОТП, так и к изолированным клеткам способны инициировать агрегацию тромбоцитов. Гибридные микрочастицы ватерита, функционализированные пектином или хондроитинсульфатом, не оказывали влияния на спонтанную агрегацию клеток, и не влияли (с хондроитинсульфатом) или ингибировали (с пектином) агонист-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

**Вывод.** Использование гибридных микрочастиц ватерита с пектином или фукоиданом/гепарином может быть перспективным для доставки препаратов, направленных на модуляцию (ингибирование – с пектином или активацию – с фукоиданом/гепарином) тромбоцитарного звена гемостаза.

Работа выполнена при поддержке совместного гранта Российского научного фонда (проект № 23-45-10026) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б23РНФ-093), получение микрочастиц ватерита проведено при частичной поддержке темы 121041500039-8 МГУ им. М.В. Ломоносова.

## ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ДЕНДРИМЕРОВ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

В. А. Жогла<sup>1</sup>, Л. Хэ<sup>2</sup>, Ю. Гао<sup>2</sup>, М. Шэнь<sup>2</sup>, С. Ши<sup>2</sup>, Д. Г. Щербин<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>*Университет Дунхуа, Шанхай, Китай*

Развитие злокачественных новообразований и метастазирование тесно связаны с характеристиками микроокружения, которые благоприятствуют росту опухоли. Уникальность микроокружения в значительной степени определяется метаболическими особенностями опухолевых клеток, при которых они демонстрируют ускоренное потребление энергии по сравнению со здоровыми клетками. Это приводит к резистентности опухоли к различным методам лечения и иммунным агентам. В злокачественных клетках происходит усиленное накопление пирувата с дальнейшей секрецией большого количества лактата в опухолевое микроокружение, что приводит к его закислению. Лактат ингибирует активацию и пролиферацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток, NK-клеток и дендритных клеток, а также положительно регулирует иммуносупрессивные регуляторные Т-клетки. Ожидается, что истощение лактата в микроокружении опухоли в комбинации с иммунными препаратами значительно активизирует противоопухолевый иммунный ответ для усиления действия терапии [1]. Переносчик монокарбоксилатов MCT-4 позволяет лактату выходить наружу для поддержания стабильного внутриклеточного pH и индукции кислого опухолевого микроокружения. Ожидается, что замалчивание соответствующего данному переносчику гена при помощи миРНК увеличит внутриклеточное содержание лактата, вызовет апоптоз опухолевых клеток и, соответственно, уменьшит внеклеточное содержание лактата. Доставка в микроокружение опухоли миРНК требует использования биосовместимых и эффективных векторов, в качестве которых могут выступать дендримеры с модифицированными поверхностными группами [2].

В данной работе использовались модифицированные дендримеры на основе ПАМАМ дендримеров 5 генерации с поверхностными аминогруппами, часть из которых была конъюгирована с фенилборной кислотой и пиридином. Такие макромолекулы обладают сниженной цитотоксичностью относительно классических ПАМАМ дендримеров, при этом сохраняя способность связывать и переносить в клетки нуклеиновые кислоты. В частности, для доставки в клетки культуры лимфоцитарного лейкоза мышей L1210 использовалась миРНК, направленная на замалчивание экспрессии гена, кодирующего белок MCT-4. Исследование эффекта комплексов дендримеров с миРНК, а также с лактатоксидазой, при инкубации 72 часа показало достоверное различие действия комплексов с нетаргетной миРНК и таргетной миРНК (100% и 92% выживаемости соответственно). Также был обнаружен синергетический эффект при добавлении нетоксичных концентраций лактатоксидазы – снижение выживаемости клеток до 67%. Таким образом, была подтверждена эффективность действия новых модифицированных дендримеров в качестве векторов доставки миРНК и фермента лактатоксидазы в опухолевые клетки. Данная работа поддержана ГКНТ РБ и БРФФИ, грант Б22КИТГ-020.

### Библиографические ссылки

1. Lactate in the regulation of tumor microenvironment and therapeutic approaches / K. G. de la Cruz-Lopez [et al.] // Front. Oncol. Frontiers. 2019. Vol. 9. P. 1143.
2. MCT1 modulates cancer cell pyruvate export and growth of tumors that co-express MCT1 and MCT4 / C. S. Hong [et al.] // Cell Rep. CellPress. 2016. Vol. 14. P. 1590–1601.

## ТЕХНОЛОГИЯ ДОСТАВКИ АЭРОЗОЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ПОВЕРХНОСТЬ КЛЕТОЧНОГО СЛОЯ

**И. Л. Канев<sup>1</sup>, М. В. Верхолашин<sup>2</sup>, М. Е. Тайлаков<sup>1</sup>, Е. Р. Брысякин<sup>3</sup>,  
О. Ю. Антонова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия*

<sup>2</sup> *ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия*

<sup>3</sup> *ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия*

Социально-экономическая и научная значимость поиска новых способов доставки лекарственных средств, эффективных при легочных заболеваниях, равно как и разработка моделей исследования легких, подтверждается катастрофическим воздействием пандемии COVID-19. Особый интерес в качестве лекарственной формы вызывают наноаэрозоли с размером частиц 10–100 нм, обладающие способностью к эффективному осаждению в глубоких отделах легких. При вдыхании такой наноаэрозоль проникает в альвеолярные структуры легкого, где непосредственно вступает в контакт с клеточными мембранами легочного эпителия и альвеолярных макрофагов. Описанный нами ранее метод получения наноаэрозолей, основанный на электрораспылении растворов в полярном растворителе с последующей нейтрализацией заряженных наночастиц в газовой фазе, пригоден для широкого спектра веществ и нанобъектов различной природы [1]. Показано также, что эффективность осаждения внутри физической модели легкого намного выше в случае, если часть аэрозольных частиц, производимых генератором, имеет электрический заряд [2]. В данной работе исследована возможность использования электрических зарядов, переносимых аэрозольными частицами, для осуществления их доставки на поверхность клеточного слоя с помощью направленного электрического поля. Нами разработан аппаратно-программный комплекс для осаждения слабозаряженного наноаэрозоля на поверхность частично гидратированного клеточного слоя на поверхности пористой мембраны. Изменение давления, прикладываемого к жидкости под мембраной, позволяет управлять уровнем погружения клеток в культуральную среду. Этот процесс контролируется с помощью оптического датчика, измеряющего степень рассеивания лазерного луча на поверхности клеточного слоя. Равномерное осаждение заряженного аэрозоля в камере установки продемонстрировано на монослоях клеток карциномы легкого A549 и первичной культуры клеток легкого крысы. Экспозиция слоя клеток в потоке воздуха в течение 10 минут не приводила к гибели значимой доли клеток для выбранных клеточных культур (~90% живых клеток через 24 часа). Увеличение времени экспозиции до 30 минут приводило к постепенному снижению доли выживших клеток первичной культуры легкого до ~70%, при этом жизнеспособность клеток A549 стабильно остается на уровне выше 80%. Показано, что осаждение заряженных наночастиц глюкозы со средним размером 60 нм в течение 10 минут не приводило к снижению жизнеспособности клеток.

способности клеток. Продемонстрирована прямая зависимость между временем осаждения наноаэрозоля противоопухолевого препарата доксорубицина и долей погибших клеток карциномы легкого.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-25-00478.

### **Библиографические ссылки**

1. Generation and delivery of nanoaerosols from biological and biologically active substances / V. N. Morozov [et al.] // *J. Aerosol Sci.* 2014. Vol. 69. P. 48–61.

2. *Morozov V. N., Kanev I. L.* Dry lung as a physical model in studies of aerosol deposition // *Lung*. 2015. Vol. 193. iss. 5. P. 799–804.

# АНАЛИЗ СОПРЯЖЕНИЯ ДНК В РАСТВОРЕ С НАНОЧАСТИЦАМИ МЕТАЛЛОВ

Н. А. Касьяненко

*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

Молекула ДНК не только является основным биополимером. Эта макромолекула является уникальным полимером, обладающим огромной плотностью заряда, чрезвычайно высокой жесткостью, способностью к самосборке в растворе при организации двухцепочечных структур. Именно поэтому растворы ДНК используют не только для изучения потенциальной биологической активности различных систем биомедицинского назначения, но и для изготовления сложных многокомпонентных устройств, для построения программируемых наноструктур, которые находят применение в нанотехнологических разработках для использования в нанооптике, нанофотонике, наноэлектронике, а также при создании новых композиционных материалов. Проводится сравнительный анализ различных нанотехнологий, использующих высокомолекулярную ДНК, а также результатов формирования и свойства различных наноструктур на основе высокомолекулярной ДНК, полученных в результате взаимодействия макромолекулы в растворе с различными лигандами, полимерами и наночастицами. Исследования были сосредоточены на анализе вторичной и третичной структуры ДНК при взаимодействии с поликатионами и ионами металлов, вызывающими структурирование и конденсацию ДНК. Восстановление ионов металлов, связанных с ДНК (серебра, золота, палладия), приводит к металлизации макромолекулы. Вторым путем создания структур, включающих ДНК, наночастицы благородных металлов и различные лиганды заключался в использовании поликатионных полимеров, сопряженных с наночастицами.

В экспериментах использовали спектрофотометрию, круговой дихроизм, флуоресцентную спектроскопию, динамическое светорассеяние, вискозиметрию, двойное лучепреломление в потоке и атомную силовую микроскопию.

Конформационные свойства ДНК с возможностью превращения жесткой заряженной гидрофильной двухцепочечной структуры, стабилизированной водородными связями между гидрофобными комплементарными основаниями разных цепей внутри спирали, в гибкий полимерный клубок, обеспечивают уникальную возможность строить различные системы путем самосборки за счет изменения состава и термодинамического качества растворителя. Именно уникальные структурные и конформационные свойства ДНК, в первую очередь ее полиэлектролитные свойства, позволяют использовать макромолекулу в качестве материала для создания наноразмерных структур различного назначения [1–3].

## Библиографические ссылки

1. Packaging of DNA Integrated with Metal Nanoparticles in Solution / N. A. Kasyanenko [et al.] // *Entropy*. 2023. Vol. 25, iss. 7. P. 1052
2. DNA Integration with Silver and Gold Nanoparticles: Enhancement of DNA Optical Anisotropy / N. A. Kasyanenko [et al.] // *Journal of Physical Chemistry B*. 2019. Vol. 123, iss. 45. P. 9557–9566.
3. Касьяненко Н. А., Барышев А. В., Бакулев В. М. Конформационные изменения высокомолекулярной ДНК при ее связывании с наночастицами благородных металлов в растворе // *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2021. Т. 9. С. 1718–1724.

# ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТЕМОПОРФИНА С ТЕРМОЗАВИСИМЫМ СОПОЛИМЕРОМ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ЕГО ДВУХСТАДИЙНОГО КОЛЛАПСА

**И. В. Коблов<sup>1</sup>, В. Каскех<sup>2</sup>, И. Е. Кравченко<sup>1</sup>, Т. Е. Зорина<sup>1</sup>, Н. В. Куцевол<sup>3</sup>,  
В. П. Зорин<sup>1,2</sup>**

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

<sup>2</sup>*МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ, Минск, Беларусь*

<sup>3</sup>*Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Киев, Украина*

Сополимеры, характеризующиеся наличием фазового перехода в области физиологических температур, обладают большим потенциалом в качестве контейнеров для доставки лекарственных соединений к клеткам/тканям мишеням [1]. Примером подобных полимерных систем является термозависимый сополимер декстрана и поли-N-изопропилакриламида (Д70П), который изменяет своё структурное состояние от свободного клубкообразного при низких температурах до состояния компактной конденсированной глобулы при высоких температурах (выше 34–35 °С). Одним из следствий данного эффекта является изменение способности сополимера в различных структурных состояниях связывать различные лиганды.

Ранее нами было показано, что известный фотосенсибилизатор (ФС) Темопорфин практически не связывается с молекулами Д70П при низких температурах. При высоких температурах этот фотосенсибилизатор эффективно встраивается в молекулы полимера в глобулярном состоянии, причём устойчивость получаемых комплексов полимера и ФС зависит от методики их получения и условий среды [2]. В ряде работ отмечено, что молекулы поли-N-изопропилакриламида демонстрируют двухстадийный коллапс при нагревании выше нижней критической температуры растворения [3, 4]. В данной работе с использованием спектральных методов проанализированы процессы диссоциации Темопорфина из комплексов с Д70П, формировавшихся при температурах до и после второй стадии коллапса сополимера. Показано, что условия формирования комплексов влияют на кинетику высвобождения ФС из состава полимерной глобулы.

На основании результатов исследования кинетики перераспределения ФС из состава сополимера Д70П на биологические мембраны (липидные везикулы) установлено, что скорость диссоциации ФС из комплексов также в значительной степени контролируется состоянием акцепторных структур.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант № М24МП-024; ГПНИ «Конвергенция-2025» (задание 3.03.7.2) и ГПНИ «Биотехнологии-2» (задание 1.29.2); Министерства образования Республики Беларусь.

## Библиографические ссылки

1. Thermoresponsive polymer assemblies: from molecular design to theranostics application / S.-L. Qiao [et al.] // Progress in Polymer Science. 2021. Vol. 131. P. 101578.

2. Evaluation of a dextran-poly(N-isopropylacrylamide) copolymer as a potential temperature-dependent nanocarrier for photosensitizers with different properties / N. Kutsevol [et al.] // Ukrainian Journal of Physics. 2020. Vol. 65, iss. 7. P. 638–646.

3. *Van Duinen D., Butt H.-J., Berger R.* Two-stage collapse of PNIPAM brushes: viscoelastic changes revealed by an interferometric laser technique // Langmuir. 2019. Vol. 35. P. 18.

4. Is the microgel collapse a two-step process? Exploiting cononsolvency to probe the collapse dynamics of poly- N-isopropylacrylamide (pNIPAM) / K. Nothdurft [et al.] // Journal of Physical Chemistry B. 2021. Vol. 125, iss. 5. P. 1503–1512.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГРАФЕНОВЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК С ПЕРОКСИДАЗАМИ

**Т. А. Кулагова<sup>1,2</sup>, А. В. Богданова<sup>1,2</sup>, М. И. Коптяева<sup>2</sup>, Н. В. Амазгбери<sup>2</sup>,  
Г. Н. Семенкова<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>НИУ «Институт ядерных проблем» БГУ, Минск, Беларусь

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

<sup>3</sup>НИЛ НИИ Экспериментальной и клинической медицины БГМУ, Минск, Беларусь

Графеновые квантовые точки (ГКТ) – нульмерный наноматериал на основе графена, обладают хорошей биосовместимостью, низкой токсичностью, стабильной флуоресценцией и являются перспективным материалом для биомедицинского применения. В зависимости от условий синтеза ГКТ могут либо сами обладать пероксидазной активностью, либо регулировать ферментативные процессы, модифицируя каталитическую активность ферментов, взаимодействуя с субстратом и/или продуктом. Известно, что пероксидазы можно использовать для биодеградации графеновых наноматериалов, путем катализируемого окисления и расщепления на более мелкие фрагменты. Такие факторы, как специфичность фермента, доступность субстрата и физико-химические условия окружающей среды, могут существенно влиять на эффективность данных процессов. Цель данной работы – оценить влияние пероксидазы хрена (ПХ), миелопероксидазы нейтрофилов (МПО) и продуктов их ферментативных реакций – пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) и хлорноватистой кислоты ( $HOCl$ ) – на спектральные характеристики ГКТ, а также влияние самих наночастиц на активность данных ферментов.

В ходе исследований выявлено, что спектральные свойства ГКТ не изменяются в присутствии ПХ и ее субстрата  $H_2O_2$ . Следовательно, ГКТ не является субстратом для ПХ и не взаимодействуют с ферментом. Добавление ГКТ к системе «МПО– $H_2O_2$ » приводит к зависимому от времени уменьшению интенсивности флуоресценции ГКТ. При этом в присутствии хлорид-ионов при  $pH=5$  (галогенирующий цикл МПО) зарегистрировано более существенное снижение интенсивности флуоресценции ГКТ. При  $pH=7$  (пероксидазный цикл МПО) снижение флуоресценции ГКТ было менее выраженным, чем при  $pH=5$ . В данной системе присутствие хлорид-ионов не оказывает такого выраженного влияния на тушение флуоресценции ГКТ, как при  $pH=5$ . При изучении кинетики флуоресценции ГКТ в системе «МПО– $H_2O_2$ » при  $pH=5$  и  $pH=7$  с  $Cl^-$  и без них выявлено влияние  $HOCl$  на деградацию ГКТ. При инкубировании ГКТ с  $NaOCl$  в концентрациях  $1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-4}$  моль/л сильно снижается интенсивность флуоресценции ГКТ. Методом флуоресцентной микроскопии установлено, что при добавлении ГКТ к нейтрофилам крови человека клетки накапливают наноматериал. В процессе активации нейтрофилов в присутствии ГКТ зарегистрировано снижение интенсивности флуоресценции наночастиц. Следовательно, МПО и продуцируемая ею  $HOCl$  являются агентами, способными индуцировать деградацию ГКТ в биосистемах. ГКТ можно использовать в качестве сенсоров  $HOCl$  в водных растворах и клеточных системах.

При исследовании влияния ГКТ на пероксидазную активность ПХ и МПО использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ). Установлено, что в присутствии ГКТ скорость окисления ТМБ ферментами снижается, при этом, чем выше концентрация

ГКТ, тем ниже выход продукта окисления ТМБ. Флуоресценция самих ГКТ при возбуждении на длине волны 490 нм в таких системах также снижается. Тушение флуоресценции ГКТ в системах с ТМБ и снижение скорости окисления ТМБ, катализируемого ПХ и МПО, вероятнее всего свидетельствует о взаимодействии ГКТ с ТМБ и изменении доступности субстрата для ферментов за счет его иммобилизации на наночастицах.

Таким образом, ГКТ являются биодергадируемым материалом и обладают биомедицинским потенциалом.

## НАНОКОМПЛЕКСЫ МИРНК С ИОНАМИ КАЛЬЦИЯ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *BCR-ABL* В КЛЕТКАХ K562

**Н. С. Макшанова, В. С. Бурдаков, А. А. Богданов**

*ГБУЗ «СПб КНнЦСВМП(о) им. Н.П. Напалкова», Санкт-Петербург, Россия*

Аномальная активность химерного гена *BCR-ABL* и экспрессия *BCR-ABL* тирозинкиназы являются патофизиологическими причинами хронического миелоидного лейкоза [1]. Известно, что малые интерферирующие РНК (миРНК) используют как эффективный способ подавления экспрессии различных генов, в том числе участвующих в патогенезе злокачественных новообразований. Однако, основной проблемой в использовании миРНК является отсутствие безопасных для организма и эффективных способов ее доставки в клетки-мишени [2]. Ранее было показано, что таргетные миРНК обеспечивают снижение уровня транскрипта *BCR-ABL*, подавляя экспрессию мРНК онкогена [3]. Мы предположили, что отрицательно заряженные молекулы миРНК при взаимодействии с положительно заряженными ионами кальция способны формировать наноконплексы при определенных соотношениях. Известно, что  $\text{Ca}^{2+}$  способствует интернализации клеток и быстрому выходу из эндосом, благодаря чему комплексы  $\text{Ca}^{2+}$ /миРНК могут представлять собой простую, эффективную платформу для доставки миРНК в цитоплазму клетки с последующим успешным подавлением гена-мишени [4]. Целью настоящей работы стала оценка эффективности подавления экспрессии гена *BCR-ABL* в клетках миелоидной лейкемии K562, положительной по гену *BCR-ABL*, с использованием наноконплексов миРНК с ионами кальция. Для определения оптимальных условий образования комплексов миРНК- $\text{CaCl}_2$  мы оценивали размер и диапазон концентраций частиц (комплексов) в смесях, содержащих от 10 до 50 нМ миРНК и от 0,5 до 25 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Оценку размеров и концентраций получившихся комплексов производили методом анализа треков наночастиц NTA. Было установлено, что наибольшую объемную плотность при размерах  $95 \pm 2$  нм и концентрации  $(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^9$  частиц/мл, комплексы достигают при соотношении концентраций 50 нМ миРНК и 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ . В экспериментах по подавлению экспрессии гена *BCR-ABL* мы использовали данное соотношение. Определение уровня мРНК гена *BCR-ABL* проводилось методом ПЦР в реальном времени относительно референсных генов *RPLP0* и *GAPDH*. Уровень мРНК оценивался с использованием метода  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Нами впервые таким способом доставки было показано эффективное подавление экспрессии гена *BCR-ABL* на 52% ( $0,48 \pm 0,02$ ) при 24-ч культивировании в присутствии наноконплекса миРНК по сравнению с контролем ( $1,0 \pm 0,09$ ) ( $p < 0,05$ ).

### Библиографические ссылки

1. Goldman J. M., Melo J. V. Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment // N Engl J Med. 2003. Vol. 349, iss. 15. P. 1451.
2. Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy / H. J. Kim [et al.] // Adv Drug Deliv Rev. 2016. Vol. 104. P. 61–77.
3. Progress in RNAi-mediated molecular therapy of acute and chronic myeloid leukemia / B. Landry [et al.] // Mol Ther Nucleic Acids. 2015. Vol. 4. P. 240.
4. Calcium siRNA nanocomplexes: what reversibility is all about / E. Ruvinov [et al.] // J Control Release. 2015. Vol. 203. P. 150–160.

## СПЕКТРЫ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ОРГАНИЧЕСКОЙ МЕТКИ DABCYL И МОДИФИЦИРОВАННОГО ОЛИГОНУКЛЕОТИДА 5'T20[DABCYL]3'

**Б. В. Ронищенко<sup>1</sup>, Т. П. Северинчик<sup>1</sup>, А. Ю. Панарин<sup>2</sup>, С. Н. Терехов<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*ГНПО «Оптика, оптоэлектроника и лазерная техника», Минск, Беларусь*

<sup>3</sup>*Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

DABCYL – 4-(4-(диметиламино)фенилазо)бензойная кислота – универсальный тушитель флуоресцентных красителей. При определенных условиях может реализовываться резонансный процесс переноса энергии от возбужденной молекулы флуорофора на молекулу DABCYL. Данный эффект определил использование этого соединения для непрерывного мониторинга активности различных биомолекул, чаще всего, в качестве тушителя в диагностических зондах. Чтобы расширить традиционные протоколы, необходимо разрабатывать недорогие высокочувствительные и универсальные методы усиления оптического сигнала от тушащих молекул дабцила, что позволит повысить эффективность анализа биомолекул.

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) – высокочувствительный оптический метод неdestructивного анализа вещества, в частности, биологических анализов. Усиление сигнала ГКР имеет место для молекул, расположенных вблизи поверхности наноструктурированного материала с плазмонными свойствами. Кроме того, важным условием высокой эффективности ГКР является близость полос поглощения молекул аналита и плазмонов.

В настоящей работе в качестве ГКР-метки олигонуклеотида мы использовали краситель DABCYL, максимум поглощения которого расположен при 470 нм, что также находится в резонансе с длиной волны возбуждения ГКР (488 нм). Таким образом, ожидается, что данный краситель обеспечит сигнал ГКР, который будет намного интенсивнее, чем сигнал самого олигонуклеотида.

Нами были синтезированы коллоидные растворы наночастиц серебра, из которых методом адсорбционной иммобилизации на стеклянных подложках сформированы плазмонные покрытия. В качестве соединений-аналитов использовались органический краситель DABCYL, его положительно заряженный аналог, а также модифицированный четвертичными аминогруппами олигонуклеотид 5'T20[Dabcy]3'.

При возбуждении на длине волны 488 нм были зарегистрированы спектры ГКР указанных выше соединений. Спектры несвязанного с олигонуклеотидом DABCYL и его положительно заряженного аналога оказались достаточно интенсивными, что, вероятно, связано с хорошими резонансными условиями возбуждения красителя. В спектре дабцила отчетливо проявляются линии, которые соответствуют опубликованным в литературе данным: 1142 (phenyl-N валентное колебание) и 1193 (C-H деформационное); 1399, 1423, и 1454 (-N=N- колебания), 1601  $\text{cm}^{-1}$  (C=C валентное колебание бензольного кольца). Наряду с частотами максимумов, распределение интенсивностей линий в спектрах также соответствуют литературным данным. Спектр катионного аналога незначительно отличается от спектра исходного дабцила. Линии в спектре ГКР меченого дабцилом олигонуклеотида T20\_Dabcyл имеют достаточно низкую интенсивность. Можно предположить, что в составе олигонуклеотида метка красителя экранируется цепочкой нуклеиновых оснований, что затрудняет взаимодействие дабцилового фрагмента с плазмонной поверхностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Фотоника и электроника для инноваций» (задание 1.8).

## ФУЛЛЕРЕНЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

С. В. Саранцева, О. И. Большакова, В. Т. Лебедев

ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина,  
Россия

На сегодняшний день не существует радикальных методов профилактики и лечения многих нейродегенеративных заболеваний. Следовательно, необходим поиск и разработка альтернативных соединений, которые бы предотвращали негативные последствия факторов патогенеза этих заболеваний, в частности, окислительного стресса в мозге. Наноструктуры углерода рассматриваются в настоящее время, как потенциальные агенты для создания фармакологических препаратов, а также, создания на их основе систем целенаправленной доставки известных лекарственных препаратов в различные органы и ткани. Наиболее изученными наноструктурами углерода являются фуллерены. Для медико-биологических исследований широко применяют водорастворимые производные фуллеренов. Мощная антиоксидантная активность производных фуллеренов, обусловленная способностью поглощать и дезактивировать кислородсодержащие свободные радикалы, может быть использованы для создания нейрозащитных препаратов. Однако использование фуллеренов и их производных в медицине требует детального изучения их влияния на живые организмы, а также исследования их взаимодействия с нервными клетками.

В экспериментальных исследованиях нейродегенеративные заболевания человека (НЗ) изучаются на моделях культур клеток и модельных организмах. К числу последних относится плодовая мушка *Drosophila melanogaster*. Являясь сложным многоклеточным организмом, плодовая мушка представляет собой промежуточную модельную систему между простейшими одноклеточными организмами и модельными системами млекопитающих. На сегодняшний день *Drosophila melanogaster* является наиболее изученным во всех биологических аспектах модельным объектом. Дрозофила имеет сложно устроенный мозг, состоящий из более чем 100 000 нейронов, хорошо развитую нервную систему и поведенческие (обучение и память) реакции, которые приближают плодую мушку к позвоночным. В настоящее время *Drosophila melanogaster* широко используется не только для изучения патогенеза нейродегенеративных заболеваний, но и для поиска средств лечения этих заболеваний. Поскольку гематоэнцефалический барьеры *Drosophila* и млекопитающих в структурном и функциональном планах очень схожи, существуют все условия для быстрого скрининга препаратов на их способность проходить через гематоэнцефалический барьер.

В работе проведена сравнительная оценка биологических потенциалов фуллеренов С<sub>60</sub>, С<sub>70</sub> и С<sub>120</sub> на трансгенных моделях болезни Паркинсона и Хантингтона *Drosophila melanogaster*. Изучена их токсичность *in vitro* и *in vivo*, способность проходить через гематоэнцефалический барьер.

## МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ТИАКАЛИКС[4]АРЕНЫ КАК СРЕДСТВО ДОСТАВКИ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

А. И. Становая<sup>1</sup>, В. М. Абашкин<sup>1</sup>, И. Э. Шибабиев<sup>2</sup>, П. Л. Падня<sup>2</sup>, И. И. Стойков<sup>2</sup>,  
Д. Г. Щербин<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Казанский федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова,  
Казань, Россия

**Введение.** Применение наноматериалов в качестве средств доставки миРНК в опухолевые клетки является одним из значимых направлений для лечения онкологических заболеваний. Наиболее известными носителями для малых РНК являются дендримеры, однако здесь возникает ряд проблем, связанных в первую очередь с их генерацией [1]. Дендримеры низких генераций слабо связывают генетический материал, а дендримеры высоких генераций из-за увеличения количества функциональных групп на поверхности, наоборот, препятствует высвобождению целевого препарата. Оптимальным решением озвученных проблем является замена ядра и одного или несколько внутренних «слоев» дендримера близкими по размеру наночастицами или макроциклическими соединениями. В наших исследованиях в качестве ядра дендримерных соединений использовался тиакаликс[4]арен – аналог «классического» каликсарена, у которого мостиковые метиленовые фрагменты заменены атомами серы [2].

**Цель.** Оценка комплексообразования тиакаликс[4]аренов, модифицированных полиамидаминными дендронами, и миРНК методом одномерного гель-электрофореза.

**Материалы и методы.** Исследованы производные тиакаликс[4]арена, модифицированные дендронами трёх генераций, в конформациях *конус*, *частичный конус* и *1,3-альтернат* и малые интерферирующие РНК.

**Результаты.** Проведенные исследования показали, что наибольшая эффективность связывания тиакаликс[4]аренов, модифицированных дендронами первой генерации, в конформации *1,3-альтернат* с миРНК наблюдается уже при зарядовом соотношении 2.5:1, для второй и третьей генерации – 7.5:1 и выше. Для соединений в конформации *конус* всех трёх генераций наблюдалось образование комплексов при зарядовом соотношении 15:1 и выше. В случае соединений в конформации *частичный конус* первой генерации отмечалось образование комплексов уже при заряд-зарядовом соотношении 1:1, а для второй и третьей генерации – 5:1 и выше. Исследуемые комплексы продемонстрировали стабильность от времени инкубации на протяжении как минимум пяти дней, а также при связывании миРНК сывороточными белками в течение суток.

**Заключение.** Тиакаликс[4]арены, модифицированные полиамидаминными дендронами, исследуемых конформаций всех генераций хорошо связывают генетический материал.

**Благодарности.** Данная работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (БРФФИ), грант Б23РНФМ-041, и Российским научным фондом, грант № 24-43-10005, <https://rscf.ru/project/24-43-10005/>.

#### **Библиографические ссылки**

1. Delivering siRNA with dendrimers: *in vivo* applications / V. Leiro [et al.] // Current Gene Therapy. 2017. Vol. 17. P. 105–119.
2. PAMAM-calix-dendrimers: synthesis and thiacalixarene conformation effect on DNA binding / O. Mostovaya [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22. P. 11901.

## СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ В РАЗРАБОТКЕ ИММУНОСЕНСОРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК КРОВИ

А. В. Тамашевский, Ю. М. Гармаза

*РНПЦ трансфизиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь*

**Актуальность.** В последние годы достижения в производстве иммуносенсорных устройств значительно расширили использование этой технологии в широком спектре приложений, включая клиническую диагностику, анализ пищевых продуктов, контроль качества, исследования окружающей среды и промышленный мониторинг. Наиболее важным аспектом при изготовлении иммуносенсоров является получение конструкции, обеспечивающей высокую чувствительность обнаружения. При этом, использование наноматериалов в качестве биосенсорного преобразователя, пожалуй, самый популярный подход в данной технологии.

**Цель работы** – изучить механизмы взаимодействия между моноклональными антителами/патологическими клетками крови человека и поверхностью 1D фотонных наноструктур на основе оксида цинка (ZnO) для возможности разработки оптических иммуносенсоров с последующим их применением в диагностике онкогематологических заболеваний. В данной работе было проведено тестирование различных форм наноструктурированного ZnO и иммобилизованных антител к CD5 белку в качестве платформы иммуносенсора. Для тестирования его работы была использована коммерческая Т-лимфобластоидная клеточная линия MOLT-4 (ATCC CRL 1582), экспрессирующая на своей поверхности CD5 рецептор (свыше 70% CD5-позитивных клеток).

**Результаты и обсуждения.** В работе изучены вопросы по созданию иммуносенсоров на основе наноструктур ZnO, которые включали в себя: 1) синтез наноматериалов и подготовку платформ на их основе; 2) биофункционализацию платформ антителами; 3) тестирование иммуносенсоров на предмет узнавания опухолевых клеток. Таким образом, был проведен синтез и охарактеризованы различные формы наноструктурированного оксида цинка – стержни, проволока, волокна. Для этого были использованы методы просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии с энергодисперсионным рентгеновским анализатором. С помощью рамановской и инфракрасной спектроскопии охарактеризованы различные методы функционализации наноструктур ZnO, включая нековалентные и ковалентные подходы (силанизация, дополнительное использование протеинов A/G). Рассмотрено применение метода фотолюминесценции для оптического обнаружения аналита (в нашем случае опухолевых клеток), в том числе и с помощью микрофлюидной ячейки.

**Заключение.** Синтезированы и охарактеризованы различные типы платформ на основе 1D наноструктурированного ZnO с целью их использования для создания иммуносенсоров. С помощью микрофлюидной системы показана способность наноплатформ на основе ZnO узнавать Т-лимфобластные клетки по степени их связывания с антителами против CD5. Полученная иммуносенсорная система на основе биофункционализованных наноструктур ZnO и фотолюминесцентным анализом сигнала была предложена впервые.

**Благодарности.** Данная работа поддержана грантами EU Horizon 2020 research and innovation programme H2020-MSCA-RISE № 778157 (2018–2023).

## ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ ЛОКАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕРМИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРРОМАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Т. И. Терпинская<sup>1</sup>, С. Б. Кашевский<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Институт тепло-и массообмена им. А.В. Лыкова НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Применение ферромагнитных наночастиц дает возможность достигнуть локального нагрева опухолевой ткани до высоких температур благодаря разогреву наночастиц, доставленных в опухоль, в переменном магнитном поле. Ранее было показано, что комбинированное применение локальной гипертермии в режиме 44–44,5 °С 20 мин и циклофосфана позволяет добиться торможения опухолевого роста и в ряде случаев полного регресса опухолей у экспериментальных животных [1].

Целью данной работы явилось исследование противоопухолевого эффекта локальной гипертермии с использованием ферромагнитных наночастиц в режиме динамического нагрева до 50 °С и сочетания локальной гипертермии с метотрексатом и кетоналом.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводили на мышинной опухоли асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ). В опытах *in vitro* клетки АКЭ нагревали до 50 °С в водном термостате или инкубировали при 37 °С. При проведении опытов *in vivo* мышам линии Af с растущей подкожно АКЭ вводили интратуморально ферромагнитные наночастицы и подвергали процедуре локальной гипертермии согласно [1]. Наночастицы были суспензированы в этиловом спирте, что позволило избежать их агломерации и ввести в опухоль с помощью шприца. Часть животных опытной группы получала противоопухолевый препарат метотрексат (10 мг/кг, однократно, внутривентриально, за 7 суток до локальной гипертермии) и/или противовоспалительный препарат кетонал (40 мг/кг интратуморально перед процедурой локальной гипертермии).

**Результаты.** *In vitro* нагрев до 50 °С в течение 13 мин привел к гибели 16% клеток. Этанол дозозависимо усиливал эффект гипертермии.

*In vivo* введение в опухоль этанола или суспензии наночастиц привело к торможению опухолевого роста на 37–82% на 7–32 сутки и полному регрессу опухоли у 10–13% животных. Кетонал не повлиял на опухолевый рост, метотрексат и его комбинированное применение с кетоналом тормозили рост опухолей на 21–58%, полных регрессов опухоли не отмечено. Локальная гипертермия способствовала торможению опухолевого роста на 42–99% и полному регрессу опухолей у 54% мышей. Комбинированное применение метотрексата и локальной гипертермии привело к торможению роста опухоли на 3–95% и к регрессу опухоли у 43% животных, кетонала и локальной гипертермии – к торможению роста опухоли на 37–99% и к регрессу опухоли у 78% животных, метотрексата, кетонала и локальной гипертермии – к торможению роста опухоли на 12–99% и регрессу опухолей у 50% животных.

**Заключение.** Локальная гипертермия с использованием ферромагнитных наночастиц в режиме нагрева до 50 °С способствует регрессу опухолей у 54% мышей

– носителей карциномы Эрлиха. Интратуморальное введение кетонала вызывает тенденцию к увеличению доли животных с полным регрессом опухолей до 78%, метотрексат не влияет на эффект гипертермии и нивелирует вызванную кетоналом тенденцию к усилению ее противоопухолевого действия.

### **Библиографические ссылки**

1. Magnetic hyperthermia with hard-magnetic nanoparticles: *in vivo* feasibility of clinically relevant chemically enhanced tumor ablation / В. Е. Kashevsky [et al.] // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 2019. Vol. 475. P. 216–222.

# СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФУЛЛЕРЕНОВ

Д. С. Улосевич, О. Н. Ринейская, Е. М. Ермоленко

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

Фуллерены привлекают внимание исследователей в области медицинской и биологической химии в связи с особым строением и свойствами. Уникальная структура углеродного каркаса обеспечивает присоединение свободных радикалов и, следовательно, антиоксидантные свойства, что в сочетании с огромными возможностями для дериватизации делает их потенциальными терапевтическими агентами [1, 2]. Особый интерес представляют фуллерены, функционализированные гидрофильными группами [3], введение которых повышает их растворимость в воде и расширяет возможности использования в медицине.

Целью данного исследования явилась сравнительная оценка антиоксидантной активности (АОА) ряда водорастворимых фуллеренов:  $C_{60}(OH)_{24}$ ,  $C_{60}$ Декстрин ( $C_{60}D$ ),  $C_{60}$ Поливинилпирролидон ( $C_{60}ПВП$ ) в сравнении с аскорбиновой кислотой.

Для оценки АОА использовали методику, основанную на ингибировании автоокисления адреналина в щелочной среде при длинах волн: 347 нм, 480 нм. В данном исследовании спектрофотометрически определялась скорость реакции по изменению оптической плотности накапливающегося промежуточного продукта автоокисления адреналина – адренохрома при длине волны 347 нм и конечного продукта автоокисления адреналина – адренолютина при длине волны 480 нм. АОА определяли по формуле  $АОА = (D_{\lambda(\text{контроль})} - D_{\lambda(\text{опыт})}) / D_{\lambda(\text{контроль})} \times 100\%$ .

Расчет АОА показал, что  $C_{60}(OH)_{24}$  (АОА=77%) и  $C_{60}D$  (АОА=56,7%) обладают более высокой АОА, чем аскорбиновая кислота (АОА=40%). В то время как фуллерен  $C_{60}ПВП$  (АОА=37,5%) также обладает антиоксидантной активностью, но более низкой по сравнению с другими исследуемыми веществами. Исследование при длине волны 480 нм показало, что нарастание оптической плотности за первые минуты у  $C_{60}(OH)_{24}$  и  $C_{60}D$  происходит медленнее, чем у аскорбиновой кислоты и  $C_{60}ПВП$ , что подтверждает измерения при длине волны 347 нм.

Таким образом было установлено, что все исследуемые водорастворимые фуллерены обладают АОА (величина АОА более 10% свидетельствует о наличии АОА). При этом  $C_{60}(OH)_{24}$  проявляет более высокую антиоксидантную активность по сравнению с  $C_{60}D$  и  $C_{60}ПВП$ , а также аскорбиновой кислотой. Это может быть следствием способности свободных радикалов хорошо адсорбироваться и концентрироваться в слое гидратной оболочки фуллерена, где высока вероятность взаимной рекомбинации свободных радикалов с последующим образованием нейтральных молекул [4].

## Библиографические ссылки

1. Application of carbon nano onions in the biomedical field: recent advances and challenges / A. Jyoti [et al.] // *Biomater. Sci.* 2021. Vol. 9. P. 626.
2. *Bhakta P., Barthunia B.* Fullerene and its applications: A review // *Journal of indian academy of oral medicine and radiology.* 2020. Vol. 32, iss. 2. P. 159–163.
3. Water-soluble fullerene monoderivatives for biomedical applications / B. Rohin [et al.] // *ChemMedChem.* 2023. Vol. 18. iss. 20.
4. Antioxidant properties of fulleranol  $C_{60}(OH)_{24}$  in rat kidneys, testes, and lungs treated with doxorubicin / B. Srdjenovic [et al.] // *Toxicology mechanisms and methods.* 2010. Vol. 20, iss. 6. P. 298–305.

## ВЛИЯНИЕ ДЗЕТА-ПОТЕНЦИАЛА И ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ОБОЛОЧКИ НАНОЧАСТИЦ НА ИХ СВЯЗЫВАНИЕ С КЛЕТКАМИ

Т. Л. Янченко<sup>1</sup>, Т. И. Терпинская<sup>1</sup>, М. В. Артемьев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>НИИ физико-химических проблем БГУ, Минск, Республика Беларусь

Наночастицы приобретают все большее значение в биологии и медицине как носители для лекарственных и диагностических средств. Исходя из этого, актуальным является выявление факторов, обуславливающих интенсивность связывания наночастиц с клетками.

Целью данного исследования было изучить влияние дзета-потенциала и химического состава оболочки наночастиц на их взаимодействие с клетками.

В работе использовали полупроводниковые наночастицы – квантовые точки (QD – quantum dots) в полимерной оболочке, содержащей различные по химическому составу группы. Для выявления влияния дзета-потенциала наночастиц на их связывание с клетками использовали 4 вида QD с различным соотношением отрицательных карбоксильных и положительных четвертичных аммонийных групп. Это определяло различный дзета-потенциал наночастиц, который варьировал от –33 до +22 мВ. Для исследования влияния химического состава оболочки наночастиц на связывание с клетками использовали два вида QD, сходных по дзета-потенциалу (+5 мВ), но отличающихся по химическому составу отрицательно заряженных групп, представляющих собой карбоксильные или сульфонатные группы. Опыты проводили на клетках культивируемых линий HeLa, U937 и глиомы С6. Связывание наночастиц с клетками оценивали методом проточной цитофлуориметрии.

Показано, что при 30-минутной инкубации в фосфатном буфере (ФБ) клетки по-разному связывались с QD, характеризующимися различным дзета-потенциалом. Клетки U937 и С6 наиболее интенсивно взаимодействовали с наночастицами, несущими в оболочке положительные и отрицательные группы в соотношении ~ 1:1 (дзета-потенциал +13 мВ), менее интенсивно – с наночастицами, несущими в оболочке только положительно заряженные группы. Клетки HeLa наиболее интенсивно взаимодействовали с наночастицами, несущими только отрицательно заряженные группы, менее интенсивно – с наночастицами, несущими в оболочке положительные и отрицательные группы в соотношении ~ 1:1. С другими типами наночастиц клетки связывались слабо.

Результаты исследования роли химического состава оболочки показали, что при 30-минутной инкубации в ФБ наблюдалась тенденция к усилению связывания клеток глиомы С6 с QD, содержащими сульфонатные группы по сравнению с QD, содержащими карбоксильные группы. При 24-часовом культивировании в среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) не было выявлено разницы в интенсивности связывания клеток с QD, содержащими карбоксильные или сульфонатные группы. В опытах с клетками HeLa были получены аналогичные результаты. Исследование физико-химических свойств QD обоих типов показало, что в среде DMEM с 10% ЭТС наночастицы приобретают отрицательный дзета-потенциал, составляющий –9 мВ, вероятно, вследствие формирования «коронь» из компонентов среды культивирования.

Вывод. Интенсивность связывания клеток с наночастицами зависит от их дзета-потенциала. Изменения в соотношении химических групп, приводящие к изменению дзета-потенциала наночастиц, значительно изменяют интенсивность их взаимодействия с клетками. Изменения химического состава оболочки, не приводящие к изменению дзета-потенциала наночастиц, слабо влияют или не влияют на интенсивность их связывания с клетками.

## ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ НА СВЕТОЗАВИСИМЫЕ РЕАКЦИИ УСТЬИЦ *PISUM ARVENSE* L.

**Ш. Яцзин, Н. Л. Пшибытко, В. В. Демидчик**

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Применение нанотехнологий в сельском хозяйстве увеличивается с каждым годом. Традиционные крупнотоннажные удобрения уступают место нанодоброениям из-за высокой стоимости и возможного вредного воздействия на окружающую среду. Это способствует поиску экологически чистых удобрений или «умных» удобрений с высокой эффективностью. Особое внимание уделяется наночастицам оксидов металлов, особенно CuO. Медь широко распространена в тканях растений, является важным микроэлементом для роста и участвует во многих физиологических процессах. Вопрос о возможных способах проникновения наночастиц в растительный организм, а также механизмах их дальнейшего перемещения по тканям и клеткам растений является на сегодняшний день наиболее спорным. Основным способом проникновения наночастиц через листья рассматривают устьица. Поэтому аппертура устьиц, а также их способность открываться и закрываться определяет реакцию растений на обработку наночастицами, а также способность растительных организмов адаптироваться к изменяющимся условиям среды, адаптировать водный обмен и фотосинтетическую активность.

Целью данной работы являлось исследование влияния наночастиц оксида меди на функционирование устьичного аппарата *Pisum arvense* L. Состояние устьичного аппарата анализировалось через 1–24 ч после обработки (путем опрыскивания) наночастицами CuO (0,1; 1; 10; 100; 1000 мг/мл) сферической формы размером 40–50 нм с использованием инвертированного микроскопа Nikon Diaphot TMD (x400) при слабом освещении ( $\sim 40$  мкмоль квантов  $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ ). Для максимального открытия устьиц использовалось освещение ( $\sim 1\,000$  мкмоль квантов  $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ ) от источника однородного холодного света Zeiss KL 1500 LCD (цветовая температура освещения 2900 K) в течение 20 минут. Показано, что ширина устьичной щели растений гороха полевого при слабом освещении увеличивалась на  $56,7 \pm 5,4\%$  через час после обработки раствором наночастиц CuO, а затем постепенно уменьшалась. Повышение концентрации наночастиц CuO усиливало ингибирующий эффект обработки. Скорость светового открытия устьиц в контрольных растениях гороха полевого составляла  $14,5 \pm 0,7$  устьиц/мин. Через час после обработки растений суспензией наночастиц оксида меди (0,1 мг/мл) данный показатель снижался на  $20,1 \pm 3,8\%$ . Ингибирующий эффект наночастиц сохранялся в течение суток. Обработка высокими концентрациями наночастицами CuO (1000 мг/мл) оказывала более выраженный и более длительный эффект. В этом случае уже через час после обработки растений наночастицами скорость светового открытия устьиц составляла  $6,3 \pm 0,4$  устьиц/мин, что составляло  $43,4 \pm 4,1\%$  от уровня контрольного варианта.

На основании полученных данных можно заключить, что наночастицы CuO оказывают негативное влияние на работу устьичного аппарата гороха полевого, снижая аппертуру устьиц и замедляя их световое открытие, тем самым нарушая нормальный процесс транспирации и газообмена.

Работа выполнена в рамках задания № ГР 20211705.

## **ФОТОСИНТЕЗ И ФОТОБИОЛОГИЯ**

# PHOTOINDUCED ELECTRON TRANSFER IN NANOASSEMBLIES CONTAINING PORPHYRIN MACROCYCLES: PATHWAYS AND MECHANISMS

**E. I. Zenkevich<sup>1,2</sup>, C. von Borczyskowski<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Belarussian National Technical University, Minsk, Belarus*

<sup>2</sup>*Research Center for Materials, Architectures and Integration of Nanomembranes, Chemnitz University of Technology, Chemnitz, Germany*

<sup>3</sup>*Institute of Physics, Chemnitz University of Technology, Chemnitz, Germany*

Today it is well documented that tetrapyrrole macrocycles displaying an impressive variety of electronic and optical properties, connected partly with various central metals, are considered as pigments of life in nature, performing different functions in living systems depending on the bound metal ion. Thus, it's not surprising that a huge range of tetrapyrrole compounds as well multiporphyrin arrays has been investigated, with the goal of synthesizing efficient bioinspired molecular systems for light harvesting (energy transfer events), charge separation (photoinduced electron/hole transfer), photocatalytic processes, nanoelectronics and biomedicine. It was evidently shown that self-assembly is promising for construction of a wide variety of multiporphyrin nanoassemblies, whose 1D/2D/3D structures are typically relevant to their functions. In-depth understanding of their structure-function correlations is essential for rational design and development of functional multiporphyrin nanoassemblies. Given the potential applications and the need for better theoretical frameworks, the design and construction of novel multiporphyrin architectures by self-assembly and self-organization continues to be an active research area.

Here, taking into account our recent results (including experimental findings and theoretical calculations we would like to present quantitative comprehensive analysis of the reasons of luminescence quenching due to competing non-radiative relaxation processes paying an especial attention to the analysis of some peculiarities of photoinduced electron transfer (PET) presumably. Using the combination of spectral static and time-resolved experimental data together with theoretical calculations in the frames of the corresponding models, the dynamics of competing non-radiative relaxation processes was quantitatively studied for various nanoassemblies containing porphyrin macrocycles (meso-nitro-phenyl-octaethylporphyrins and their chemical dimers; Zn-porphyrin chemical dimers covalently linked with electron acceptor of non-porphyrin nature; self-assembled porphyrin triads with covalently linked electron acceptors) upon variation of properties of surrounding. Especial attention was paid to the analysis of some peculiarities of the photoinduced electron transfer (PET) in few unusual and rare cases: i) the direct PET "through-space" mechanism, with participation of  $S_1$  and  $T_1$  states in the conditions of strong steric interactions between bulky  $C_2H_5$  substituents in  $\beta$ -positions of pyrrole rings and  $NO_2$  group; ii) the competition of PET and energy migration in Zn-porphyrin chemical dimers with covalently linked electron acceptor; iii) in self-assembled porphyrin triads, the extra-ligand  $S_1$  state quenching via hole transfer "extra-ligand  $\rightarrow$  dimer" followed by the efficient formation of the locally excited  $T_1$  state of porphyrin free base; iv) realization of low-temperature PET in triads containing fluorinated porphyrin as electron acceptor; v) the extra-ligand  $S_1$  state quenching via long-range superexchange PET to covalently linked electron acceptor in triads.

The issues raised herein seem to be of interest in research concerning the development and studies of synthetic multiporphyrin arrays modelling light-harvesting and charge-transfer phenomena *in vivo* as well as for the rational design and application of multimolecular devices for nanophotonics and nanoelectronics.

This work was supported by BSPSR program “Photonics and Electronics for Innovations (Belarus, 2021–2025)”, European Union Grant Agreement 732482 (Bio4Comp 2021 in the framework of a Training Period, and Visiting Scholar Program of TU Chemnitz, Germany (2020–2021)).

# SINGLET OXYGEN GENERATION BY NANOASSEMBLIES CONTAINING PORPHYRIN MACROCYCLES: STERIC AND SCREENING EFFECTS, ENERGY TRANSFER AND COMPETING PROCESSES

**E. I. Zenkevich<sup>1,2</sup>, M. V. Parkhats<sup>3</sup>, B. M. Dzhagarov<sup>3</sup>, C. von Borczyskowski<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>*Belarussian National Technical University, Minsk, Belarus*

<sup>2</sup>*Research Center for Materials, Architectures and Integration of Nanomembranes, Chemnitz University of Technology, Chemnitz, Germany*

<sup>3</sup>*B.I. Stepanov Institute of Physics, National Acad. Sci. Of Belarus, Minsk, Belarus*

<sup>4</sup>*Institute of Physics, Chemnitz University of Technology, Chemnitz, Germany*

To date, it is well documented that molecular oxygen, O<sub>2</sub>, being a unique and fascinating molecule plays the significant role in many processes occurring on earth. Correspondingly, the study of oxygen and oxygen-dependent processes continues to be of scientific and practical interest. Especially within last fifty years and up to now the related scientific activity was connected with the photo-induced generation of cytotoxic forms of O<sub>2</sub>, investigation of their emission, photophysical and redox properties as well as to search their practical applications.

Here, we discuss some principal aspects which should be taken into account upon quantitative analysis of the interaction with O<sub>2</sub> and the singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub> or <sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) generation by various tetrapyrrolic photosensitizers (including monomers, chemical dimers, triads, pentads and organic-inorganic nanoassemblies). In all cases, the direct experimental measurements of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> emission at λ<sub>max</sub>=1.27 μm need to be corrected to the solvent influence (refractive indexes, molecular polarizability) on the rate constant of the radiative transition <sup>1</sup>Δ<sub>g</sub> → <sup>3</sup>Σ<sub>g</sub><sup>-</sup> in a <sup>1</sup>O<sub>2</sub> molecule. For porphyrin and chlorin chemical dimers, T<sub>1</sub> states quenching by O<sub>2</sub> followed by <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generation depends on donor-acceptor interactions between the dimer halves, extra-ligation effects as well as on the spacer flexibility. In the case of self-assembled triads and pentads containing Zn-porphyrin dimers and pyridyl substituted porphyrin free bases (H<sub>2</sub>P) as extra-ligands, quenching rate constants of H<sub>2</sub>P T<sub>1</sub> states by O<sub>2</sub> are smaller compared to those found for individual monomeric H<sub>2</sub>P molecules which is explained by the spatial screening influence of a strongly quenched Zn-porphyrin dimer in multiporphyrin complexes. Finally, at 293 K for nanoassemblies of two types (semiconductor quantum dots CdSe/ZnS + coordinative linked tetra-pyridyl porphyrins, and semiconductor negatively charged quantum dots AgInS/ZnS + positively charged porphyrin molecules) it was quantitatively shown that non-radiative energy transfer FRET quantum dot→porphyrin (competing with electron tunneling under conditions of quantum confinement) is only responsible for the singlet oxygen <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generation by nanoassemblies.

These studies demonstrate that the combination of experimental techniques and molecular-level insight into quantum dot (QD) morphology may increase our molecular-level understanding of the surface chemistry and photophysical events in QD-porphyrin nanoassemblies. In addition, the attachment of photoactive porphyrin macrocycles with biocompatible water-soluble AIS/ZnS/GSH QDs may solve such urgent problems in the photodynamic therapy (PDT) as the photosensitizer toxicity, undesirable aggregation, prolonged release and also developing new carriers for safe photosensitizer delivery to the target site. AIS/ZnS/GSH QDs contain no toxic elements, have excellent optical and

electronic properties (depending on pH and local polarity), and can be applied in cancer diagnosis and PDT Basic results being obtained and discussed here, may be useful in the directed formation of new nanoscale organic-inorganic building blocks and offer significant advantages in a wide areas of applications including the photodynamic therapy.

This work was supported by BSPSR program “Photonics and Electronics for Innovations (Belarus, 2021-2025)” (Projects 1.8 and 2.1) and Visiting Scholar Program of TU Chemnitz, Germany (2020-2021).

## ЗАВИСИМОСТЬ ПРЯМОЙ И ОБРАТНОЙ ФОТОКОНВЕРСИИ ФИТОХРОМА В ОТ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ КОГЕРЕНТНОСТИ СВЕТА

А. В. Будаговский<sup>1,2</sup>, О. Н. Будаговская<sup>1,2</sup>, И. А. Будаговский<sup>3</sup>, Н. В. Соловых<sup>2</sup>,  
М. Б. Янковская<sup>2</sup>, М. Л. Дубровский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Мичуринский ГАУ», Мичуринск, Тамбовская обл., Россия

<sup>2</sup>ФГБНУ «ФНЦ им.И.В.Мичурина», Мичуринск, Тамбовская обл., Россия

<sup>3</sup>ФГБНУ «ФИАН им. П.Н. Лебедева», Москва, Россия

Свойства световых волн, необходимые для возбуждения фоторегуляторных реакций, хорошо изучены, за исключением когерентности. О возможности её влияния на биологические процессы идёт дискуссия в течение последних 40 лет. Наиболее популярной является отрицательная точка зрения, основанная на сходстве стимуляционных эффектов, индуцированных лазерным (когерентным) излучением и любым другим (тепловым, газоразрядным, светодиодным) с таким же спектральным максимумом, которое безосновательно отнесли к некогерентному [1, 2]. В природе все физические поля обладают вполне определенной, хотя и существенно различающейся корреляцией фаз волнового фронта, т.е., когерентностью. Корректно судить о биологическом значении этого свойства излучения можно только перейдя к количественным оценкам, например, определив длину когерентности  $L_{coh}$  и радиус корреляции  $r_{cor}$  поля. Ранее по такой методике нами были проведены эксперименты, в которых применили тепловой источник с системой пространственных и частотных фильтров. С их помощью формировали световые пучки в спектральных диапазонах прямой и обратной фотоконверсии фитохрома В и с заданной пространственно-временной когерентностью. При этом устанавливали два уровня  $L_{coh}$  и  $r_{cor}$ , различающиеся в 5–10 раз. Для опытов использовали различные виды бактерий, грибов и растений. Их фотоиндуцированная реакция существенно зависела от временной и от пространственной когерентности, и эта закономерность проявлялась как при прямой, так и при обратной фотоконверсии фитохрома [3, 4]. Наибольший эффект имел место, когда клетки полностью помещались в объёме когерентности поля светового пучка, т.е. при выполнении соотношения  $L_{coh}, r_{cor} \geq D$ , где  $D$  – размер клеток. В этом случае различия с необлучённым вариантом опыта могли достигать полутора – двух раз.

В представляемой работе исследовали влияние величины радиуса корреляции красного и дальнекрасного света на ростовую реакцию микропобегов ежевики *in vitro*. Радиус корреляции  $r_{cor}$  изменяли в диапазоне от 6 до 36 мкм с шагом 6 мкм. По мере увеличения  $r_{cor}$  в границах варьирования размеров клеток, фотоиндуцированный эффект (стимуляция или ингибирование) монотонно возрастал. Дальнейшее увеличение радиуса корреляции не влияло на ростовые показатели микропобегов. Данный результат свидетельствует о наличии биологически обусловленного порога дискриминации статистических свойств излучения. Величина порога определяется размером клетки.

### Библиографические ссылки

1. Лобко В. В., Кару Т. Й., Летохов В. С. Существенна ли когерентность низкоинтенсивного лазерного света при его воздействии на биологические объекты // Биофизика. 1985. Т. 30, № 2. С. 366–371.
2. *Smith K. C.* Laser (and LED) therapy is phototherapy // *Photomedicine and laser therapy*. 2005. Vol. 23, iss. 1. P. 78–80.
3. Effect of spatial coherence of light on the photoregulation processes in cells / A. V. Budagovsky [et al.] // *Phys. Rev. E*. 2016. Vol. 94, iss. 1. P. 012411.
4. Influence of far-red light coherence on the functional state of plants / A. V. Budagovsky [et al.] // *Phys. Rev. E*. 2021. Vol. 103, iss. 1. P. 012411.

## ОЦЕНКА СВЕТОВЫХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ В ПРОРОСТКАХ *HORDEUM VULGARE* ПРИ СОВМЕСТНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ *FUSARIUM CULMORUM* И ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

А. В. Вачинская, А. А. Русакович, Н. Л. Пшибытко

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь*

Грибы рода *Fusarium Link* относятся по способу питания к факультативным паразитам, которые способны поражать растения, начиная с момента прорастания зерновок и до конца их вегетации, вызывать как корневые гнили, так и фузариоз колоса. На территории Республики Беларусь обнаружена их высокая вредоносность в посевах пшеницы, ячменя, ржи. Степень поражения болезнями варьирует в зависимости от погодных условий и обуславливает потери урожайности растений. Целью данной работы являлся анализ световых реакций фотосинтеза, важнейшего биоэнергетического процесса, обуславливающего продуктивность растений, в проростках *Hordeum vulgare* при заражении *Fusarium culmorum* и воздействии повышенной температуры.

С использованием 3D Imaging-PAM (Walz, Германия) показано, что заражение 7-дневных проростков *Hordeum vulgare L.* инокулятом *Fusarium culmorum* приводило к появлению на листовых пластинках очагов с повышенным уровнем флуоресценции хлорофилла, в которых далее развивался некроз. В то же время параметры флуоресценции хлорофилла, регистрируемые на площади 1 см<sup>2</sup> в средней части первого листа с помощью Junior-PAM флуориметра, не претерпевали изменений. Совместное воздействие стрессовых факторов (повышенной температуры (40 °С, 3 ч, ежедневно в течение 4 дней) и заражение *Fusarium culmorum*) ускоряло развитие трахеомикозного увядания, а также подавляло фотосинтетическую активность *Hordeum vulgare L.*, что выражалось в снижении эффективного квантового выхода фотохимических реакций ФС2 в *Hordeum vulgare L.* на третьи сутки ежедневной обработки, подавлении нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла NPQ за счет его светоиндуцированного компонента Y(NPQ) и повышении нерегулируемого нефотохимического тушения Y(NO) после однократной обработки.

## РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ СТИМУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ БИОВОДОРОДА КЛЕТКАМИ *PARACHLORELLA KESSLERI*

М. С. Вечерек<sup>1</sup>, М. А. Мыслейко<sup>1</sup>, А. С. Савицкий<sup>1</sup>, В. С. Мацкевич<sup>1</sup>,  
А. И. Соколик<sup>1</sup>, Т. В. Самович<sup>4</sup>, Н. В. Козел<sup>3,5</sup>, Дж. Г. Маноян<sup>2</sup>, Л. С. Габриелян<sup>2</sup>,  
А. О. Муравицкая<sup>1</sup>, В. В. Демидчик<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

<sup>3</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>4</sup>Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск,  
Беларусь

<sup>5</sup>КФХ «Серебряный ручей», Минск, Беларусь

Микроводоросли, благодаря наличию фермента гидрогеназы, способны продуцировать молекулярный водород в ходе явления «биофотоллиза». Различают два механизма биофотоллиза – так-называемые прямой и непрямой биофотоллиз. При прямом биофотоллизе электроны поступают в результате окисления кислорода от воды, а для непрямого биофотоллиза характерно поступление электронов в результате окисления эндогенных или экзогенных органических субстратов. Индукция гидрогеназ происходит в результате длительного анаэробноза. Для скорейшего наступления анаэробноза применяется метод культивирования клеток микроводорослей на средах лишённых основных элементов минерального питания (N, P, K или S). Подобное культивирование приводит к дисбалансу между фотосинтетической продукцией кислорода и дыханием с последующим наступлением анаэробноза. Чувствительность гидрогеназы к O<sub>2</sub> является ключевым недостатком метода, требуя, использования закрытых систем для получения биоводорода (фотобиореакторов) и центрифугирования для замены среды, что приводит к его высокой стоимости. В связи с этим, на сегодняшний день, биофотоллиз рассматривается как один из этапов многостадийных замкнутых процессов, позволяющих получить дополнительные количества биоводорода, липидов или метана в ходе последующей переработки. Целью данной работы являлась характеристика культуры зеленой микроводоросли *Parachlorella kessleri*, продуцирующей биоводород, для установления потенциальной возможности использования данного вида в многостадийных процессах и разработки методов стимуляции продукции биоводорода. Опыты проводились на среде TAP. В ходе проведенных исследований был проанализирован рост культуры *Parachlorella kessleri* при продукции биоводорода. Удельная скорость роста культур клеток, продуцирующих биоводород, уменьшалась в ряду контроль, среда без азота, среда без серы с заменой меди на кальций. Пики накопления биоводорода были зафиксированы на 6 сут анаэробного культивирования для среды без N (7,43±2,59 ммоль/г сухой массы) и на 2 сутки для среды без S с заменой Cu на Ca (10,46±4,92 ммоль/г сухой массы). Концентрация общего белка в данных культурах росла на контрольной среде до 357,18% от изначального значения, на средах без N и без S с заменой Cu на Ca наблюдался рост до 125,31% и 195,16%, соответственно, относительно изначального показателя. Высокий выход H<sub>2</sub> и белка, обнаруженный при депривации N, S с заменой Cu на Ca, указывает на потенциальную возможность использования данных условий для производства биоводорода и одновременно белка. Также в рамках данного исследования была разработана закрытая система регистрации окислительно-восстановительного потенциала.

## ИЗОМЕРЫ КАРОТИНОИДОВ В ТИЛАКОИДНЫХ МЕМБРАНАХ ЦИАНОБАКТЕРИИ *ARTHROSPIRA PLATENSIS*

**Ю. Л. Вечтомова<sup>1</sup>, Т. А. Телегина<sup>1</sup>, А. В. Айбуш<sup>2</sup>, М. С. Крицкий<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,  
Москва, Россия

В тилакоидных мембранах фотосинтетических организмов наряду с суперсемейством хлорофилл-связывающих белков светособирающих комплексов (ЛНС) и реакционного центра, присутствуют низкомолекулярные ЛНС-подобные белки. В цианобактериях, являющихся эволюционными предшественниками хлоропластов, эти белки называются SCP (small Cab-like proteins, малые хлорофилл-связывающие белки). Эти белки являются односпиральными мембранными низкомолекулярными и, как полагают, могут связывать хлорофилл, каротиноиды и липидные молекулы и участвовать в сборке фотосистемы I и II [1]. Мы полагаем, что такая структурирующая роль каротиноид-белковых комплексов может быть связана с *cis*-конфигурацией каротиноидов, присутствующих в тилакоидных мембранах [2].

С целью выяснения наличия *cis*-изомеров каротиноидов в фотосинтетическом аппарате был разработан метод получения каротиноид-белковых комплексов из тилакоидов цианобактерии *Arthrospira planensis* (спирулина) с использованием ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте водного раствора сахарозы. Солюбилизованные с помощью детергента *n*-додецил- $\beta$ -D-мальтозида (DDM) тилакоиды разделились при ультрацентрифугировании на шесть фракций, содержащих хлорофилл-каротиноид-белковые и каротиноид-белковые комплексы.

В целом, методами электронной и колебательной спектроскопии (FTIR), а также комбинационного рассеяния показано наличие в тилакоидных мембранах спирулины каротиноидов в *cis*-конфигурации в составе каротиноид-белковых комплексов. Показано совпадение спектров комбинационного рассеяния для каротиноидов в составе комплексов с теоретическими спектрами *cis*-каротиноидов, полученными методами квантовой химии. Методом КД-спектроскопии показано, что в водных условиях солюбилизованные с помощью DDM детергента каротиноид-белковые комплексы склонны к агрегации, вероятно, за счет агрегации каротиноидной составляющей комплекса.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-74-20155.

### Библиографические ссылки

1. Rochaix J. D., Bassi R. LHC-like proteins involved in stress responses and biogenesis/repair of the photosynthetic apparatus // *Biochem J.* 2019 Vol. 476. P. 581
2. Isomerization of carotenoids in photosynthesis and metabolic adaptation / T. A. Telegina [et al.] // *Biophys Rev.* 2023. Vol. 15. P. 887–906.

## ИММУННЫЙ ОТВЕТ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ В ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *BIPOLARIS SOROKINIANA* SACC. SHOEM.

Т. Н. Виск, Л. Ф. Кабашникова, Г. Е. Савченко

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

Врожденный иммунитет (РТИ) у растений позволяет реагировать на потенциальные патогены, сводя к минимуму затраты энергии, устойчивое снабжение которой обеспечивает фотосинтез, интегрированный в систему защиты. В ряде случаев РТИ эффективно предотвращает заражение растения инфекциями без каких-либо видимых симптомов поражения. Поэтому актуальна проблема ранней диагностики заражения с учетом особенностей конкретного растительного организма и патогена. При этом обычно измеряют такие показатели состояния фотосинтетического аппарата как количество пигментов и функционирование фотосистемы II (ФС2). Известно, что неотъемлемым компонентом защитной программы растения является рассеивание части энергии возбуждения в виде тепла (нефотохимическое тушение,  $q_N$ ), необходимость в котором особенно велика во всех стрессовых ситуациях, когда скорость повреждения ФС2 превышает скорость ее репарации. Последнее практически не учитывается, в частности, из-за совпадения спектральных характеристик фитольных и бесфитольных пигментов в растворах. Нами было исследовано разрушение основного пигмента, ответственного за флуоресценцию, хлорофилла *a* (Хл *a*), по количеству образующегося при его дефитолизации хлорофиллида (Хд) и изменения  $q_N$  после заражения растений гельминтоспориозной корневой гнилью, возбуждаемой *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (*B.S.*).

Исследования проводили на проростках ярового ячменя сорта Рейдер, выращенных в течение разного времени на свету ( $120 \text{ мкмоль м}^{-2}\text{с}^{-1}$  с фотопериодом 16 ч) или в темноте и зараженных *B.S.* Зеленые растения анализировали через 24 или 48 ч после заражения. Этиолированные проростки через 1 сутки после инокуляции *B.S.* перед анализом освещали 6 или 24 ч. Пигменты извлекали ацетоном, а затем отделяли фитольные (Хл *a*) от бесфитольных переводом первых в гексан. Параметры РАМ-флуориметрии регистрировали с помощью системы «DUAL-PAM 100».

Установлено, что заражение зеленых проростков разного возраста (8–12 дней) не вызывало существенных изменений суммарного содержания фитольных и бесфитольных форм Хл *a*. Содержание мембраносвязанного Хл *a* под влиянием *B.S.* снижалось лишь на 12–15%. При этом при заражении наблюдали значительные изменения содержания Хд, менявшиеся с возрастом (увеличение по сравнению с контролями в 4, 15, 1,8 и 1,3 раза в 8-, 9-, 11- и 12-дневных проростках, соответственно). В зеленеющих 6 ч деэтиолированных листьях преобладал Хд *a* (указание на синтез Хл *a*), а сумма фитольных и бесфитольных пигментов при заражении не менялась. После 24 ч зеления уже преобладала фитольная форма, содержание которой мало изменялось при заражении. При этом в зеленеющих деэтиолированных проростках, содержащих гораздо меньше хлорофилла (от 30 до 250 мкг/г св. веса после 6 и 24 ч освещения), чем в контрольных зеленых растениях (600–1200 мкг/г), величина  $q_N$  оставалась близкой к наблюдаемой в зеленых и достоверно не менялась при грибном инфицировании.

Таким образом, в долгосрочной программе защиты от патогена в зеленых растениях ячменя, выращенных при невысокой интенсивности освещения, не выяв-

лено снижение потока энергии возбуждения путем  $qN$  и слабо менялось общее содержание хлорофилловых пигментов. При этом синтезировались защитные белки хитиназа и глюканаза, активизировались ферменты антиоксидантной защиты, но поддерживалось повышенное содержание АФК, возможно, вследствие увеличенного содержания Хд. Полученные результаты являются основой для дальнейшего выяснения механизмов регуляции иммунного ответа в проростках ячменя при патогенезе.

## ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ ДРОЖЖЕВЫМИ БИОАГЕНТАМИ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ЛИСТЬЕВ ВИНОГРАДА

Н. Н. Волынчук<sup>1</sup>, В. И. Лукша<sup>2</sup>, Л. В. Пашкевич<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь

<sup>2</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Микроорганизмы-антагонисты фитопатогенов способны оказывать положительное влияние на комплекс физиолого-биохимических процессов, которые протекают в растительном организме. Выяснение механизмов формирования и функционирования ассоциаций растений и микроорганизмов является одним из актуальных вопросов биологии. Объектом исследования служили виноградные лозы сорта Альфа, произрастающие на плантации Пинского винодельческого завода, обработанные аборигенными дрожжевыми грибами *H. uvarum* и *A. pullulans*. Изоляты дрожжевых грибов были выделены в 2022 году из винограда того же сорта. Идентификация немикелиальных грибов проведена на основании морфологических, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических данных. Полевую обработку растений (6 штук на каждый вариант) проводили водной суспензией штаммов с титром не менее  $10^6$  КОЕ/мл на стадии созревания, веризона (смена цвета ягод) и технической зрелости. Контролем служили растения, не обработанные дрожжевыми грибами. Для экстракции фотосинтетических пигментов использовали навеску листьев (20–30 мг). Хлорофиллы (Хл) и каротиноиды экстрагировали 99,5% ацетоном в трехкратной повторности. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) тестировали по количеству малонового диальдегида. Для определения общего содержания полифенолов использовали метод, основанный на реакции полифенольных соединений с реактивом Фолина-Чокалтеу. Количество пигментов, уровень ПОЛ, содержание полифенолов в экстрактах определяли спектрофотометрически.

Аборигенные немикелиальные грибы обладали высокой антагонистической активностью в отношении двух микопатогенов винограда и других сельскохозяйственных растений – *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г из коллекции микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Обработка винограда культурного (*Vitis vinifera*) аборигенными штаммами дрожжевых грибов оказывала стимулирующее влияние на метаболические процессы, увеличивая содержание фотосинтетических пигментов (Хл *a*, *b* и каротиноидов) в листьях винограда культурного на 33,10%, 13,92% и 28,79% соответственно относительно физиологических условий. Два опытных варианта (монообработка *A. pullulans* и комбинированная обработка двумя штаммами дрожжевых грибов) демонстрировали снижение содержания продуктов ПОЛ от 7,68 до 16,68% по сравнению с контрольными значениями, что указывает на стабилизацию окислительных процессов в липидном бислое клеточных мембран. Неферментативные антиоксиданты, как компоненты антиоксидантной защиты, в наших опытах показали тенденцию к снижению после одиночных вариантов обработки дрожжевыми биоагентами от 11,72 до 15,31%, а при комбинированной – до 24,77%, что говорит о низком уровне окислительных процессов в данных вариантах опыта.

Благодаря влиянию на комплекс физиолого-биохимических процессов, протекающих в растении, использование микроорганизмов-антагонистов является перспективным направлением в повышении продуктивности винограда. Результаты исследования могут быть использованы для разработки приемов рационального применения дрожжевых грибов в практике растениеводства для реализации оптимального продукционного процесса у растений.

## СРАВНЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ДОСИМПТОМНОЙ ДЕТЕКЦИИ ФИТОПАТОГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA BENTHAMIANA*

**А. И. Гришина, А. С. Жаворонкова, М. Н. Агеева, А. А. Брилкина, В. А. Воденев**

*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,  
Нижний Новгород, Россия*

Патогены – серьезная проблема при получении сельскохозяйственной продукции. Их воздействие на растения приводит к большим потерям урожая, как качественным, так и количественным.

Цель данной работы – сравнение оптических методов РАМ-флуориметрии, гиперспектрального имиджинга и тепловидения в детекции фитопатогенов различной природы в растениях *Nicotiana benthamiana*.

Исследования проводились на четырёхнедельных растениях *Nicotiana benthamiana*, в которых наблюдали распространение вируса PVX и бактерии *Pseudomonas syringae*. Для отслеживания распространения PVX по растению, в капсид вируса был вшит белок GFP. В качестве методов обнаружения инфекции применяли РАМ-флуориметрию, гиперспектральный имиджинг и RGB фотографии. Данные получали каждый день в одно и то же время в течение 10 дней с помощью IMAGING-RAM M-Series MINI, PlantExplorerPro+, гиперспектральной камеры Specim IQ и тепловизионной камеры Testo 885. В неинкубированном (10 листе) табака, где с течением времени наблюдали развитие вирусной и бактериальной инфекции регистрировали вызванные инфицированием изменения параметров флуоресценции хлорофилла (максимальный квантовый выход фотосистемы II ( $F_v/F_m$ ), квантовый выход фотосистемы II (YII) и нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ)), спектры отражения в здоровых и инфицированных частях листа и нормализованные отражательные индексы (NRI), а так же температуру в здоровых и инфицированных листьях.

Можно выделить следующие основные различия в эффектах патогенов разных типов на показатели флуоресценции хлорофилла. Вирус PVX оказывает слабый эффект на стационарные показатели флуоресценции хлорофилла в течение длительного времени после инфицирования. Бактерия *P. syringae* оказывает выраженный эффект на стационарные показатели, происходит понижение  $F_v/F_m$  и  $\Phi PSII$ , а также повышение NPQ. Для переходного  $\Phi PSII$  имеют место выраженные отличия от контроля в случае вирусной инфекции. Инфицирование вирусом вызывает усиление отражательной способности в диапазонах длин волн 510–650 нм и 690–720 нм. Отмеченные различия нарастают с увеличением времени после появления вируса в исследуемом листе. Инфицирование бактерией вызывает усиление отражательной способности в диапазонах длин волн 400–500 нм, 560–660 нм, 680–720 нм. В случае бактериальной инфекции необходимо отметить ослабление сигнала в ИК-диапазоне спектра, усиливающееся с увеличением времени после инфицирования. Максимальные различия между патогенами двух типов имеют место для  $NRI_{530-650}$ . Сопоставление методов выявило, что РАМ является более чувствительным методом и с его помощью обнаружить инфекцию можно уже на 1-2 день после прихода патогенов в лист.

Работа выполнена в ходе выполнения проекта НЦМУ «Центр фотоники» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, договор № 075-15-2022-293.

## АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ В ЛИСТЬЯХ ОГУРЦА, СФОРМИРОВАННЫХ ПРИ СВЕТОДИОДНОМ ОСВЕЩЕНИИ И ИНФИЦИРОВАННЫХ ГРИБОМ *FUSARIUM OXISPORUM*

И. Н. Доманская<sup>1</sup>, О. В. Молчан<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Светодиодная технология предлагает значительно улучшенную энергоэффективность освещения, а также контроль над спектральным составом света. Известно, что выращивание растений на красном свете (КС) стимулирует прибавку сухой массы, разрастание корней, стеблей и другие процессы [1], увеличивает содержание хлорофилла, эффективность функционирования ФСII у *A. thaliana* и огурца. Добавление синего света (СС) также оказывает позитивное влияние на развитие растений, а применение в светокультуре КС и СС имеет синергетический эффект, причем оптимальное соотношение КС, дальнего красного света (ДКС) и СС для каждой культуры индивидуально. В этой связи важным условием успешного выращивания огурца в светокультуре является подбор оптимального спектрального состава света.

Растения огурца (*Cucumis sativus*) сорта Кустовы до 25-дневного возраста выращивали под светодиодными лампами с плотностью потока 100 мкмоль квантов/(м<sup>2</sup>·с) при 23 °С в режиме 14 ч света. Вариант КС имел повышенную долю КС в соотношении КС/ДКС=5,0 и КС/СС=4,0. Вариант ДКС характеризовался повышенной долей ДКС (КС/ДКС=2,0) при сохранении на постоянном уровне фотосинтетически активной радиации КС/СС=4,0. В этих вариантах доля СС составила 13,9–14,6% суммарного светового потока. Контролем служил белый свет (БС). Заражение растений грибом *Fusarium oxysporum* sp. (*F.ox.*) проводили суспензией, содержащей 10<sup>-6</sup> спор/мл из расчета 5 мл/1 растение и анализировали через 72 ч после заражения. Антирадикальную активность (АРА) регистрировали спектрофотометрически по изменению кинетики восстановления молекул DPPH спиртовыми экстрактами растений. Суммарное содержание фенольных соединений (Фен) определяли с реактивом Фолина-Чокальтеу.

Наиболее высокую АРА показали образцы из здоровых и инфицированных патогеном листьев огурца, выращенных на ДКС, в которых эта величина составила 125% и 129% соответственно, по отношению к БС. Спиртовой раствор из инфицированных листьев, сформированных на КС, также показал возрастание АРА по сравнению с БС, но в 2 раза меньше, чем на ДКС. Известно, что максимальная величина АРА определяется в растительных экстрактах, содержащих наибольшее количество Фен и флавоноидов, которые выполняют антиоксидантные функции в растительных тканях. Результаты тестирования здоровых растений огурца, выросших на КС и ДКС, показали, что в них синтезируется на 60% больше Фен, чем на БС. В ответ на заражение растения, выращенные на БС и КС, содержали Фен на 20% и 17% больше по сравнению со здоровыми, в то время как освещение ДКС

вызывало их деградацию на 35% относительно своего контроля. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости КС, ДКС и СС для антиоксидантной защиты растений огурца и могут быть использованы для разработки новых методов повышения иммунитета культуры на основе световой регуляции защитных реакций в фотосинтезирующих тканях.

### **Библиографические ссылки**

1. Закурин А. О., Щенникова А. В., Камионская А. М. Светокультура растениеводства защищенного грунта: фотосинтез, фотоморфогенез и перспективы применения светодиодов // Физиология растений. 2020. Т. 67. С. 246–258.

# ВЛИЯНИЕ ГИСТИДИНА НА СОДЕРЖАНИЕ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В ПРОРОСТКАХ ОЗИМОГО РАПСА, ВЫРАЩЕННЫХ НА РАСТВОРЕ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ

А. В. Емельянова, Т. Г. Курьянчик

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

Известно, что 5-аминолевулиновая кислота (АЛК) является ключевым предшественником в биосинтезе всех циклических (хлорофиллы (Хл), гемы, корриноиды) и линейных (билины, фикобилины) тетрапирролов, которые играют центральную роль в метаболизме растительных, животных и бактериальных организмов [1]. Вместе с тем, известно, что обработка высокими концентрациями экзогенной АЛК приводит к увеличению потока атомов углерода, поступающих в систему синтеза тетрапирролов, тем самым вызывая в темноте накопление избыточных количеств предшественников Хл – порфиринов-фотосенсибилизаторов таких, как протохлорофиллид, протопорфирин IX, Mg-протопорфирин IX и его монометилловый эфир, которые при последующем воздействии света генерируют высокореактивный синглетный кислород, высокое содержание которого является одной из причин возникновения фотоокислительного стресса в растениях, приводящего к разрушению структурных компонентов фотосинтетического аппарата, в том числе и фотосинтетических пигментов. В связи с этим, представляло интерес изучить содержание фотосинтетических пигментов хлорофильной природы, а также предшественников биосинтеза Хл – порфиринов-фотосенсибилизаторов, в проростках озимого рапса, выращенных на растворе экзогенной АЛК в концентрации 200 мг/л в присутствии 25 мМ гистидина, который является химической ловушкой (тушителем) для синглетного кислорода.

Установлено, что в проростках озимого рапса, выращенных на растворе экзогенной АЛК, снижалось на 49% содержание Хл *a*, а также уменьшалось на 51% содержание Хл *b* по сравнению с контрольными проростками, выращенными на воде. Вместе с тем, в проростках, выращенных на растворе АЛК, отмечалось двукратное возрастание по сравнению с контролем содержания порфиринов-фотосенсибилизаторов – протопорфирина IX и протохлорофиллида, что свидетельствовало о развитии фотодинамических процессов в проростках озимого рапса под действием экзогенной АЛК. В то же время установлено, что выращивание проростков на растворе АЛК в присутствии гистидина приводило к возрастанию содержания хлорофильных пигментов. Так, содержание Хл *a* возрастало на 45%, а количество Хл *b* – на 48% по сравнению с проростками, выращенными только на растворе экзогенной АЛК. Наряду с этим, показано, что совместное использование раствора АЛК с гистидином приводило к снижению в 1,5 раза содержания порфиринов-фотосенсибилизаторов в таких проростках по сравнению с проростками, выращенными только на растворе экзогенной АЛК.

Таким образом, выращивание проростков озимого рапса на растворе экзогенной АЛК в присутствии гистидина (химической ловушки для синглетного кислорода) снижало развитие АЛК-индуцируемых тетрапиррол-зависимых фотоокислительных процессов, за счет уменьшения содержания порфиринов-фотосенсибилизаторов, что способствовало формированию фотосинтетического аппарата, в частности, возрастанию содержания хлорофильных пигментов.

## Библиографические ссылки

1. Аверина Н. Г., Яронская Е. Б. Биосинтез тетрапирролов в растениях. Минск: Белорусская наука, 2012. – 413 с.

# ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ФТАЛОЦИАНИНОВ НА ИХ АДСОРБЦИЮ И ФОТОДИНАМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НА БИСЛОЙНЫХ МЕМБРАНАХ

Д. Д. Зыкова<sup>1,2</sup>, А. Н. Константинова<sup>1</sup>, Е. К. Уродкова<sup>1</sup>, В. С. Соколов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия*

<sup>2</sup>*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Московская область, г. Долгопрудный, Россия*

Для борьбы с раковыми клетками и патогенными возбудителями инфекций можно использовать фотосенсибилизаторы (ФС), молекулы которых способны не только связываться на поверхности клеточной мембраны, но и проходить на ее противоположную сторону. От этого зависит фотодинамическая эффективность данных соединений, мишенью которого оказываются не только липиды и белки в мембране, но и органеллы внутри клетки. Фотосенсибилизаторы можно изучать на структурах, близких по строению к клеточным мембранам. Исследования в данной области позволят определить связь структурных особенностей молекул ФС с их способностью адсорбироваться на мембране и их фотодинамической эффективностью, что поможет направленной разработке новых и эффективных препаратов для лечения онкологических, предраковых и инфекционных заболеваний.

В работе изучена адсорбция на модельные бислойные липидные мембраны (БЛМ) катионных комплексов фталоцианина (Pc), которые различаются положением (a, b) и количеством (8, 4) боковых групп, а также атомом металла (Zn, Mg, безметалльный комплекс) в центре макрокольца [1]. Их связывание с мембранами из дифитаноилфосфатидил холина изучали с помощью электрических измерений межфазных потенциалов методом компенсации внутримембранного поля (КВП), разработанного сотрудниками ИФХЭ РАН. Фотодинамическую эффективность данных соединений оценивали по кинетике разрушения адсорбированных на БЛМ специальных молекул – мишеней синглетного кислорода при освещении в присутствии комплексов Pc [2].

Изменения граничных потенциалов при адсорбции на БЛМ для всех комплексов Pc имели близкие значения, что говорит о том, что количество и положение заряженных боковых групп и различия в атоме металла в центре макрокольца мало влияют на их адсорбцию на БЛМ. Величины граничных потенциалов значительно превышали ζ-потенциалы, измеренные методом динамического рассеяния света на липосомах. Это свидетельствует, что все соединения адсорбируются на БЛМ с погружением заряженных боковых групп.

Значения скорости разрушения молекул-мишеней для всех соединений были близки, что также указывает на то, что различия в структуре исследуемых Pc мало влияют на их фотодинамические свойства, и в основном определяются их сродством к мембране.

## Библиографические ссылки

1. Robust route toward cationic phthalocyanines through reductive amination / D. A. Bunin [et al.] // *Dyes and Pigments*. 2022. Vol. P. 110768.
2. Voltage-sensitive styryl dyes as singlet oxygen targets on the surface of bilayer lipid membrane / V. S. Sokolov [et al.] // *J Photochem Photobiol B*. 2016. Vol. 161. P. 162.

## ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТОДИОДНЫХ ЛАМП НА РОСТОВЫЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСТЕНИЙ БАЗИЛИКА В УСЛОВИЯХ ЗАКРЫТОЙ СВЕТОКУЛЬТУРЫ

Е. М. Кабачевская<sup>1</sup>, С. В. Суховеева<sup>1</sup>, Ю. В. Трофимов<sup>2</sup>, М. И. Баркун<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>ГП «Центр светодиодных и оптоэлектронных технологий НАН Беларуси», г. Минск, Беларусь

В зоне умеренного климата, в которой находится Беларусь, актуальной является проблема круглогодичного обеспечения населения качественными продуктами питания растительного происхождения, которое возможно лишь при интенсивном развитии тепличного хозяйства. Следует отметить, что растительная продукция, полученная в условиях закрытого грунта, зачастую характеризуется пониженными потребительскими качествами, в том числе определяющими питательные и органолептические свойства растений, по сравнению с растениями, выращенными в естественных условиях. На формирование этих свойств в растительной клетке большое влияние оказывает световой режим выращивания растений. Таким образом, для повышения качества получаемой продукции важен подбор оптимальных световых условий роста растений в контролируемых условиях закрытой светокультуры, в том числе интенсивность используемого света, фотопериод, а также спектральный состав осветительных ламп. Следует отметить, что наиболее эффективный спектр света для стимулирования различных ветвей вторичного метаболизма для большинства цветочных культур до сих пор неизвестен.

Представленное исследование посвящено оценке влияния соотношения отдельных волн в спектре осветительных ламп на основе светодиодов в системах выращивания растений с контролируемой средой на рост, развитие и синтез биологически активных веществ (БАВ) фенольной природы, определяющие пищевые свойства базилика обыкновенного (*Ocimum basilicum*). Изучено влияние на рост и метаболизм базилика двух сортов (с зелеными и фиолетовыми листьями) шести экспериментальных источников света на основе светодиодов с различными спектрами излучения, моделирующими оптическое излучение близкое к солнечному. Изученные спектры различаются по распределению фотонного потока по основным диапазонам спектра излучения, коррелированной цветовой температуре и общему индексу цветопередачи.

Определен характер экспрессии генов, кодирующих важные ферменты синтеза БАВ полифенольной природы (кумарат-КоА-лигаза и эугенолсинтаза) в клетках листьев базилика в зависимости от спектра их выращивания. Выявлены корреляционные связи между основными ростовыми характеристиками растений базилика, содержанием ключевых БАВ, определяющих их органолептические свойства (общее содержанием полифенолов, содержание гидроксикоричных кислот, содержание антоцианов) и такими параметрами экспериментальных светодиодных ламп как цветовая температура, индекс цветопередачи, процентное содержание света тех или иных длин волн в общем спектральном составе ламп. Определено влияние спектрального состава на функциональное состояние фотосинтетического аппарата листьев базилика по параметрам ПАМ-флуориметрии. Среди протестированных экспериментальных светодиодных осветительных приборов выявлены наиболее оптимальные для роста растений базилика и накопления в их тканях БАВ в условиях закрытой светокультуры.

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ОТВЕТ ХЛОРОПЛАСТОВ ОГУРЦА (*CUCUMIS SATIVUS*), СФОРМИРОВАННЫХ ПРИ *LED*-ОСВЕЩЕНИИ, НА ФУЗАРИОЗНОЕ УВЯДАНИЕ

**Л. Ф. Кабашникова<sup>1</sup>, И. Н. Доманская<sup>1</sup>, Л. В. Пашкевич<sup>1</sup>, О. В. Молчан<sup>2</sup>**

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

<sup>2</sup>Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси,  
Минск, Беларусь

Свет определенных длин волн и его продолжительность являются важными факторами внешней среды, используемыми растениями для получения энергии и информации, и влияющими на фотосинтетические и ростовые процессы [1]. Известно, что световые сигналы модулируют также защитные реакции растений в ответ на атаки патогенов [2]. Применяемые в настоящее время светодиодные технологии весьма перспективны для растениеводства и требуют научного обоснования и контроля за качеством *LED*-освещения.

Изучен функциональный ответ хлоропластов огурца в физиологических условиях и при фузариозе, опосредованный светом разного спектрального состава. Растения огурца сорта Кустовы до 25-дневного возраста выращивали при *LED*-освещении с плотностью светового потока 100 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с при 23 °С и 14 ч светопериоде. Вариант «Красный свет» (КС) имел повышенную долю КС – КС/ДКС («Дальний красный свет»)=5,0 и КС/СС («Синий свет»)=4,0. Вариант ДКС характеризовался повышенной долей ДКС (КС/ДКС=2,0) при сохранении на постоянном уровне фотосинтетически активной радиации КС/СС=4,0. В изученных вариантах доля СС составила 13,9–14,6% суммарного светового потока. Растения огурца заражали суспензией гриба *Fusarium oxysporum sp. (F.ox)*, содержащей 10<sup>6</sup> спор/мл из расчета 5 мл/1 растение и анализировали через 72 ч после заражения. Активность фотосистемы (ФС)1 и ФС2 определяли методом РАМ-флуориметрии, позволяющей прижизненно оценить функциональное состояние двух ФС фотосинтеза. Количество пигментов определяли в ацетоновых экстрактах спектрофотометрическим методом.

Зарегистрировано увеличение содержания хлорофиллов (Хл) и каротиноидов в пересчете на сухую массу здоровых листьев при освещении КС и ДКС по сравнению с «Белым светом (БС), что может быть связано со стимуляцией биосинтеза этих пигментов. Фузариозное заражение привело к снижению фракций Хл *a*, Хл *b* и их суммы Хл (*a+b*) в вариантах БС и ДКС, но к увеличению пигментного фонда на 25% в варианте КС по сравнению с соответствующими контролями. Преобладание КС и ДКС способствовало увеличению эффективности функционирования ФС1 и ФС2, и, особенно, скорости транспорта электронов (ETR(I) и ETR(II)) на 30 и 70% соответственно, в здоровых растениях по сравнению с БС. Хлоропласты огурца на КС имели более эффективный квантовый выход ФС2 (Y(II)), чем на БС и ДКС. Фузариоз вызывал снижение показателей ETR(I) и ETR(II) при выращивании растений на КС, но не на БС и ДКС и активировал дополнительные диссипационные механизмы на КС в листьях огурца при атаке патогеном. Одновременно с изменениями активности хлоропластов, при фузариозе изменялся окислительный статус клеток мезофилла листа. Содержание продуктов перекисного окисления липидов резко возрастало (на 40%) в инфицированных растениях, выросших на БС, на 20% – на КС, и оставалось неизменным на ДКС. В целом, установлены различные механизмы ответа хлоропластов огурца на заражение *F.ox* в зависимости от условий *LED*-освещения, которые могут быть использованы для разработки технологий выращивания растений огурца в тепличных хозяйствах.

### **Библиографические ссылки**

1. Effect of duration of LED lighting on growth, photosynthesis and respiration in lettuce / L. Yudina [et al.] // *Plants*. 2023. Vol. 12, iss. 3. P. 442.
2. *Fernandez-Milmanda G. L., Crocco C. D., Reichelt M.* A light-dependent molecular link between competition cues and defense responses in plants // *Nat. Plants*. 2020. Vol. 6. P. 223–230.

# АРОМАТИЧНОСТЬ И $\pi$ -СОПРЯЖЕНИЕ NH-ТАУТОМЕРОВ СВОБОДНЫХ ОСНОВАНИЙ КОРРОЛОВ С РАЗЛИЧНОЙ АРХИТЕКТУРОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ЗАМЕЩЕНИЯ

Д. В. Кленецкий<sup>1</sup>, А. Б. Крылов<sup>1</sup>, И. В. Вершиловская<sup>1</sup>, Л. Л. Гладков<sup>2</sup>,  
Н. Н. Крук<sup>1</sup>

<sup>1</sup>УО «Белорусский государственный технологический университет», Минск,  
Беларусь

<sup>2</sup>УО «Белорусская государственная академия связи», Минск, Беларусь

Корролы относятся к группе сокращенных тетрапиррольных соединений у которых четыре пиррольных кольца, соединены между собой тремя метиновыми мостиками и одной  $C_{\alpha}-C_{\alpha}$  связью. Подобно порфиринам, корролы являются ароматическими соединениями. Даже при отсутствии периферических заместителей, сокращение размеров ядра макроцикла корролов и наличие трех протонов в ядре приводит к тому, что формируется непланарная конформация макроцикла. Причем архитектура замещения и тип периферических заместителей могут сильно влиять на конформацию молекулы.

В настоящей работе изучено влияние периферического замещения в *мезо*-положениях на молекулярную конформацию корролов и степень их ароматичности. Используя программный пакет для квантово-химических расчетов «Природа» методом функционала плотности (DFT) с обменно-корреляционным функционалом PBE и трехэкспоненциальным базисом  $3z$  нами выполнена оптимизация молекулярной геометрии серии свободных оснований корролов с различной архитектурой периферического замещения. Для оценки степени неплоскостных искажений макроцикла мы использовали параметр  $\Delta_{23}$ , представляющий собой среднее квадратичное отклонение одного макроциклического атома от средней плоскости макроцикла, в качестве которой выбрана плоскость  $7C$  [1], а степень ароматичности оценивали с помощью индекса ароматичности  $I_{\text{НОМА}}$  в рамках модели гармонического осциллятора для ароматичности [2].

Показано, что в случае симметричного периферического замещения формируются два NH-таутомера, различающихся расположением протонов в дипиррометеновом и дипиррольном фрагментах макроцикла, а несимметричное замещение корролов приводит к различной структуре четырех NH-таутомеров. Установлено, что различие в строении заместителей в *мезо*-положениях макроцикла приводит к характерным особенностям как в их молекулярной конформации, так и в степени ароматичности четырех NH-таутомеров. Степень неплоскостных искажений макроцикла зависит от периферических заместителей и различается для всех четырех таутомеров. Величина индекса ароматичности зависит от характера электронной коммуникации между макроциклом и периферическими заместителями, а также степени пирамидализации атомов азота пиррольных колец.

## Библиографические ссылки

1. Molecular structures and absorption spectra assignment of corrole NH tautomers / W. Beenken [et al.] // J. Phys. Chem. A. 2015. Vol. 119. P. 6785–6883.
2. Aromaticity from the viewpoint of molecular geometry: application to planar systems / T. M. Krygowski [et al.] // Chem. Rev. 2014. Vol. 114. P. 6383–6422.

## РОЛЬ N-ЗАМЕЩЕНИЯ В ФОРМИРОВАНИИ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ ПОРФИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

**А. Б. Крылов<sup>1</sup>, Л. Л. Гладков<sup>2</sup>, Д. В. Кленицкий<sup>1</sup>, Н. Н. Крук<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>УО «Белорусский государственный технологический университет», Минск, Беларусь

<sup>2</sup>УО «Белорусская государственная академия связи», Минск, Беларусь

Тетрапиррольные макроциклические соединения, родоначальником которых является порфин H<sub>2</sub>P, играют исключительно важную роль в формировании биосферы нашей планеты, что обуславливает неослабевающий интерес ученых к исследованиям как природных тетрапиррольных соединений, так и синтетических тетрапиррольных макроциклов, число которых постоянно растет. Следует отметить, что синтез новых соединений стимулируется не только развитием новых методов органической химии, но и востребованностью новых молекулярных систем с заданными физико-химическими и спектрально-люминесцентными характеристиками для создания и совершенствования новых материалов и технологий. Поэтому значительная часть фундаментальных исследований макрогетероциклических тетрапиррольных соединений и их аналогов представляет собой исследование взаимосвязей «структура-свойство», которые представляют интерес для решения определенных практических задач [1].

В настоящей работе методами квантовой химии с использованием метода функционала плотности рассчитана конформация молекулы порфина, четырех его N-замещенных производных и двух модельных молекул порфина. Установлено, что при замещении протона в пиррольном фрагменте макроцикла формируются неплоские конформеры. При этом значительный наклон замещаемого пиррольного кольца по отношению к средней плоскости макроцикла сопровождается значительной пирамидализацией атома азота: в порфине H<sub>2</sub>P атом азота имеет *sp*<sup>2</sup> гибридизацию, в H(N-CH<sub>3</sub>)P порфирине показатель степени гибридизации  $\lambda^2$  увеличивается до 2,208, в H(N-CF<sub>3</sub>)P порфирине  $\lambda^2=2,667$ , а в H(N-Cl<sub>3</sub>)P порфирине  $\lambda^2=2,729$ . Молекулярные орбитали макроцикла испытывают существенные сдвиги, величина и направление которых определяются свойствами заместителей. С использованием модели гармонического осциллятора для ароматичности (НОМА) рассчитаны индексы ароматичности *I*<sub>НОМА</sub> макроцикла для аннуленоподобного 18-членного контура сопряжения и 22-членного контура сопряжения Шлейера [2]. Показано, что N-замещение ухудшает сопряжение по внутреннему фрагменту C<sub>a</sub>-N-C<sub>a</sub> пиррольного кольца за счет пирамидализации атома азота, при этом одновременно возрастает индекс ароматичности *I*<sub>НОМА</sub> 18-членного контура  $\pi$ -сопряжения через внешний фрагмент C<sub>a</sub>-C<sub>b</sub>-C<sub>b</sub>-C<sub>a</sub> пиррольного кольца. Показано, что величина индекса ароматичности *I*<sub>НОМА</sub> для каждого из исследованных контуров сопряжения линейно зависит от степени гибридизации пиррольного атома азота. Предложено, что управление гибридизацией атомов посредством замещения в ядре и на периферии тетрапиррольного макроцикла может быть положено в основу способа управления его ароматичностью.

### Библиографические ссылки

1. Крук Н. Н. Структура и оптические свойства тетрапиррольных соединений. Минск: БГТУ, 2019. 216 с.
2. Aromaticity from the viewpoint of molecular geometry: application to planar systems / T. M. Krygowski [et al.] // Chem. Rev. 2014. Vol. 114. P. 6383–6422.

# ВЛИЯНИЕ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТОЙ НА ФОТОХИМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФОТОСИСТЕМ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ ПРИ ДЕФИЦИТЕ ВЛАГИ В ПОЧВЕ

Т. Г. Курьянчик<sup>1</sup>, Н. В. Козел<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>КФХ «Серебряный ручей», Минск, Беларусь

Почвенная засуха является одним из основных факторов внешней среды, ограничивающих продуктивность сельскохозяйственных растений, включая ячмень, за счет изменения ключевых физиолого-биохимических процессов в растительном организме. Засуха отрицательно влияет на скорость фотосинтеза, ограничивая диффузию CO<sub>2</sub> через устьица, и инициирует образование активных форм кислорода (АФК), обладающих высокой реакционной способностью и цитотоксичностью. АФК повреждают фотосинтетический аппарат (ФСА) растительной клетки, что в конечном итоге приводит к снижению урожайности. Целью данной работы являлось изучение влияния прайминга семян 5-аминолевулиновой кислотой (АЛК) на фотосинтетическую активность фотосистемы (ФС) 1 и ФС2 в 7-дневных проростках ячменя сорта Аванс. В качестве объекта исследования в данной работе использовали 7-дневные проростки ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Аванс, выращенные в лабораторных условиях в режиме 14 ч света (интенсивность 6 клк) и 10 ч темноты под люминесцентными лампами Philips TD-36/765 при температуре 23±1 °С и относительной влажности воздуха 35±2% в нормальных условиях (ежедневный полив водопроводной водой) и при засухе (растения не поливали с момента посадки в почву). Предпосевную обработку семян (прайминг) проводили в дистиллированной воде или растворе АЛК в концентрации 10 мг/л в течение 20 часов при температуре 4±2 °С. Фотохимическую активность ФС зеленых проростков ячменя определяли с помощью метода индукции флуоресценции хлорофилла (РАМ-флуориметрии) в сочетании с регистрацией сигнала Р700 (реакционного центра ФС1).

Установлено, что прайминг семян АЛК в условиях засухи приводит к достоверному снижению в среднем на 20% уровня фоновой флуоресценции хлорофилла (F0) и максимального уровня флуоресценции Fm адаптированных к темноте листьев растений ячменя по сравнению с контролем. Такая же тенденция к снижению (в среднем на 11%) зарегистрирована для уровня сигнала Р700 (параметры Pm и Pm'), что, вероятно, связано с адаптивным изменением содержания хлорофилловых пигментов в фотосинтетических мембранах в ответ на почвенную засуху с целью предотвращения фотоповреждения ФСА. Анализ параметров, характеризующих фотохимическую активность ФС – потенциального квантового выхода фотохимии ФС2 Fv/Fm, эффективного квантового выхода фотохимии ФС2 Y(II) и ФС1 Y(I), Y(ND), Y(NA), константы фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла qP, а также скорости транспорта электронов ETR (I/II), не выявил достоверного влияния на них обработки АЛК методом прайминга семян как в условиях засухи, так и при нормальном поливе, что указывает на отсутствие нарушения работы светособирающего комплекса и электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) хлоропластов в условиях действия стресса. Для подтверждения

этого предположения были зарегистрированы световые кривые, отражающие изменение эффективности работы ЭТЦ ФС1 и ФС2 (показатель ETR), в зависимости от интенсивности актиничного света. Анализ световых кривых показал, что даже при крайне высоких интенсивностях актиничного света (вплоть до 830 мкмоль квантов/(м<sup>2</sup>·с)) не наблюдается достоверных различий в скорости транспорта электронов в пределах ФС1 и ФС2 для контрольных и опытных вариантов.

Таким образом, приведенные данные показывают, что прайминг семян АЛК стабилизирует фотохимическую активность ФС листьев ячменя в условиях засухи.

## ПОДКИСЛЕНИЕ СРЕДЫ ВНУТРИ ТИЛАКОИДА ПРИ АКТИВАЦИИ ФОТОСИНТЕЗА ЗАЩИЩАЕТ КИСЛОРОД-ВЫДЕЛЯЮЩИЙ КОМПЛЕКС ФОТОСИСТЕМЫ 2 ОТ ТЕПЛОВОЙ ДЕГРАДАЦИИ

Е. Р. Ловягина, А. В. Локтюшкин, Б. К. Сёмин

*МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия*

Ранее мы обнаружили, что марганцевый кластер кислород-выделяющего комплекса (КВК) фотосистемы 2 (ФС2) более устойчив к действию экзогенных восстановителей в области слабокислого рН (рН 5,7) [1]. При рН 6,5 такие восстановители как гидрохинон, пероксид водорода экстрагируют 3 катиона Мп, тогда как при рН 5,7 только 2. Таким образом, окислительно-восстановительный потенциал одного из катионов Мп в КВК сильно зависит от рН среды, и модуляция рН может повышать устойчивость марганцевого кластера в целом к действию стрессовых факторов. Подобный эффект мы наблюдали в случае фотоингибирования ФС2 [2]. Известно, что Мп-кластер в КВК разрушается при действии интенсивного света, и, возможно, это первый шаг в процессе фотоингибирования. Разрушение марганцевого кластера КВК может быть результатом воздействия на него активных форм кислорода (АФК)  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ , образующихся на донорной и акцепторной сторонах ФС2 при интенсивном освещении. Мы установили, что при рН 5,7 скорость фотоинактивации ниже, чем при рН 6,5, тогда как в ФС2, лишенной КВК, фотоингибирование не зависит от рН [2]. Более того, скорость фотоингибирования тилакоидных мембран существенно увеличивалась в присутствии протонофоров, устраняющих подкисление внутритилакоидного пространства при активации фотосинтеза. Yamashita с соавторами показали, что АФК участвуют не только в фотоингибировании, но и в процессе термической инактивации мембран. Образуюсь, по-видимому, в результате перекисного окисления мембранных липидов, инициируемого нагреванием, они могут принимать участие в тепловой деградации Мп-кластера ФС2. В представленной работе мы изучили влияние рН среды на процесс тепловой инактивации ФС2. Мы показали, что термоиндуцированная инактивация реакции выделения  $O_2$  мембранами ФС2 и электрон-транспортной цепи в целом при рН 5,7 происходит медленнее, чем при рН 6,5. Освещение тилакоидных мембран, не вызывающее фотоингибирования, но приводящее к подкислению внутритилакоидной среды, приводит к аналогичному эффекту. Увеличение устойчивости одного из катионов марганца к действию восстановителей наблюдается и при добавлении катионов  $Ca^{2+}$ , то есть действие катиона  $Ca^{2+}$  аналогично влиянию подкисления среды. В связи с этим мы проверили влияние катионов  $Ca^{2+}$  на термоинактивацию и обнаружили, что в присутствии 10 мМ  $Ca^{2+}$  устойчивость электронного транспорта к тепловому стрессу в ФС2 значительно возрастает, особенно при рН 5,7. Этот эффект сильнее выражен в области высоких температур (50 °С), когда происходит разборка Мп-кластера. Наши исследования термоинактивации мембран, обогащенных ФС2, с помощью липофильного циклического гидроксилминового спинового зонда подтвердили участие в этом процессе активных форм кислорода. Однако мы не зарегистрировали образование супероксида. Повреждение марганцевого кластера при высоких температурах происходит, по-видимому, за счет других форм АФК.

### Библиографические ссылки

1. *Semin B. K., Davletshina L. N., Rubin A. B.* Correlation between pH dependence of O<sub>2</sub> evolution and sensitivity of Mn cations in the oxygen-evolving complex to exogenous reductants // *Photosynth. Res.* 2015. Vol. 125. P. 95–103.

2. *Davletshina L. N., Semin B. K.* pH dependence of photosystem II photoinhibition: relationship with structural transition of oxygen-evolving complex at the pH of thylakoid lumen // *Photosynth. Res.* 2020. Vol. 145. P. 135–143.

**ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ПИГМЕНТНЫЙ ФОНД  
ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ГРИБОМ  
*BIPOLARIS SOROKINIANA***

**В. И. Лукша, Л. В. Пашкевич, М. А. Даркович, И. Н. Гордейчик,  
Л. Ф. Кабашникова**

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

При формировании урожая сельскохозяйственных культур ведущая роль принадлежит фотосинтезу. Отмечена тесная положительную связь между хлорофилловым фотосинтетическим потенциалом и урожаем пшеницы. Однако, заражение грибными патогенами, в том числе гельминтоспориозом, приводит к снижению накопления фотосинтетических пигментов в листьях хлебных злаков. Известно, что наночастицы (НЧ) серебра обладают биоцидным и иммуностимулирующим действием на растения, что может способствовать снижению негативного влияния фитопатогенов на процесс фотосинтеза.

Исследовано действие НЧ серебра на пигментный аппарат растений пшеницы сорта Сударыня при заражении возбудителем корневой гнили *Bipolaris sorokiniana*. Использованы коммерческие препараты фирмы Nanomaterials&Technologies M9 (Россия), содержащие НЧ серебра разных размеров и разные стабилизаторы: неионогенный полимер (полиэтиленгликоль, ПЭГ, 0,1%, размер НЧ 12 нм), линейный полисахарид (карбоксиметилцеллюлоза, КМЦ, 0,1%, размер НЧ 30 нм) и натуральный анионный ПАВ (олеат натрия, 1 мМ, размер НЧ 12 нм). Проростки пшеницы сорта Сударыня выращивали на полихроматическом белом свете с плотностью потока 100 мкмоль квантов/(м<sup>2</sup>с) при 23 °С и 14 ч световом периоде до 5-дневного возраста, затем обрабатывали НЧ (500 ppm) из расчета 1 мл/ 10 растений. Через сутки заражали суспензией спор гриба *Bipolaris sorokiniana*, содержащей 10<sup>6</sup> спор/мл. Через двое суток после заражения определяли содержание фотосинтетических пигментов в ацетоновых экстрактах из первых листьев пшеницы по формулам [1].

Заражение проростков пшеницы привело к снижению фракций хлорофилла (Хл *a*, Хл *b* и их суммы Хл (*a+b*)) на 25,1%, на 46,3% и на 30,2% соответственно по сравнению со здоровыми растениями. Предобработка растений НЧ серебра способствовала сохранению фонда хлорофилловых пигментов на уровне контроля. Так, содержание Хл *a* в результате обработки проростков НЧ и суспензией спор *B. sorokiniana* превышало зараженный контроль на 18,4% (для НЧ с ПЭГ), на 13,5% (для НЧ с КМЦ) и на 13,3% (для НЧ с олеатом натрия). Содержание Хл *b* было выше инфицированного контроля на 29,1% (для НЧ с ПЭГ), на 14,6% (для НЧ с КМЦ) и на 16,6% (для НЧ с олеатом натрия). По содержанию Хл (*a+b*) значимое увеличение по сравнению с зараженными растениями (на 20,3%) вызывали НЧ с ПЭГ, тогда как эффекты НЧ с КМЦ и НЧ с олеатом натрия были несколько ниже (13,7% и 13,9% соответственно). Аналогичное защитное действие НЧ серебра оказывали на фонд каротиноидов. Если у зараженных проростков пшеницы этот показатель значительно снижался (на 22,4%), то после обработки НЧ серебра уровень каротиноидов повышался на 24,4% (для НЧ с ПЭГ), на 14,5% (для НЧ с КМЦ) и на 12,3% (для НЧ с олеатом натрия).

Таким образом установлено, что обработка проростков пшеницы сорта Сударыня НЧ серебра с разными стабилизаторами оказывает защитное действие на пигментный фонд при гельминтоспориозе, что имеет важное значение для нормального функционирования хлоропластов пшеницы и сохранения биологической продуктивности растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта БРФФИ № Б22А3Г-004.

#### **Библиографические ссылки**

1. *Шлык А. А.* Определение хлорофилла и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука. 1971. С. 154–170.

## КАТИОННЫЕ ПОРФИРИНЫ С ФОСФОРом (V): МЕХАНИЗМ ПРОНИКНОВЕНИЯ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

**В. П. Майоров<sup>1</sup>, А. Н. Константинова<sup>2</sup>, Д. Д. Зыкова<sup>2</sup>, В. С. Соколов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Российский Химико-Технологический Университет им Д.И. Менделеева, Москва, Россия*

<sup>2</sup>*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия*

Увеличение количества бактерий, которые не поддаются действию антибиотиков, представляет серьезную опасность для здравоохранения. В связи с этим необходимо разработать новые подходы к антибактериальной терапии, одним из которых является антимикробная фотодинамическая терапия (аФДТ). Развитие этого метода сопряжено с поиском и направленным синтезом новых фотосенсибилизаторов (ФС), что требует разработки методов оценки их эффективности и изучения механизмов их действия. В предыдущей работе нами была изучена адсорбция и фотодинамическая активность порфиринов фосфора (V), различающихся числом пиридиновых заместителей на периферии (0,1 или 2) и структурой аксиального лиганда: гидроксильного (ОН) или этоксильного (OEt). Исследования проводились как экспериментальными методами на культурах клеток и модельных липидных мембранах, так и с помощью молекулярной динамики [1]. Показано, что соединения, имеющие в своей структуре гидроксильный аксиальный лиганд, обладают меньшей фотодинамической эффективностью, чем соединения с этоксильным лигандом. Одной из причин более низкой эффективности порфиринов с гидроксильным лигандом может быть их проникновение через мембрану в цитоплазму, где они разрушаются. Подробному изучению механизма прохождения порфиринов через мембрану посвящена данная работа.

Исследования проведены на модельной бислойной липидной мембране (БЛМ) с помощью оригинальной методики, позволяющей измерять разность скачков потенциала на границах раздела мембраны с водой при адсорбции на неё исследуемых соединений [2]. Установлено, что порфирины, имеющие аксиальные лиганды ОН, проникают сквозь мембрану, в отличие от порфиринов с этиловыми лигандами. Молекулы порфиринов адсорбируются на поверхности мембраны как катионы, а проникают через нее как электронейтральные молекулы. Процесс зависит от рН растворов с двух сторон от мембраны. Данный механизм аналогичен изученному нами ранее механизму проникновения через мембрану слабых оснований или кислот [3].

### Библиографические ссылки

1. Antimicrobial activity of photosensitizers: Arrangement in bacterial membrane matters / O. V. Batishchev [et al.] // *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2023 Vol. 10. P. 1192794.

2. Sokolov V., Mirsky V. Electrostatic potentials of bilayer lipid membranes: basic principles and analytical applications. *Ultrathin Electrochemical Chemo- and Biosensors*. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, vol 2. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004. P. 255–291.

3. Transport of the neutral form of amphiphilic drugs through a planar bilayer lipid membrane: the role of the pH gradient / V. V. Cherny [et al.] // *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 1990. Vol. 21, iss. 3. P. 17–25.

## ИЗМЕНЕНИЕ РАЗМЕРА СВЕТОСОБИРАЮЩЕЙ АНТЕННЫ В РАСТЕНИЯХ *ARABIDOPSIS THALIANA* С НОКАУТОМ АЛЬФА-КАРБОАНГИДРАЗЫ 2

**Е. М. Надеева, Д. В. Ветошкина, Л. К. Игнатова, Н. Н. Руденко, Б. Н. Иванов**

*Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, Россия*

Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла а (НФТ) представляет собой сложный механизм, используемый высшими растениями для регулирования диссипации избыточного поглощенного света. Подкисление люмена тилакоида, приводит к развитию энергозависимого компонента НФТ, зависящему от протонирования PsbS белка, который вызывает конформационные изменения в белках светособирающей антенны тем самым увеличивая диссипацию энергии в тепло [1]. State transitions (ST) представляет собой краткосрочный механизм регуляции перераспределения энергии возбуждения между реакционными центрами, при котором часть светособирающей антенны ФС2 перераспределяется между ФС2 и ФС1 происходит за счет селективного фосфорилирования светособирающего комплекса ФС2 (ССК2) [1].

Ранее нами показано, что в растениях *Arabidopsis thaliana* без  $\alpha$ -карбоангидразы 2 ( $\alpha$ -КА2), катализирующей реакцию  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ , величина НФТ была больше по сравнению НФТ растений дикого типа (ДТ) за счет энергозависимого компонента НФТ [2], причем у мутантных растений наблюдалась более низкая способность осуществлять процесс ST по сравнению с растениями ДТ [2]. Вероятно,  $\alpha$ -КА2 может участвовать в тонкой подстройке фотосинтетического аппарата при изменяющихся условиях среды. На данный момент не совсем ясно – есть ли какое-то отличие между растениями ДТ и мутантом по  $\alpha$ -КА2 в оптимизации фотосинтетического аппарата, занимающей более продолжительное время, например, в изменении размера ССК2.

Эксперименты проводили на растениях *A. thaliana* ДТ и мутантных растениях с нокаутированным геном *At2g28210*, кодирующим  $\alpha$ -КА2. Растения выращивали с 8-часовым фотопериодом при интенсивности света 50 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с и концентрации CO<sub>2</sub> 400 ppm.

Уровни экспрессии генов, кодирующих и мажорные белки ССК2 Lhcb1 и Lhcb2, и минорные белки Lhcb3, Lhcb4 и Lhcb6 были выше в мутантах по  $\alpha$ -КА2, чем в ДТ. Поскольку отсутствие  $\alpha$ -КА2 влияет на энергозависимое тушение, то нами был измерен уровень экспрессии  $\alpha$ -КА2 и в мутанте, в котором отсутствует PsbS, и в растениях ДТ. В обоих мутантах уровень экспрессии  $\alpha$ -КА2 был достоверно выше, чем в растениях ДТ. С помощью Вестерн-блот анализа было обнаружено, что содержание мажорных белков Lhcb1 и Lhcb2, а также минорного Lhcb4 было в мутанте выше, чем в ДТ. При этом содержание фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2 в мутанте по  $\alpha$ -КА2 было меньше, чем в ДТ, что подкрепляет наши предыдущие выводы о том, что в мутантных растениях без  $\alpha$ -КА2 снижена активность STN7 киназы – ключевого фермента, инициирующего процесс ST. Таким образом, мутантные растения без  $\alpha$ -КА2 «видят» необходимость в увеличении размера антенны ФС2, а именно в увеличении «поглощения» солнечной энергии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№ 22-74-10088) <https://rscf.ru/project/22-74-10088/>.

### Библиографические ссылки

1. *Ruban A. V., Wilson S.* The mechanism of non-photochemical quenching in plants: localization and driving forces // *Plant and Cell Physiology*. 2021. Vol. 62, iss. 7. P. 1063–1072.
2. Features of photosynthesis in *arabidopsis thaliana* plants with knocked out gene of alpha carbonic anhydrase 2 / E. M. Nadeeva [et al.] // *Plants*. 2023. Vol. 12, iss. 9. P. 1763.

# ОПТИМИЗАЦИЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОПТИЧЕСКОГО ОТКЛИКА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ С ПОМОЩЬЮ ЭВОЛЮЦИОННЫХ АЛГОРИТМОВ

**Р. Ю. Пищальников**

*Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской Академии Наук, Москва, Россия*

Исследование первичных процессов фотосинтеза непосредственным образом связано с численным моделированием оптических свойств пигмент-белковых комплексов (ПБК), входящих в состав клеточных мембран фотосинтезирующих организмов. Перенос энергии, как в рамках отдельного ПБК, так и между комплексами определяется не только индивидуальными характеристиками пигментов и ближайшим белковым окружением, но и их взаимном расположении в комплексе. Использование полуклассических квантовых теорий для расчёта оптического отклика ПБК позволяет связать воедино особенности возбужденных электронных состояний фотосинтетические пигментов, структуру комплексов, а также специфику экспериментальных методов измерения линейного и нелинейного оптического отклика. Однако, как показывает практика, корректное использование математического аппарата полуклассических квантовых теорий при моделировании первичных процессов фотосинтеза приводит к задачам с большим количеством свободных параметров. Таким образом, при расчёте оптического отклика всегда встаёт вопрос о статистической значимости и единственности найденных параметров квантовой модели, обеспечивающих приемлемое совпадение экспериментальных и расчётных спектров или кинетик. Одним из возможных путей решения данной проблемы является использование оптимизационных алгоритмов для оценки качества подгонки экспериментальных данных. Наличие современных высокопроизводительных ресурсов позволяет применять эвристические эволюционные алгоритмы, которые сейчас активно используются в прикладных задачах математического моделирования физических сред. Нами была разработана и успешно опробована методология моделирования линейного и нелинейного оптического отклика как для мономерных пигментов в растворителях [1, 2], так и для ПБК [3] с помощью алгоритма дифференциальной эволюции.

## **Библиографические ссылки**

1. Differential evolution reveals the effect of polar and nonpolar solvents on carotenoids: A case study of astaxanthin optical response modeling / D. D. Chesalin [et al.] // *Swarm and Evolutionary Computation*. 2022. Vol. 75. P. 101210.
2. The role of the local environment on the structural heterogeneity of carotenoid  $\beta$ -ionone rings / R. Y. Pishchalnikov [et al.] // *Photosynthesis Research*. 2023. Vol. 156. iss. 1. P. 3–17.
3. Monte carlo simulation affects convergence of differential evolution: a case of optical response modeling / D. D. Chesalin [et al.] // *Algorithms*. 2023. Vol. 16, iss. 1. P. 3.

## ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ СИНЕГО СВЕТА НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ В ОТСУТСТВИЕ ЭКЗОГЕННЫХ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

**В. Ю. Плавский, А. И. Третьякова, Л. Г. Плавская, А. В. Микулич,  
Р. К. Нагорный, А. Н. Собчук, Т. С. Ананич, А. Д. Свечко, Н. Д. Прокопенко,  
О. Н. Дудинова, С. В. Якимчук, И. А. Леусенко**

*Институт физики НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь*

В настоящее время способность оптического излучения синей области спектра (длина волны 400–485 нм) низкой интенсивности (плотность мощности 0.5–100 мВт/см<sup>2</sup>) оказывать влияние в условиях *in vitro* на функциональные характеристики раковых клеток не вызывает сомнения. В подавляющем числе исследований констатируется, что инактивирующее действие синего света более выражено в отношении раковых клеток по сравнению с нормальными. Исследования, выполненные в настоящей работе, впервые показали, что одной из причин повышенной чувствительности раковых клеток к действию синего света являются более высокие концентрации содержащихся в них эндогенных порфириновых сенсibilизаторов (свободных оснований порфиринов и их цинковых комплексов), что подтверждено методами флуоресцентного анализа. Это приводит к более высоким уровням светоиндуцированного образования в раковых клетках активных форм кислорода (АФК), регистрируемых с помощью хемилюминесценции, и более высокой скорости светоиндуцированного снижения метаболической активности раковых клеток по сравнению с нормальными. Об определяющей роли эндогенных порфиринов в эффектах сенсibilизации свидетельствуют также более высокая скорость фотоинактивации клеток и более интенсивный хемилюминесцентный сигнал при воздействии на клетки излучения с длиной волны  $\lambda=405$  нм, соответствующей максимуму полосы Соре спектра поглощения порфиринов и локальному минимуму в спектре поглощения флавинов, по сравнению с  $\lambda=445$  нм, соответствующей максимуму спектра поглощения флавинов и очень слабому поглощению порфиринов. Впервые в суспензии раковых клеток на фоне флавиновой флуоресценции зарегистрирована флуоресценция порфириновых сенсibilизаторов (идентифицированных как Zn-протопорфирин IX). С использованием данных флуоресценции определен уровень концентраций эндогенных порфиринов (~ 1 нМ).

Проявлению сенсibilизирующих свойств порфиринов в клетках способствуют: а) более высокая эффективность сенсibilизированного ими образования синглетного кислорода и более высокие значения их коэффициентов молярной экстинкции по сравнению с флавинами; б) локализация порфиринов в митохондриях, тогда как значительная доля флавинов локализована в цитозоле; в) связывание флавинов с белками, выполняющими защитную функцию от сенсibilизированного флавинами повреждения клеточных структур; г) выраженные антиоксидантные свойства флавинов, что способствует тушению активных форм кислорода, генерируемых ими при фотовозбуждении. При этом участие образующихся в клетках АФК при действии синего света не сводится к фотоповреждению клеточных структур, что в итоге приводит к гибели клеток. Изменение внутриклеточной концентрации АФК под действием света способно изменить окислительно-восстановительный статус клетки (ее редокс-состояние) и быть

непосредственной причиной как активации пролиферативных процессов в клетках (при относительно низком уровне АФК), так и ингибирования их пролиферации (при повышенной концентрации АФК). Наличие регуляторного действия синего света подтверждается данными проточной цитофлуориметрии, свидетельствующими об изменении параметров клеточного цикла (относительной концентрации клеток в стадиях G0/G1, G2/M, sub-G1). Впервые показано, что вклад различных типов АФК (синглетного кислорода и перекиси водорода) в эффекты инактивации клеток зависит от времени после прекращения облучения.

## МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА СОСТОЯНИЯ КОМПЛЕКСА ФОТОСИСТЕМЫ II В ЭКОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ

Т. Ю. Плюснина, Р. Н. Червицов, С. С. Хрущев, Н. С. Дегтерева,  
Г. Ю. Ризниченко, А. Б. Рубин

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

Фотосистема II (ФСII) является одним из ключевых пигмент-белковых комплексов, участвующих в первичных процессах фотосинтеза. ФСII обладает высокой чувствительностью к неблагоприятным факторам окружающей среды. Кривая индукции флуоресценции хлорофилла *a*, получаемая экспериментально при освещении исследуемых образцов фотосинтезирующих организмов, является чувствительным маркером, отражающим состояние ФС II и представляет собой сложную многофазную кривую. Высокое временное разрешение современных флуориметров и развитие методов анализа данных позволяет проследить динамику изменения этих фаз в процессе роста растений при действии различных факторов, в том числе и факторов стресса. Отдельные фазы нарастающего участка индукционной кривой могут соответствовать либо различным стадиям переноса электрона в электрон-транспортной цепи фотосинтеза, либо различным типам реакционных центров. Применение ингибитора электронного транспорта дихлорфенилдиметилмочевины (DCMU) и измерение кривых при разных интенсивностях света позволяет разделить фазы, относящиеся к разным типам реакционных центров, и фазы, указывающие на стадии переноса электрона.

Анализ кривых индукции флуоресценции может использоваться для оперативного выявления действия факторов стресса и загрязнения окружающей среды в экологическом мониторинге. Одним из основных методов, позволяющим получить характеристики фотосинтетического аппарата, является JIP-тест [1]. Математическое моделирование процессов переноса электронов в ФС II является одним из широко применяемых методов оценки эффективности фотосинтетического аппарата растений путем анализа кривых индукции флуоресценции. Для исследования большого массива экспериментальных кривых могут быть применены методы машинного обучения, такие как кластеризация и классификация, а также методы математической статистики.

Используя комплекс перечисленных математических методов, нами было исследовано изменение состояния фотосинтетического аппарата лабораторной культуры водорослей *Chlorella vulgaris* при действии солей тяжелых металлов, кадмия и хрома. Показано, что кластерный и статистический анализ выявляют раннее действие ионов кадмия и хрома, через четыре часа после добавления этих токсикантов. С помощью разработанной нами математической модели [2] было обнаружено, что ионы кадмия и хрома снижают активность кислород-выделяющих комплексов, причем действие ионов кадмия выражено существенно сильнее, чем действие ионов хрома, структура светособирающей антенны на начальных этапах действия ионов кадмия и хрома практически не меняется.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №22-11-00009.

### Библиографические ссылки

1. Strasser R. J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient // George C. Papageorgiou and Govindjee (eds): Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Dordrecht : Springer Netherlands, 2004. P. 321–362.
2. Three-state mathematical model for the assessment of DCMU-treated photosystem II heterogeneity / T. Yu. Plyusnina [et al.] // Photosynthesis Research. 2024. Vol. 159. P. 303–320.

## СТИРИЛОВЫЕ КРАСИТЕЛИ КАК ДАТЧИКИ ПРОТОНОВ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ ИЗ ФОТОАКТИВИРУЕМЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ГРАНИЦЕ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЫ

**Л. Е. Поздеева<sup>1</sup>, В. Ю. Ташкин<sup>2</sup>, Д. Д. Зыкова<sup>2,3</sup>, В. С. Соколов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия*

<sup>2</sup>*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия*

<sup>3</sup>*Московский физико-технический институт, г. Долгопрудный, Россия*

Согласно многочисленным исследованиям, протоны, находящиеся на поверхности мембраны, медленно обмениваются с объемом раствора, но способны быстро перемещаться вдоль ее поверхности. Предполагается, что они отделены от объема раствора высоким потенциальным барьером. Удобной системой, позволяющей определить его высоту, является бислойная липидная мембрана (БЛМ), на одной стороне которой адсорбированы соединения, выбрасывающие протон при поглощении ими света (Caged-H<sup>+</sup>). Настоящая работа посвящена исследованию двух анионных Caged-H<sup>+</sup>. Одно из них – 2-метокси-5-нитрофенилсульфат натрия (MNPS) – необратимо высвобождает сульфат и протон, второе – пиранин – обратимо депротонируется из-за снижения рК. Адсорбция MNPS и пиранина на БЛМ изучалась методом компенсации внутримембранного поля. Данным методом изучалась и кинетика переноса протонов из БЛМ в раствор при возбуждении MNPS УФ светом [1]. Изменения потенциала в этих экспериментах определялись зависимостью поверхностного заряда БЛМ от рН, вызванной наличием титруемых групп фосфолипидов. Это ограничивало чувствительность данного метода и область рН, в которой можно было проводить измерения. Для увеличения чувствительности в мембрану встроили стироловые красители – d-4-ANEPPS или RH-421, которые создают на границе мембраны дипольный скачок потенциала, зависящий от рН [2]. При освещении мембраны, на которой были адсорбированы Caged-H<sup>+</sup> и красители, создаваемый ими скачок потенциала уменьшался. Скорость исчезновения потенциала увеличивалась при увеличении концентрации Caged-H<sup>+</sup> и интенсивности освещения и понижении рН. Исчезновение потенциала может быть вызвано как протонированием красителей и их десорбцией с БЛМ, так и их разрушением. Контрольные эксперименты, проведенные в бескислородной среде, исключают возможность окисления красителей активными формами кислорода. Однако, возможно и прямое взаимодействие молекул этих соединений в мембране. О возможном образовании комплексов этих соединений говорят эксперименты, в которых изменения граничного потенциала при их одновременной адсорбции значительно отличались от суммы изменений потенциала, вызванных их адсорбцией по отдельности. В присутствии пиранина изменялся спектр поглощения d-4-ANEPPS.

Исчезновение дипольного потенциала БЛМ со стироловыми красителями наблюдалось при активации двух видов Caged-H<sup>+</sup> с разным механизмом освобождения протонов. Это позволяет предположить, что оно связано с переносом протонов в мембране от доноров – молекул Caged-H<sup>+</sup> к акцепторам – молекулам красителей.

Работа поддержана фондом РФ (грант №23-24-00571).

### Библиографические ссылки

1. Electrostatic potentials caused by the release of protons from photoactivated compound sodium 2-methoxy-5-nitrophenyl sulfate at the surface of bilayer lipid membrane / V. S. Sokolov [et al.] // Membranes. 2023. Vol. 15. P. 722.

2. Стириловые красители di-4-ANEPPS и RH-421 как датчики протонов на поверхности липидных мембран / А. Н. Константинова [и др.] // Биологические мембраны. 2021. Т. 38, № 2. С. 123–128.

# РОЛЬ ПОДВИЖНЫХ ПЕРЕНОСЧИКОВ ЭЛЕКТРОНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ОТВЕТНОЙ РЕАКЦИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА *HORDEUM VULGARE* ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ

Н. Л. Пшибытко

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

Температура является одним из основных стрессовых факторов, ограничивающих фотосинтетическую активность, рост и продуктивность растений. Наряду с термоиндуцированным лимитированием фотосинтеза за счет снижения устьичной проводимости, показаны многочисленные молекулярные механизмы температурно-зависимых изменений в пигмент-белковых комплексах тилакоидных мембран, включая диссоциацию свето-собирающего комплекса, разрушение белка D1 реакционного центра ФС2, высвобождение Mn-стабилизирующего 33-кДа белка из корового центра ФС2, выход Mn из водоразлагающего комплекса, изменение пространственной конфигурации Q<sub>v</sub>-связывающего сайта ФС2. В настоящей работе протестирована гипотеза, согласно которой редокс-состояние подвижных переносчиков электронов, пластохинонов и ферредоксинов, отражающее состояние электрон-транспортной цепи хлоропластов, регулирует ее функциональную активность при тепловом стрессе. Исследованы параметры флуоресценции хлорофилла *a*, характеристики окислительно-восстановительного состояния P700, пластохинонов, ферредоксина и пластоцианина в проростках *Hordeum vulgare* L. Обнаружено, что воздействие повышенной температуры (40 °С 3 ч) снижало уровень восстановленных пластохиноновых молекул, уменьшало размер фотоактивного и увеличивало нефотоактивный пул пластохинонов. С использованием искусственных хинонов, 2,6-дихлор-1,4-бензохинона и 2,6-диметоксибензохинона показано, что термоиндуцированное подавление потока электронов между Q<sub>A</sub><sup>-</sup> и Q<sub>B</sub> было обусловлено увеличением уровня восстановленности пластохинонового пула. Кроме того, тепловая обработка вызывала накопление восстановленного ферредоксина и активизацию альтернативных потоков электронов от ферредоксина с участием пластохинонов. Повышенная температура ингибировала циклический поток электронов, катализируемый ферредоксин-пластохинон редуктазой (FQR). Вызванное нагреванием снижение циклического и линейного потока электронов компенсировалось активацией транспорта электронов, катализируемого НАДН дегидрогеназа-подобным комплексом (NDH). Также было выявлено термоиндуцированное повышение транскрипции *ndhA* и *ndhF* генов, кодирующих субъединицы NDH. Инфильтрация листьев 2,6-дихлорфенолиндофенолом, искусственным акцептором электронов ФС1, предотвращала термоиндуцированное снижение восстановленности пластохинонов и изменения FQR-зависимого циклического электронного транспорта и qE. В то же время, данная обработка не влияла на термоиндуцированное подавление линейного электронного транспорта и перераспределение пластохинонов из фотоактивного в нефотоактивный пул. На основании полученных данных сделан вывод, что снижение эффективности донирования электронов от пластоцианина к ФС1 и акцептирования электронов ферредоксином могло быть причиной термоиндуцированного подавления FQR-зависимого циклического электронного транспорта, в то время как уменьшение размера фотоактивного пула пластохинонов потенциально являлось причиной ингибирования линейного потока электронов при тепловом стрессе.

# КИНЕТИКА ПЕРЕНОСА ПРОТОНОВ МЕЖДУ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНОЙ И ВОДОЙ ПРИ ИХ ОСВОБОЖДЕНИИ ИЗ ФОТОАКТИВИРУЕМЫХ СОЕДИНЕНИЙ

**В. С. Соколов, В. Ю. Ташкин, Д. Д. Зыкова**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук, Москва, Россия*

Перенос протонов между границей мембраны и водой может быть затруднен из-за наличия высокого потенциального барьера, что влияет на их транспорт через мембрану мембранными белками. Для оценки скорости переноса протонов через этот барьер используют фотоактивируемые соединения, молекулы которых могут адсорбироваться на границе мембраны и освобождать протоны при возбуждении. Нами изучалось такое соединение – 2-метокси-5-нитрофенилсульфат натрия (MNPS). Его молекула способна адсорбироваться на бислойной липидной мембране (БЛМ) в виде аниона и при возбуждении УФ светом освобождать сульфат и протон, превращаясь в электронейтральный продукт. При освещении БЛМ, с одной стороны которой были адсорбированы анионы MNPS, наблюдались изменения электростатического потенциала на границе мембраны с водой. При включении освещения потенциал изменялся в положительную сторону, при его выключении – медленно восстанавливался к исходной величине. Показано, что в потенциал вносят вклад изменения количества связанных на поверхности БЛМ анионов MNPS и протонов. Перенос протонов между мембраной и водой состоит из двух стадий. Медленную стадию регистрировали с помощью измерения разности граничных потенциалов БЛМ методом компенсации внутримембранного поля. Измерения вызванных постоянным освещением изменений емкости мембраны, электростатического потенциала на ее границе и pH воды около мембраны показали, что кинетика переноса протонов определяется скоростью изменения их концентрации в прилегающем к мембране неперемешиваемом слое воды [1]. Измерения быстрой стадии изменения потенциала проводили с помощью электрометрического усилителя при освещении мембраны вспышкой света. Вспышка вызывала быстрое возрастание потенциала, которое продолжалось после ее окончания, а затем происходил медленный спад потенциала до темнового значения. Быстрое возрастание потенциала подавлялось при увеличении концентрации буфера и при уменьшении pH среды, что говорит о том, что оно вызвано перемещением протонов из воды на поверхность мембраны, связанным нарушением их равновесия во время активации MNPS вспышкой света. Характерное время процесса составляло менее секунды.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект 23-24-00571.

## **Библиографические ссылки**

1. Electrostatic potentials caused by the release of protons from photoactivated compound sodium 2-methoxy-5-nitrophenyl sulfate at the surface of bilayer lipid membrane / V. S. Sokolov [et al.] // *Membranes*. 2023. Vol. 13. P. 722.

# ПРИМЕНЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВЫМ КРАСИТЕЛЕМ

А. А. Таболич<sup>1</sup>, А. И. Третьякова<sup>1</sup>, Л. Г. Плавская<sup>1</sup>, Т. С. Ананич<sup>1</sup>,  
Р. К. Нагорный<sup>1</sup>, В. Ю. Плавский<sup>1</sup>, Л. С. Ляшенко<sup>2</sup>, Е. С. Воропай<sup>2</sup>,  
А. П. Луговский<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь

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

<sup>3</sup>Институт прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко, Минск, Беларусь

Индотрикарбоцианиновые красители перспективны в качестве сенсibilизаторов для фотодинамической инактивации вирусов, бактерий и грибковой флоры благодаря своим спектральным и фотохимическим свойствам [1]. Выполненные ранее исследования показали способность света, соответствующего спектру поглощения индотрикарбоцианинового красителя ПК220, вызывать подавление роста микробных клеток *E. coli*.

Для выяснения механизма фотохимических процессов, определяющих фотоповреждение микробных клеток *E. coli* при их сенсibilизации индотрикарбоцианиновым красителем ПК220 в данной работе применялся метод собственной (не усиленной добавками активаторов) светоиндуцированной хемилюминесценции клеток. Исследовалось влияние на величину светосуммы хемилюминесценции специфических тушителей (перехватчиков) активных форм кислорода (АФК): азида натрия – тушителя синглетного кислорода; пирувата натрия – перехватчика перекиси водорода; *D*-маннитола – перехватчика гидроксильных радикалов, а также универсального антиоксиданта кверцетина – перехватчика супероксиданионрадикала, гидроксильных радикалов, перекиси водорода и синглетного кислорода. Время облучения взвеси клеток варьировали в диапазоне  $t=1-10$  мин, а плотность мощности воздействующего излучения в диапазоне  $I=3-150$  мВт/см<sup>2</sup>.

Выполненные исследования показали, что интенсивность хемилюминесценции необлученных растворов красителя ПК220, интактной суспензии микробных клеток, а также суспензии клеток в присутствии красителя характеризуется очень низкой величиной и практически не изменяется в процессе записи сигнала в течение 5 мин. Иная ситуация реализуется после воздействия света с вышеуказанными параметрами на суспензию клеток *E. coli*, сенсibilизированных красителем ПК220. В этом случае кинетика изменения интенсивности хемилюминесценции представляет собой ниспадающую кривую.

Наиболее выраженное защитное действие от фотоповреждения оказывает кверцетин, являющийся универсальным антиоксидантом, оказывающим тушающее действие на такие АФК, как супероксиданионрадикал, гидроксильных радикалы, перекись водорода и синглетный кислород. Установлено, что основным интермедиатом, определяющим повреждение микробных клеток при воздействии излучения светодиодного источника с  $\lambda_{\max}=745$  нм, является синглетный кислород. Значителен также вклад перекиси водорода в исследуемые фотохимические процессы. В отличие от указанных АФК, гидроксильные радикалы не играют существенной роли в фотоповреждении микробных клеток *E. coli*.

## Библиографические ссылки

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

# ВОЗДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДНОГО ЭЛИСИТОРА АТРЕР НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

**В. В. Татур, Г. Г. Филипова**

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь*

Изучение физиолого-биохимических механизмов влияния элиситоров – молекул, способных индуцировать и усиливать защитные реакции растения – позволит разработать способы повышения устойчивости растений к стрессовым воздействиям. Одним из современных подходов для повышения устойчивости растений является использование природных элиситоров, к числу которых относится пептидный элиситор AtPer [1].

В ходе исследования было изучено влияние эндогенного пептида AtPer на 14-дневные проростки пшеницы, подвергнутые окислительному стрессу. Объектом исследования служила яровая пшеница сорта Сударыня, выращенная рулонным методом в лабораторных условиях. В ходе работы было исследовано влияние пептидного элиситора AtPer на морфометрические характеристики проростков пшеницы, в частности, массу корней и массу побегов, уровень фотосинтетических пигментов, а также характеристики флуоресценции хлорофилла, регистрируемые с помощью методики РАМ-флуориметрии. Окислительный стресс (ОС) создавали путем помещения корневой системы проростков в гидроксил-генерирующую смесь, содержащую  $10^{-3}$  М пероксида водорода,  $10^{-3}$  М хлорида меди и  $10^{-3}$  М аскорбата.

Активация окислительных процессов в растении приводит к снижению уровня фотосинтетических пигментов (ФСП), который является одним из важных показателей жизнедеятельности растений [2]. Измерение флуоресценции хлорофилла *a* представляет собой наиболее информативный и неdestructивный метод диагностики функциональной активности фотосинтетического аппарата для выявления и количественной оценки повреждений фотосинтетического аппарата в результате стресса в растениях [3].

В ходе исследования было показано, что под действием ОС происходит снижение уровня фотосинтетических пигментов примерно на 52% по сравнению с контролем. При предстрессовой обработке надземной части проростков пептидом AtPer в концентрации  $10^{-8}$  М был выявлен достоверный защитный эффект пептида на уровень фотосинтетических пигментов и показатели флуоресценции хлорофилла *a* (qN, NPQ). Полученные данные свидетельствуют, что данный пептид приводит к активации защитных систем растений, повышающих устойчивость фотосинтетического аппарата к действию ОС.

## **Библиографические ссылки**

1. Yamaguchi Y., Huffaker A. Endogenous peptide elicitors in higher plants // Current Opinion in Plant Biology. 2011. Vol. 14, iss. 4. P. 351–357.
2. Review of oxidative stress and antioxidative defense mechanisms in *Gossypium hirsutum* L. in response to extreme abiotic conditions / Z. Qamer [et al.] // J Cotton Res. 2021. Vol. 4, iss. 1. P. 9.
3. Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла *a* – теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений / В. Н. Гольцев [и др.] // М. – Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2014. – 220 с.

## ПУТИ ДЕГРАДАЦИИ ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ ГОРОДСКОГО ЛАНДШАФТА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛЕТУЧИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

Е. Г. Тюлькова<sup>1</sup>, Г. Е. Савченко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

<sup>2</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Значительный вклад в выбросы современных промышленных предприятий вносят летучие органические углеводороды, исследование влияния которых на окружающую среду представляет интерес для экологии и физиологии растений. Для объективного и быстрого суждения об эффективности их вредного действия необходимы маркеры, на роль которых претендуют, в первую очередь, структурно-функциональные показатели фотосинтетического аппарата, которые должны включать сведения о деградации пигментов. Последние тесно связаны с изучением путей катаболизма хлорофилла (Хл) в растениях, внимание к которому вновь приобрело актуальность. Уже давно установлено, что отщепление фитила способствует уменьшению молекулярного взаимодействия между молекулами Хл и снижает эффективность миграции энергии возбуждения между ними, а освободившиеся от связи с мембраной молекулы хлорофиллида (Хд) становятся фотодинамически опасными, что делает особенно интересной информацию об образовании Хд при различных неблагоприятных воздействиях. Еще одним из путей деградации Хл является замещение ионов магния на атомы водорода в его молекуле, в результате чего образуется феофитин (Фео), обладающий в отличие от Хд, антиоксидантными свойствами. Взаимосвязь этих процессов подвергается пересмотру.

В настоящей работе исследован вклад дефитолизации и феофитинизации в деградацию мембраносвязанных молекул Хл *a* под действием двух летучих углеводородов – бутилацетата и *o*-ксилола. Объектами исследований служили растения многолетнего злака овсяницы тростниковой *Festuca arundinacea* и саженцы листопадных растений – березы повислой (*Betula pendula* Roth.), клена остролистного (*Acer latanoides* L.), липы мелколистной (*Tilia cordata* Mill.) и тополя пирамидального (*Populus pyramidalis* Roz.). Разделение фитольных и бесфитольных форм хлорофиллов после экстракции пигментов ацетоном основано на их разной растворимости в гексане при соответствующих значениях pH, а определение Фео – на различиях спектров поглощения до и после подкисления ацетонового экстракта.

Установлено, что обработка растений летучими углеводородами способствовала лишь небольшому снижению содержания мембраносвязанного Хл *a* даже при возрастании концентрации токсикантов до 300 предельно допустимых доз (лишь на десятки процентов спустя 1 и 3 сут после токсикации). В то же время дефитолизация, оцениваемая по величине отношения Хд *a*/Хл *a*, увеличивалась при токсикации дозозависимо на порядок и более по сравнению с контролями. Во всех исследованных растениях наблюдали феофитинизацию Хл *a*, соизмеримую, но лишь в общих чертах, с дефитолизацией. Особенно высокие положительные значения коэффициентов корреляции (*r*) между обоими типами деградации Хл *a* были характерны для листопадных растений через сутки после обработки токсикантами. Одновременно с помощью РАМ-флуориметрии установлено увеличение в разы величины нефотохимического тушения флуоресценции Хл (*qN*) при действии токсикантов. Высокие положительные значения *r* между величинами *qN* и содержанием обоих продуктов деградации Хл обнаружены у всех листопадных растений также спустя 1 сут после токсикации. Изменение условий расчета *r* (увеличение времени последствия и разные виды растений) снижали достоверность корреляций либо меняли ее знак (+ на –), указывая на сложные взаимодействия между параметрами.

## МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЕРЕХОДНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЦИТОХРОМНОМ $b_6f$ -КОМПЛЕКСЕ

С. С. Хрущев, Т. Ю. Плюснина, П. В. Фурсова, Г. Ю. Ризниченко, А. Б. Рубин

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

Цитохромный  $b_6f$ -комплекс является важным компонентом фотосинтетической электрон-транспортной цепи и выступает в качестве центрального «хаба», через который проходит как линейный поток электронов между фотосистемами 2 и 1, так и циклический поток вокруг фотосистемы 1. Комплекс состоит из четырех цитохромов и железосерного центра Риске, обладающих окислительно-восстановительной активностью. В процессе переноса электрона на пластоцианин происходит существенное изменение конформации комплекса, обеспечивающее сближение центра Риске с цитохромом  $f$ . Используя современные данные о строении цитохромного  $b_6f$ -комплекса [1] и редокс-потенциалах участников электронного транспорта [2], мы разработали его детальную математическую модель, позволяющую оценить скорость электронного транспорта через комплекс в зависимости от восстановленности пулов мобильных переносчиков электрона пластохинона, пластоцианина и ферредоксина, а также исследовать кинетику переходных процессов в комплексе при изменении степени восстановленности этих пулов. В модели рассматриваются переходы между 9216 состояниями мономера цитохромного  $b_6f$ -комплекса, различающимися по редокс-состоянию входящих в его состав реакционных центров и связанных с ним мобильных переносчиков электрона. Модель представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений, переменными в которых являются вероятности нахождения комплекса в каждом из состояний. основное кинетическое уравнение является линейным, что позволяет использовать методы линейной алгебры как для нахождения стационарных состояний, так и для расчета кинетики переходных процессов. Разработано программное обеспечение на языке программирования Python, позволяющее автоматически генерировать основное кинетическое уравнение на основе схемы реакций в комплексе, находить стационарные скорости электронных потоков через комплекс в зависимости от констант скорости элементарных реакций и степени восстановленности пулов мобильных переносчиков электрона, а также кинетику изменения электронного потока в ходе переходного процесса, вызванного изменением степени восстановленности одного из пулов. На шестиядерном процессоре i5-8600K, работающем на частоте 3.6 ГГц, поиск стационарного решения для одного набора параметров занимает примерно 4 с, что позволяет провести исследование режимов функционирования комплекса в широком диапазоне изменения параметров. Результаты моделирования находятся в хорошем согласовании с экспериментальными данными. Предполагается использовать полученную модель цитохромного  $b_6f$ -комплекса в качестве компонента интегральной модели фотосинтетического электронного транспорта.

### Библиографические ссылки

1. High-resolution cryo-EM structures of plant cytochrome  $b_6f$  at work / M. Sarewicz [et al.] // Science Advances. 2023. Vol. 9, iss. 2. P. eadd9688.
2. Unexpected heme redox potential values implicate an uphill step in cytochrome  $b_6f$  / M. Szwalec [et al.] // The Journal of Physical Chemistry B. 2022. Vol. 126, iss. 47. P. 9771–9780.

# ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ ХЛОРОФИЛЛА В ВОДОРАСТВОРИМОМ ХЛОРОФИЛЛ-СВЯЗЫВАЮЩЕМ БЕЛКЕ BoWSCP МЕТОДОМ ФЕМТОСЕКУНДНОЙ PUMP-PROBE СПЕКТРОСКОПИИ

Д. А. Черепанов<sup>1,2</sup>, К. В. Неверов<sup>3</sup>, Ю. Н. Обухов<sup>3</sup>, Ф. Е. Гостев<sup>1</sup>, И. В. Шелаев<sup>1,2</sup>,  
А. В. Айбуш<sup>1</sup>, М. С. Крицкий<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

<sup>3</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки семейства WSCP представляют собой тетрамерные комплексы, связывающие до четырёх молекул хлорофилла (Хл) *a* или Хл *a* + Хл *b*. Роль этих белков в растениях связана, предположительно, с активацией анти-стрессовых систем клетки. Важной особенностью строения WSCP является укладка молекул Хл в них в виде двух димеров; с точки зрения экситонных взаимодействий хромофорная группа WSCP может рассматриваться как тетрамер. Высокая термо- и фотостабильность белков WSCP делает их перспективной моделью для изучения пигмент-пигментных и пигмент-апобелковых взаимодействий, определяющих их уникальные физико-химические свойства.

В данной работе для изучения быстрых процессов релаксации энергии возбуждения в тетрамерном хромофорном комплексе был применен метод широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование». Была измерена абсорбционная динамика Хл *a* в белке WSCP класса Па из *Brassica oleracea* (BoWSCP) в диапазоне от 400 до 750 нм с временным разрешением 20 фс–200 пс. При возбуждении BoWSCP в области полосы Core на длине волны 430 нм наблюдалась безызлучательная внутримолекулярная конверсия  $S_3 \rightarrow S_1$  с характерным временем  $83 \pm 9$  фс. При возбуждении комплекса в области полосы  $Q_y$  на длине волны 670 нм (где, как показало моделирование спектров поглощения и анализ вторых производных, поглощает только Хл *a*) наблюдался релаксационный переход между двумя экситонными состояниями димера Хл со временем  $105 \pm 10$  фс. Анализ переходных спектров BoWSCP, полученных на задержках 50 фс и 200 пс показал, что на коротких задержках хромофорная группа BoWSCP ведет себя как экситонно-сопряженный димер.

Делокализация возбужденного состояния между экситонно-сопряженными молекулами Хл в тетрамере BoWSCP изменяется во времени и зависит от энергии возбуждения. Установлено, что при возбуждении BoWSCP в области полосы Core наблюдается сверхбыстрая фотохимическая реакция, обусловленная, предположительно, восстановлением триптофана вблизи центра связывания Хл.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-74-20155.

## Библиографические ссылки

1. Димеры хлорофилла *a* в составе водорастворимого белка BoWSCP фотосенсибилизируют восстановление цитохрома *c* / Ю. Н. Обухов [и др.] // Доклады Академии наук. Науки о жизни. 2023. Т. 509. С. 88–92.
2. Фемтосекундная динамика возбужденных состояний тетрамера хлорофилла в водорастворимом хлорофилл-связывающем белке BoWSCP / Д. А. Черепанов [и др.] // Биохимия. 2023. Т. 88, № 10. С. 1580–1595.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ $\beta$ -1,3-ГЛЮКАНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЛИСТЬЕВ ТОМАТА ПРИ ФУЗАРИОЗЕ

С. Н. Шпилевский, Л. Ф. Кабашникова

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

Одной из первоочередных задач современной биологии является выявление путей формирования устойчивости растений к патогенным микроорганизмам. Фузариозы – болезни множества культурных и дикорастущих растений, вызываемые несовершенными грибами рода *Fusarium* и распространенные во всех климатических зонах. Фузариозное увядание широко распространено на томатах и других пасленовых культурах во всех климатических зонах и вызывает значительные потери урожая и снижение его качества. В этой связи изучение функциональных и биохимических особенностей растений томата при инфицировании является важным этапом разработки критериев оценки их устойчивости к биотическому стрессу.

Объектом исследования служили растения томата сорта Тамара, выращенные в почвенной культуре до 2-месячного возраста в климатокамере при температуре 24 °С и освещенности 100 мкЕ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> с фотопериодом 14 ч. Затем растения переносили для испытаний на водопроводную воду. Для стимуляции иммунитета растений использовали водный раствор  $\beta$ -1,3-глюкана (фирма Sigma) в концентрациях 0,1; 0,05 и 0,01%. Обработку растений проводили методом опрыскивания, исходя из нормы расхода препарата (5 мл/1 растение). В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Инфицирование грибом *Fusarium oxysporum* sp. проводили через 48 ч после обработки глюканом путем внесения суспензии, содержащей 10<sup>6</sup> спор/мл из расчета (50 мл/1 растение) через корни в водную среду. Анализ листьев растений томата проводили через 72 ч после инокуляции патогеном.

Методом РАМ-флуориметрии изучена концентрационная зависимость изменения основных параметров индукции флуоресценции Хл в листьях томата, инфицированных грибом *Fusarium ox.* Заражение растений вызывало снижение максимального квантового выхода фотохимических реакций ФС 2 (Fv/Fm) на 7,5% и эффективного квантового выхода фотохимических реакций ФС 2 (Y(II)–Ффс2) в 3,35 раза по сравнению со здоровыми растениями. Обработка  $\beta$ -1,3-глюканом перед инфицированием растений во всех изученных концентрациях способствовала увеличению параметра (Fv/Fm) до контрольных значений. В результате использования глюкана наблюдалось также повышение эффективного квантового выхода ФС 2 (Y(II) в 2,4–2,7 раза по сравнению с инфицированными листьями, что, однако, не достигало уровня контрольных значений.

Атака патогеном вызывала повышение уровня фенольных соединений в листьях томата в 1,3 раза относительно контроля. Тогда как обработка  $\beta$ -1,3-глюканом перед инфицированием растений во всех изученных концентрациях способствовала увеличению этого показателя в 2,5 раза и более по сравнению с инфицированными листьями. При заражении грибом наблюдалось увеличение содержания пероксида водорода – наиболее стабильной формы АФК в листьях томата под действием повышенных концентраций  $\beta$ -1,3-глюкана (0,1–0,05%), а при более низкой концентрации (0,01%) содержание пероксида водорода оставалось на уровне контроля. Исходя из полученных данных наиболее низкая концентрация препарата является оптимальной и не вызывает усиление активности окислительных процессов в фотосинтезирующих тканях томата при фузариозе.

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод об одностороннем характере влияния всех изученных концентраций  $\beta$ -1,3-глюкана на функциональные и биохимические параметры здоровых и инфицированных растений томата.

## К 95-ЛЕТИЮ МАРИИ ТИХОНОВНЫ ЧАЙКА – ИЗВЕСТНОГО УЧЕНОГО В ОБЛАСТИ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ ФОТОСИНТЕЗА

**И. Д. Вологовский, Е. И. Слобожанина, Л. Ф. Кабашникова, Н. Г. Аверина**

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



31 декабря 2024 г. исполняется 95 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 нелистовых пластид. В 1965 году М.Т. Чайка была утверждена в ученном звании старшего научного сотрудника про специальности «биохимия растений».

В 1967 г. Мария Тихоновна связала свой дальнейший жизненный и творческий путь 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 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 внутривнутрипластных 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 озимого гексаплоидного тритикале и обнаружены достоверные генотипические различия по содержанию пигментов и показателям ультра- и мезоструктурной организации пигментного аппарата у форм и гибридов этой зерновой культуры. Показана высокая генетическая изменчивость признаков «содержание хлорофилла *a*» и «отношение 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, путем повышения устойчивости растений к неблагоприятным природным условиям, а также импортозамещение и снижение химической нагрузки на агроэкосистемы.

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-ти научных работ, в том числе 3-х 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 Годневе.

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.

Научные идеи М.Т. Чайка получили свое дальнейшее развитие в лаборатории прикладной биофизики и биохимии (до 2004 года лаборатория физиологии фотосинтетического аппарата), где под руководством члена-корреспондента Л.Ф. Кабашниковой развивается новое научное направление – стрессовая биофизика растений с целью разработки новых адаптивных и диагностических технологий для сельского хозяйства. Крупным научным достижением сотрудников лаборатории является разработка концепции повышения продуктивности и устойчивости растений хлебных злаков на основе оптимизации структурно-функционального состояния фотосинтетического аппарата, основные положения которой изложены в двух монографиях Л.Ф. Кабашниковой – «Фотосинтетический аппарат и потенциал продуктивности хлебных злаков» (2011 г.) и «Фотосинтетический аппарат и стресс у растений» (2014 г.). В последнее десятилетие основное внимание сотрудников лаборатории сконцентрировано на выяснении роли хлоропластов в реализации молекулярно-мембранных механизмов иммунного ответа культурных растений при инфицировании грибными патогенами. Основные результаты этих исследований изложены в коллективной монографии «Природные индукторы устойчивости растений к фитопатогенам: научные и практические аспекты применения» (2021 г.).

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.

# **ИММУНОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ**

## НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИНГИБИТОРЫ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ ПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ

**Т. М. Гараев, И. И. Юдин, Т. В. Гребенникова, А. Л. Гинцбург**

*ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия*

Важнейшая задача, стоящих перед наукой в XXI веке, является борьба с социально значимыми вирусными инфекциями, которые влияют на качество жизни населения. Основной проблемой применения противовирусных препаратов является генетическая изменчивость и вариабельность вирусных белков РНК-содержащих вирусов. Известно, что к настоящему времени практически все штаммы вируса гриппа А, вызывающие эпидемии, оказались полностью резистентными к препаратам адамантанового ряда. В свою очередь к вновь возникающим болезням, таким как COVID-19, средства этиотропной терапии только начинают разрабатываться и нуждаются в постоянном совершенствовании ввиду высокой генетической изменчивости циркулирующих штаммов коронавирусов. Таким образом, поиск новых ингибиторов репликации вирусов гриппа и SARS-CoV-2 является актуальной задачей.

Нами был предложен способ преодоления резистентности вирусов гриппа А к препаратам адамантанового ряда путем введения в молекулу аминокислот и пептидов. Такой способ позволил адаптировать противовирусные свойства синтетических соединений к вновь возникающим генотипам вируса гриппа А. Полученный ряд адамантил-аминокислот и пептидов способен ингибировать высокопатогенные штаммы вирусов гриппа А включая А/Н5N1. (Патенты РФ RU 2461544 C1; RU 2553991 C1; RU 2572102 C1). В дальнейших экспериментах адамантановый карбоцикл в молекулах ингибитора был заменен на 2-норборнануксусную кислоту (RU 2676699 C1), 2-хинальдинкарбоновой кислоту (RU 2624906 C1), 2-тиенилкарбоновые кислоты (RU 26178550 C1), а также *клозо*-декаборатные анионы (RU 2749006 C1) [1]. Исходя из выше представленных данных, нами предложена молекулярная модель ингибитора виропооринов [2].

Основная протеаза коронавирусов (3CL<sup>pro</sup>) признана одной из предпочтительных мишеней для создания ковалентно-связывающихся ингибиторов функции каталитической диады «His41-Cys145». Нами были получен ряд ингибиторов протеазы, с доказанной активностью *in vitro* в отношении SARS-CoV-2. Замена карбобензилоксикарбонильного остатка в пептидомиметике на 2-тиенилакриловый и 4-бифенилкарбоновый остаток позволили улучшить связывания препарата в сайте S3 активного центра 3CL<sup>pro</sup>. В экспериментах *in vitro* IC<sub>50</sub> соединений составила 5,8 мМ.

Таким образом, в Центре разработаны ряд противовирусных препаратов прямого действия с доказанной активностью в отношении вирусов гриппа и SARS-CoV-2. Наиболее перспективные из разработанных препаратов проходят доклинические исследования.

### Библиографические ссылки

1. New type of RNA virus replication inhibitor based on decahydro-closo-decaborate anion containing amino acid ester pendant group / V. V. Avdeeva [et al.] // J. Biol. Inorg. Chem. 2022. Vol. 27, iss. 4. P. 421–429.

2. *Одноворов А. И., Гараев Т. М., Гребенникова Т. В.* Молекулярная модель ингибитора ионного канала М2 вируса гриппа А // XI Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием "Инфекционные болезни в современном мире : эволюция, текущие и будущие угрозы" : сборник трудов XI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, Москва, 1–3 апреля 2019 года. Москва: 2019. – 260 с.

# РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ОЦЕНКИ ВОСПРИИМЧИВОСТИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР К ВИРУСУ ГРИППА НА ОСНОВАНИИ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУС-КЛЕТКА

**М. Н. Косенко, Г. С. Онхонова, А. Б. Рыжиков**

*ФБУ науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»  
Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия*

Ключевым аспектом снижения неблагоприятных последствий пандемий и эпидемий гриппа является достоверная оценка риска вирусов гриппа с пандемическим потенциалом. Целью работы является разработка алгоритма оценки восприимчивости клеток-мишеней к вирусу гриппа. Данный алгоритм будет использован в процессе создания методики количественной оценки трансмиссивности вируса гриппа, которая является важным компонентом для углубления мониторинга и выявления новых штаммов вируса гриппа с пандемическим потенциалом.

Оценка восприимчивости клеток-мишеней основывается на стохастической модели изотермы Ленгмюра. Подобный подход был ранее использован для оценки зависимости риска инфекции COVID19 от концентрации и аффинности антител против SARS-CoV-2. При этом допускается ряд упрощений: 1) поливалентное взаимодействие вирусной частицы с рецепторами на поверхности клетки рассматривается в терминах теории Ленгмюра как взаимодействие одной молекулы адсорбата с одним активным центром; 2) поверхность клеточной культуры рассматривается в качестве поверхности адсорбента с локализованными активными центрами. При данных упрощениях вероятность обнаружения  $n$  вирусных частиц, связанных с клеточными рецепторами:

$$p_n = \frac{r_n z^n}{\sum_{n=0}^N r_n z^n}; \quad z = \frac{k_{on}c}{k_{off} + k_{in}}; \quad r_n = \binom{1}{n!} \left( \frac{N!}{N^n(N-n)!} \right),$$

где  $k_{on}$  и  $k_{off}$  – константы скоростей адсорбции и десорбции,  $k_{in}$  – константа скорости проникновения вируса в клетку  $N$  – количество сайтов связывания на поверхности культуры и  $c$  – концентрация вирусных частиц. Аналогично далее рассматривается конкуренция процессов проникновения со скоростью  $k_{in}$  и деактивации со скоростью  $k_l$  вирусных частиц в клетке. С учетом того, что в этом случае достаточно определить вероятность для  $s = 0$ , можем перейти от распределения вероятностей (1) к распределению Пуассона. Следовательно, может быть получена численная оценка ID50 как концентрация вирусных частиц, при которой с вероятностью 50% произойдет успешное проникновение  $s \geq 1$  вирусов в клетку, и, как следствие, заражение клеточной культуры:

$$P(s \geq 1) = 1 - \exp \left( - \frac{k_{in} \sum_{n=1}^N n r_n \left( \frac{k_{on} ID_{50}}{k_{off} + k_{in}} \right)^n}{k_l \sum_{n=0}^N r_n \left( \frac{k_{on} ID_{50}}{k_{off} + k_{in}} \right)^n} \right) = \frac{1}{2}$$

В результате исследования была разработана теоретическая модель, описывающая заражение вирусом клеток-мишеней. Полученная модель связывает вероятность заражения с концентрацией вируса. Основными определяющими параметрами являются константы скоростей адсорбции, десорбции, проникновения и деградации вирусных частиц.

## ОПТИМИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ CAR-РЕЦЕПТОРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ CAR-EK КЛЕТОК

Ю. В. Лебедева<sup>1,2</sup>, А. В. Клыч<sup>2</sup>, Е. П. Вашкевич<sup>2</sup>, Т. В. Шман<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Республика Беларусь

В настоящий момент клеточная иммунотерапия с применением генетически модифицированных естественных киллерных (ЕК) клеток – CAR-EK клеток, является одним из перспективных, но малоизученных направлений терапии гематологических опухолей.

Выбор ЕК-клеток в качестве объекта модификации обусловлен наличием существенных преимуществ, в сравнении с Т-лимфоцитами: безопасность (отсутствие побочных эффектов), усиленная цитотоксичность, возможность амбулаторного наблюдения за пациентом и создание банка клеток [1]. Помимо когнатных клеточных взаимодействий обязательным компонентом иммунного ответа является присутствие гуморальных факторов. Одним из ключевых цитокинов, обуславливающих продолжительную экспансию ЕК-клеток, является ИЛ-15. Было предположено, что получение модифицированных ЕК-клеток, экспрессирующих на своей поверхности мембраносвязанный ИЛ-15, позволит продлить период высокой функциональной активности этих клеток.

Целью данной работы являлось создание рекомбинантной плазмиды, содержащей последовательности, кодирующие *antiCD19* химерный антигенный рецептор (CAR) и мембранный ИЛ-15 (*mIL15*).

В соответствии с целью работы были поставлены и выполнены следующие задачи:

- 1) Получение вектора на основе *pULTRA*, содержащего в конструкции последовательность *mIL15*;
- 2) Получение вектора на основе *pULTRA\_mIL15*, содержащего в конструкции последовательность *antiCD19CAR*.

**Объекты и методы исследования.** В работе использовали штамм *E. coli NEB Stable*. Антибиотик ампициллин для селекции трансформированных клонов добавляли на среду в концентрации 100 мкг/мл. Для получения фрагментов ДНК с навешанными рестрикционными сайтами *NheI* и *EcoRI* (*mIL15*) и *AsiGI* и *VamHI* (*antiCD19CAR*) использовали ПЦР с разработанными для данной цели прямыми и обратными праймерами. Помимо этого, использовали такие молекулярно-биологические методы как рестрикция и лигирование (лигаза фага Т4). В качестве метода визуализации фрагментов ДНК использовали электрофорез. Трансформацию проводили с использованием хлорида кальция. Плазмидную ДНК из бактерий *E. coli NEB Stable* выделяли с помощью набора Macherey-Nagel NucleoBond Xtra Midi. Для проверки полученных генетических конструкций использовали метод секвенирования по Сэнгеру.

**Результаты и их обсуждение.** В результате выполнения работы получили конструкцию на основе вектора *pULTRA – pULTRA\_antiCD19CAR\_mIL15*. В дальнейшем с использованием данной конструкции в составе лентивирусного вектора будут получены *antiCD19 CAR-EK* клетки, экспрессирующие *mIL15* и исследованы их функциональные свойства.

### Библиографические ссылки

1. Wang X., Zhao X. Y. Transcription factors associated with IL-15 cytokine signaling during NK cell development // Cell Development. Frontiers in immunology. 2021. Vol. 12. P. 3389.

## НОВЫЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНОЙ МИКРОГЛИИ: ТРИКУЛЬТУРА ГИППОКАМПА

**В. Н. Мальцева, С. Г. Гайдин**

*Институт биофизики клетки РАН - обособленное подразделение ФГБУ науки ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Россия*

Особый интерес среди глиальных клеток головного мозга представляют клетки микроглии, которые являются основными резидентными иммунными клетками ЦНС. Фагоцитоз, контроль активности нейронов и нейропротекция являются основными функциями микроглии направленными на поддержание гомеостаза и физиологической активности мозга. Микроглия проявляет пассивный фенотип в здоровом мозге, но становится высокоактивной при изменении физиологического состояния головного мозга, что происходит при нейровоспалении, повреждениях мозга и при различных нейродегенеративных заболеваниях. Недавние исследования показали, что реактивная микроглия обладает высокой гетерогенностью, при этом демонстрирует пластичность при ответе на различные патологии. Вышесказанное подчеркивает необходимость выявления специфичных состояний микроглии и изучения факторов, влияющих на них, и направленных на превращение микроглии в защитный фенотип, что может стать перспективной стратегией терапии нейродегенеративных заболеваний.

Классический протокол приготовления первичных нейрон-глиальных культур обеспечивает выживание и созревание нейронов, а также умеренную пролиферацию астроцитов, но, к сожалению, недостаточен для сохранения и созревания микроглии. Отсутствие микроглии делает невозможным проведение нейробиологических исследований, сопряжённых с моделированием нейровоспаления, сопровождающего множество патологий мозга. В связи с этим, на основе данных литературы относительно условий созревания и пролиферации клеток микроглии мы оптимизировали протокол приготовления первичных нейрон-глиальных культур гиппокампа таким образом, чтобы помимо нейрональных и глиальных клеток также получить функционально активную микроглию, то есть «трикультуру».

Нами были проверены комбинации ростовых факторов, включающие трансформирующий фактор роста (TGF $\beta$ ), интерлейкин 34 (IL-34) макрофагальный колониестимулирующий фактор (MCSF), холестерин. Было установлено, что использование комбинации TGF $\beta$ +IL-34+холестерин не приводило к увеличению количества микроглии, тогда как при использовании комбинации TGF $\beta$ +MCSF+холестерин количество микроглиальных клеток заметно увеличивалось. Для идентификации клеток трикультуры применяли метод иммуноцитохимического окрашивания с использованием антител к молекулярным маркерам нейронов, астроцитов и микроглии. Функциональную активность нейронов и астроцитов в полученных культурах оценивали по увеличению внутриклеточной концентрации Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) в ответ на добавление различных веществ, селективно активирующих ту или иную популяцию клеток. В свою очередь активность микроглии оценивали по способности индуцировать гибель клеток в культуре при добавлении липополисахарида.

Таким образом, мы отработали новый подход к культивированию клеток головного мозга, позволяющий получать трикультуру, состоящую из функционально активных нейронов, астроцитов и микроглии. Такой подход является перспективным для изучения молекулярных механизмов развития нейропатологий, сопровождаемых нейровоспалением.

Работа поддержана грантом РФФ №23-25-00014.

## ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММА ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ A/CHICKEN/THANH HOA/V1S5VTC/2020 (H9N2), СОДЕРЖАЩЕГО АДАПТИВНЫЕ МУТАЦИИ

**Г. С. Онхонова<sup>1</sup>, Е. А. Рухлова<sup>1</sup>, М. Н. Косенко<sup>1</sup>, С. В. Святченко<sup>1</sup>,  
Н. П. Колосова<sup>1</sup>, Tran Thi Nhai<sup>2</sup>, Bui Thi Huong<sup>2</sup>, А. Н. Кузнецов<sup>2</sup>,  
В. Ю. Марченко<sup>1</sup>, А. Б. Рыжиков<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*ФБГУ науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия*

<sup>2</sup>*Российско-Вьетнамский Тропический Научно-исследовательский и технологический  
центр, Ханой, Вьетнам*

Адаптивные мутации – это генетические изменения, которые дают вирусу селективное преимущество, позволяя ему лучше реплицироваться и распространяться в популяции. Изучение фенотипических свойств штаммов вируса гриппа направлено на понимание того, какие мутации могут влиять на характеристики и признаки этих штаммов. Фенотипические свойства вируса гриппа включают его антигенные свойства, динамику репликации, круг хозяев, чувствительность к противовирусным препаратам и ряд других свойств. Антигенные свойства относятся к способности вируса стимулировать иммунный ответ у инфицированных организмов. Динамика репликации вируса гриппа тесно связана с вирулентностью. Рецепторная специфичность вируса гриппа определяет круг хозяев, которые могут быть заражены. Чувствительность вируса гриппа к противовирусным препаратам обусловлена способностью последних ингибировать репликацию вируса.

В ряде стран Азии вирусы гриппа птиц А/Н9N2 постоянно циркулируют среди домашней птицы, спорадически инфицируя людей без тяжелых последствий. Однако, в последние годы новые штаммы вируса гриппа А/Н9N2 стали способны эффективно связываться с «человеческим» типом рецепторов и проявлять повышенную вирулентность у млекопитающих. Целью работы является изучение генетических и фенотипических характеристик штамма вируса гриппа птиц A/chicken/ThanhHoa/V1S5VTC/2020 (H9N2), циркулирующего на территории Социалистической Республики Вьетнам.

Геномную последовательность получали методом NGS-секвенирования. Анализ мутаций проводили с использованием онлайн-сервера FluSurver (GISAID). Чувствительность к противовирусным препаратам оценивали с помощью флуорометрического анализа ингибирования нейраминидазы с субстратом MUNANA. Рецепторную специфичность исследовали с помощью метода биослойной интерферометрии. Для предсказания структуры белка использовали онлайн-ресурс ColabFold v1.5.5: AlphaFold2. Изучение сайта связывания гемагглютинина с аналогами рецепторов проводили методом молекулярного докинга с использованием онлайн-сервера AutoDock Vina. Для прогнозирования значений аффинности связывания использовали онлайн-ресурс Prodigy. Выявлены аминокислотные замены в гемагглютинине, способные, в соответствии с прогнозом, увеличить аффинность связи с «человеческим» рецептором. Экспериментально показано наличие связывания с аналогом «человеческого» рецептора, а также с сульфатированным вариантом «птичьего» типа в отличие от несulfатированного варианта. Данные по чувствительности к противовирусным препаратам показали, что нейраминидаза исследуемого штамма ингибируется осельтамивиром и занамивиром. Полученные результаты расширяют понимание эволюции штаммов вируса гриппа птиц А/Н9N2 и способствуют разработке эффективных мер контроля новых штаммов с пандемическим потенциалом.

## ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЦИТОКИНОВ

В. А. Прокулевич<sup>1</sup>, М. И. Потапович<sup>1</sup>, Д. В. Копылева<sup>1</sup>, Е. В. Дуж<sup>2</sup>,  
Н. Г. Антоневиц<sup>2</sup>, А. Е. Гончаров<sup>2</sup>, И. М. Бушмакина<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Активно развивающимся и перспективным направлением в борьбе с онкологическими заболеваниями является создание биомедицинского клеточного продукта (БМКП) на основе моноцитарных дендритных клеток (ДК). Несмотря на то, что клеточная терапия хорошо себя зарекомендовала с точки зрения эффективности, стоимость лечения является довольно высокой. Это обусловлено использованием дорогостоящих импортных реагентов – рекомбинантных человеческих (рч) фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- $\alpha$ ), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и интерлейкина-4 (ИЛ-4). Ввиду отсутствия отечественных аналогов разработка технологии производства цитокинов позволит осуществить импортозамещение зарубежных субстанций и удешевит процесс получения БМКП.

Целью работы являлись разработка технологии получения и сравнительное изучение биологической активности коммерческих цитокинов рчГМ-КСФ, рчИЛ-4, рчФНО- $\alpha$  и отечественных аналогов.

Нуклеотидные последовательности генов цитокинов, оптимизированные для экспрессии в клетках бактерий *Escherichia coli*, клонировали в составе векторов рЕТ24b(+) и рD861-SR, трансформировали *E.coli* BL21-Gold(DE3). РчГМ-КСФ, рчИЛ-4 и рчФНО- $\alpha$  синтезировались в количестве, превышающем 30% от общего белка клеток, при этом рчФНО- $\alpha$  накапливался в нерастворимой форме, образуя тельца включения (ТВ).

ТВ отмывали, белки ренатурировали методом разведения и очищали с помощью ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Степень очистки цитокинов превысила 95%, что согласуется с целями их дальнейшего использования.

Для оценки *in vitro* биологической активности определяли иммунофенотип и жизнеспособность ДК, культивируемых с исследуемыми образцами рчГМ-КСФ, рчИЛ-4, рчФНО- $\alpha$  с помощью метода проточной цитометрии.

Установлено, что все разработанные цитокины приводили к дифференцировке моноцитов в ДК и их созреванию, не оказывая токсического эффекта на клетки. Биологическая активность рчИЛ-4 и рчГМ-КСФ была сопоставима с коммерчески доступными аналогами, что подтверждалось высокой экспрессией CD209 (>90%).

Биологическая активность исследуемого рчФНО- $\alpha$  была выше коммерчески доступного аналога, о чем свидетельствовала более высокая экспрессия CD83 рчФНО- $\alpha$  – 42,6 (34,1–47)%, коммерческий препарат – 14,4 (8,7–23,6)%,  $p < 0,05$ .

В результате использования полученных по разработанной технологии рчГМ-КСФ, рчИЛ-4 и рчФНО- $\alpha$  для дифференцировки моноцитов в ДК была получена опытная партия БМКП, которая соответствовала всем критериям качества: подлинность (экспрессия ДК CD209 составила 91,88 (90,37–94,67)%, жизнеспособность – 96,27 (95,76–97,0)%, экспрессия CD83 – 42,6 (34,1–47)%.

Таким образом, разработана технология производства рчГМ-КСФ, рчИЛ-4 и рчФНО- $\alpha$  в прокариотической системе экспрессии. Результаты оценки биологической активности цитокинов свидетельствуют о их конкурентноспособности с коммерческими препаратами иностранного производства.

## МЕТОД ГЕНЕРАЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ИЗ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

И. В. Романова<sup>1</sup>, А. Е. Гончаров<sup>1</sup>, Л. З. Шереметьева<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Учреждение здравоохранения «3-я городская клиническая больница им. Е.В. Клумова» г. Минска, Беларусь

**Введение.** Перспективным направлением в диагностике аллергических реакций немедленного типа представляет собой оценка аллерген-специфической активации тучных клеток. Тучные клетки обильно представлены преимущественно в коже и слизистых и отсутствуют в периферической крови. В достаточном количестве тучные клетки можно получить с помощью методов культивирования клеток-предшественников, например, из гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) пуповинной крови.

**Материалы и методы.** Всего в исследовании было использовано 19 образцов пуповинной крови. Гемопоэтические стволовые клетки были выделены из мононуклеарных клеток с помощью положительной иммуномагнитной селекции CD34<sup>+</sup>-клеток (Miltenyi Biotec, Германия). ГСК культивировали с использованием бессывороточной питательной среды StemPro-34 SFM (Gibco (Thermo Scientific), США) с коктейлем цитокинов: SCF (100 нг/мл) и IL-6 (50 нг/мл). С целью эффективной пролиферации ГСК добавляли IL-3 (10 нг/мл) в течение первых двух недель культивирования. Начиная с четвертой недели культивирования с целью созревания клеток добавляли АВ0-сыворотку (10%). Каждые 5–6 дней оценивали поверхностные маркеры на культивируемых клетках: CD117, CD203c, FcεRI, CD63, CD107a. Для оценки специфической активации и дегрануляции использовали моноклональное антитело к IgE (клон 4H10).

**Результаты.** В зависимости от объема образца пуповинной крови среднее количество выделенных ГСК составило  $0,5 (0,18–0,96) \cdot 10^6$  клеток. Установлено, что начиная с 10–11 суток культивирования не менее 60% клеток экспрессировали линейный маркер для тучных клеток CD203c. При этом сохранялась экспрессия рецептора фактора роста тучных и стволовых клеток молекулы CD117. Также оценивали экспрессию высокоаффинного рецептора к IgE молекулы FcεRI на двойных позитивных клетках CD117<sup>+</sup>CD203c<sup>+</sup>. Интенсивность экспрессии FcεRI значительно усиливалась к концу 5-й недели культивирования после добавления аутологичной сыворотки. При оценке IgE-опосредованной активации тучные клетки демонстрировали экспрессию маркеров дегрануляции: CD107a и CD63.

**Выводы.** Полученные функционально зрелые тучные клетки могут быть использованы с целью оценки IgE-опосредованной активации при постановке теста активации тучных клеток (MAT – mast cell activation test) для диагностики аллергических реакций немедленного типа.

### Библиографические ссылки

1. Mast cell activation test in the diagnosis of allergic disease and anaphylaxis / R. Bahri [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. 2018. Vol. 142, iss. 2. P. 485–496.
2. A novel functional mast cell assay for the detection of allergiess / N. Zbaren [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. 2022. Vol. 149. P. 1018–1030.

## ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЛАВНОГО АДГЕЗИНА СТРЕПТОКОККОВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ КАРИЕС

С. П. Рубникович, В. В. Хрусталёв, О. В. Хрусталёва

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Главный адгезин *Streptococcus mutans* и *Streptococcus sobrinus* (AgI/II, P1, SpaP, AgV или PAc) считается мишенью для выработки антител класса IgA, препятствующих прикреплению этой бактерии к поверхности зуба и развитию кариеса. Известно, что лектин-подобный бета-структурный домен этого адгезина, обогащённый остатками серина, способен связывать декстраны, в свою очередь адсорбированные на зубном налёте [1], а его «ствол», представляющий собой длинную обогащённую аланином альфа-спираль, переплетённую с полипролиновой спиралью, может прикрепляться к коллагену, входящему в состав дентина, при повреждении поверхности эмали [2].

Целью работы была оценка степени варибельности фрагментов главного адгезина *S. mutans* и *S. sobrinus*, перспективных для создания пептидной вакцины против кариеса.

В качестве материала использованы все доступные в международных базах данных аминокислотные последовательности главного адгезина *S. mutans* (200 последовательностей) и *S. sobrinus* (28), длина которых превышает 1000 аминокислотных остатков. Выравнивание проводили с помощью программы MEGA 5.2 с использованием матрицы PAM.

Анализ последовательностей главного адгезина *S. mutans* показал, что наиболее варибельным фрагментом этого белка является лектин-подобный домен. В N-концевой части этого домена находится альтернативный фрагмент белка (замены в 30 из 59 сайтов) у 4,5% исследованных последовательностей. В C-концевой части того же домена находится ещё одна такая «вставка» (замены в 29 из 72 сайтов), характерная для 43,5% исследованных последовательностей. Антитела к упомянутым выше фрагментам адгезина будут специфичными лишь для какой-то части штаммов *S. mutans*. При этом как в аланин-богатой, так и в пролин-богатой области такой мозаичности не выявлено.

Гомологичный белок *S. sobrinus* отличается противоположной тенденцией в накоплении варибельных сайтов: аланин-богатая область содержит 14% варибельных сайтов, лектин-подобный домен содержит 3% варибельных сайтов, а пролин-богатая область – 9%. Если *S. sobrinus* преимущественно прикрепляется к поверхности зуба за счёт связывания декстринов с помощью лектин-подобного домена, то *S. mutans* чаще использует для прикрепления к ней «ствол» главного адгезина, способный к связыванию с коллагеном. Тот фрагмент главного адгезина, который в наибольшей степени необходим данному виду бактерии, подвергается более жёсткому отрицательному отбору. С целью разработки пептидной вакцины против кариеса целесообразно использовать консервативный фрагмент «ствола» главного адгезина *S. mutans*. Для борьбы с *S. sobrinus* более целесообразным кажется использование всего лектин-подобного домена. Не менее перспективным путём воспрепятствования прикрепления *S. sobrinus* является ингибирование его экзоферментов, синтезирующих декстраны из сахарозы, с помощью низкомолекулярных соединений.

### Библиографические ссылки

1. Characterization of the dextran-binding domain in the glucan-binding protein C of *Streptococcus mutans* / Y. Takashima [et al.] // J. Appl. Microbiol. 2015. Vol. 119. P. 1148–1157.
2. Nanoscale dynamics of streptococcal adhesion to AGE-modified collagen / C. Leiva-Sabadini [et al.] // J. Dent. Res. 2023. Vol. 102. P. 957–964.

## ИЗМЕНЕНИЕ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АФТОЗНОМ СТОМАТИТЕ

**Н. А. Эргашев<sup>1</sup>, Э. Ж. Комилов<sup>1</sup>, Б. Г. Йулдошев<sup>1</sup>, Л. С. Кучкарова<sup>2</sup>,  
Х. П. Камилов<sup>3</sup>, К. А. Тахирова<sup>3</sup>, А. А. Кадырбаева<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биофизики и биохимии при НУУз, Ташкент, Узбекистан*

<sup>2</sup>*Национальный университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан*

<sup>3</sup>*Ташкентский государственный стоматологический институт, Ташкент, Узбекистан*

Активность щелочной фосфатазы снижается при различных воспалительных заболеваниях кишечника по сравнению с контролем [1]. Кроме того, при болезни Крона в язвах наблюдается гранулематозное воспаление, где больше макрофагов и Т-лимфоцитов, а при афтозном стоматите показан морфологически фиброзный воспалительный процесс [2]. Показано, что при болезни Крона снижается разнообразие кишечной микробиоты и наблюдается бактериальный дисбаланс [3]. Таким образом, активность щелочной фосфатазы изучали у животных с экспериментальным афтозным стоматитом.

При экспериментальном афтозном стоматите изучали активность щелочной фосфатазы в нижнем отделе тонкой кишки, в толстой кишке и в крови. В данном случае при экспериментальном афтозном стоматите экспериментальным животным – беспородным белым крысам перорально вводили бензилпенициллин натрия в дозе 50 мг/кг в течение 4 месяцев. После этого под нембуталовым наркозом (35 мг/кг) в прямую кишку с помощью шприца со специальной иглой на 7 см внутрь вводили 1,0 мл 4%-ной уксусной кислоты. Такая обработка проводилась 2 раза в неделю в течение 4–5 недель. Анализы проводились при появлении симптомов стоматита в полости рта. Активность щелочной фосфатазы определяли с использованием набора Cypress Diagnostics.

В результате экспериментов выяснено, что активность щелочной фосфатазы в крови подопытных животных составила  $105,2 \pm 3,59$  МЕ/л, тогда как активность фермента у контрольных животных составила  $135,8 \pm 3,96$  МЕ/л. Активность этого фермента в нижнем отделе тонкой кишки подопытных животных составила  $7039,0 \pm 289,1$  МЕ/л, тогда как показатель фермента у контрольных животных составил  $9715,5 \pm 874,3$  МЕ/л. Активность щелочной фосфатазы в толстом кишечнике у подопытных животных составила  $2427,7 \pm 71,5$  МЕ/л, а у контрольных животных ферментный показатель –  $5928,8 \pm 568,0$  МЕ/л.

Как видно из полученных результатов, при экспериментальном афтозном стоматите наблюдалось снижение активности фермента по сравнению с контролем. Как уже говорилось выше, снижение активности фермента отмечалось при воспалительных заболеваниях желудочно-кишечном тракте, в частности, воспалительных заболеваниях кишечника. Кроме того, было показано, что кишечная щелочная фосфатаза является защитным фактором против воспаления кишечника [4].

### Библиографические ссылки

1. Intestinal alkaline phosphatase in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease / K. Molnár [et al.] // World J Gastroenterol. 2012. Vol. 18, iss. 25. P. 3254–3259.

2. *Feleshtynska O. Y., Dyadyk O. O.* Substantiation of diagnosis and treatment of chronic recurrent aphthous stomatitis in crohn's disease // Wiad Lek. 2020. Vol. 73, iss. 3. P. 512–516.

3. *O'Brien C. L., Kiely C. J., Pavli P.* The microbiome of Crohn's disease aphthous ulcers // Gut Pathog. 2018. Vol. 10. P. 44.

4. Intestinal alkaline phosphatase inhibits the proinflammatory nucleotide uridine diphosphate / A. K. Moss [et al.] // Amer J Physiol. 2013. Vol. 304, iss. 6. P. 597–604.

## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Abdullayeva G.T., 98  
Asrarov M.I., 98  
Barczewski M., 174  
Bui Thi Huong, 363  
Dzhagarov B.M., 33, 310  
Faletrov Y.V., 32  
Frolova N.S., 32  
Gilevich S.N., 33  
Goltsev M.V., 172, 174  
Horetski M.S., 32  
Kir D., 172  
Lepeshkevich S.V., 33  
Lutpillayev G.H., 98  
Mansurov V.A., 172  
Parkhats M.V., 33, 310  
Pasiuk H.A., 172  
Rabushka L.V., 174  
Sazanovich I.V., 33  
Schimmel Th., 174  
Shalukho T.A., 174  
Shman T.V., 174  
Soliyev N.N., 98  
Towrie M., 33  
Tran Thi Nhai, 363  
Trushel N.A., 172  
von Borczyskowski C., 308, 310  
Weinstein J.A., 33  
Yantsevich A.V., 33  
Zenkevich E.I., 308, 310  
Абашкин В.М., 35, 299  
Аверина Н.Г., 353  
Агеева М.Н., 320  
Адзериho И.Э., 227  
Айбуш А.В., 316, 351  
Акинина М.Д., 232  
Аксючиц А.В., 80  
Алексеева М.И., 37  
Алиева С.Э., 218  
Аляхнович Н.С., 229  
Амазгбери Н.В., 67, 227, 294  
Ананич Т.С., 340, 347  
Ананкина А.А., 242  
Анацкая Л.Н., 183  
Анкудинов А.В., 103  
Аносов А.К., 221  
Антоневич Н.Г., 364  
Антоненко Ю.Н., 152  
Антонова О.Ю., 249, 289  
Арабей С.М., 73  
Арзамазкина К.И., 100, 113, 137  
Арсеньев А.С., 42  
Артемчук Я.Н., 143  
Артемьев М.В., 305  
Бабаева Г.Х., 102  
Бабенкова И.В., 239, 241  
Баженов П.А., 146, 180  
Байжуманов А.А., 247  
Байрамуков В.Ю., 103  
Байроченко Д.С., 38  
Балабушевич Н.Г., 93, 285, 286  
Баланчук А.Н., 104  
Баран Л.В., 185, 282  
Баранчиков А.Е., 121, 132  
Баркун М.И., 325  
Барышев А.С., 282  
Баскаев А.А., 273  
Басырева Л.Ю., 167  
Батищев О.В., 136  
Башкиров П.В., 40  
Белозор А.С., 78  
Белько Н.В., 41  
Бельчиков В., 169  
Беякова Т.А., 274  
Бережнов А.В., 106, 133, 166, 224  
Березин Д.Б., 198  
Бершакский Я.В., 42  
Беспалко К.Р., 77  
Богданёнок А.А., 279  
Богданов А.А., 107, 126, 176, 275, 296  
Богданов Ал.А., 48, 179, 213  
Богданов Ан.А., 107, 176, 275  
Богданова А.В., 41, 276, 294  
Большакова О.И., 298  
Бондаренко А.В., 189  
Бондаренко В.Ю., 139, 156  
Борискин В.С., 82  
Бочаров Э.В., 42, 43, 45  
Бражко В.А., 77  
Брацун Д.А., 47, 130  
Брилкина А.А., 320

Бринкевич С.Д., 66  
Бритиков В.В., 42, 43, 45  
Бритикова Е.В., 42, 43, 45  
Брысякин Е.Р., 289  
Бугай А.Н., 193, 276  
Буглак А.А., 238, 278  
Будаговская О.Н., 312  
Будаговский А.В., 312  
Будаговский И.А., 312  
Бузмаков М.Д., 47  
Бурдаков В.С., 296  
Бурдаков В.С., 48, 107, 176, 179, 213  
Бурко А.А., 189  
Бутенко А.В., 109  
Бушмакина И.М., 364  
Быков Г.А., 178  
Ванина Д.А., 285  
Варивончик М.В., 118  
Варижук А.М., 218  
Варламова Е.А., 136  
Варфоломеева Е.Ю., 103, 110, 164, 266  
Василевич И.Б., 125  
Вахрушева Т.В., 167, 218  
Вачинская А.В., 314  
Вашкевич Е.П., 251, 269, 361  
Вейко А.Г., 120  
Венская Е.В., 215, 229  
Веремейчик М.В., 71  
Вересов В.Г., 57, 91  
Верлов Н.А., 48, 107, 176, 179, 213  
Верхолашин М.В., 289  
Вершиловская И.В., 328  
Ветошкина Д.В., 337  
Вечерек М.С., 139, 315  
Вечтомова Ю.Л., 238, 316  
Викс Т.Н., 317  
Винокуров А.Ю., 146, 148, 180  
Владимирская Т.Э., 227  
Воденеев В.А., 320  
Водопьянова А.В., 265  
Войнаровский В.В., 217, 279  
Войтенко Д.А., 111  
Волков А.В., 253  
Волков В.В., 49, 225  
Волотовский И.Д., 109, 160, 353  
Волынский П.Е., 42  
Волынчук Н.Н., 319  
Воропай Е.С., 76, 236, 347  
Выхристюк Ю.В., 239, 241  
Габриелян Л.С., 139, 315  
Габрусёнок П.В., 50  
Гайдин С.Г., 24, 133, 135, 362  
Галец-Буй И.В., 52  
Галкина С.В., 169  
Галюк Е.Н., 181  
Гамбарян С.П., 157  
Ганиева Р.А., 86, 234  
Гао Ю., 288  
Гапеева Т.А., 54  
Гараев Т.М., 358  
Гармаза Ю.М., 112, 201, 301  
Гасимова В.Х., 86, 234  
Гаспарян В.К., 112  
Гафуров М.Б., 150  
Гвоздев М.Ю., 266  
Генин В.Д., 194  
Герман А.Д., 100, 113, 137  
Гинцбург А.Л., 358  
Гладков Л.Л., 328, 329  
Гольцева А.В., 167  
Гончарик Р.Г., 115  
Гончаров А.Е., 189, 364, 365  
Гончарова Н.В., 183, 255, 261  
Горбач Е.И., 269  
Горбунов Н.П., 204  
Гордейчик И.Н., 334  
Гордых С.А., 113  
Горелкин П.В., 110  
Горелов С.В., 110  
Горудко И.В., 185, 204, 280, 282, 285, 286  
Горшкова Ю.Е., 284  
Гостев Ф.Е., 351  
Гребенникова Т.В., 358  
Григоренко Е.А., 201  
Григорьев С.В., 103  
Григорьева Д.В., 185, 204, 280, 282, 285, 286  
Гриусевич П.В., 116  
Грицай У.С., 194  
Гришина А.И., 320  
Гришко Д.А., 208  
Губаревич К.И., 100, 113, 137  
Губич О.И., 187  
Гусаков Г.А., 185, 214, 280  
Гусакова В.С., 117, 188

Гусакова С.В., 117, 188  
Гусев С.А., 167  
Гусейнова Н.Б., 86, 234  
Давыденко А.И., 189  
Дадашева С.Б., 86, 234  
Даркович М.А., 334  
Дегтерева Н.С., 342  
Демидик Е.А., 165  
Демидчик В.В., 23, 37, 78, 80, 116, 137, 138, 139, 156, 306, 315  
Демкин В.П., 232  
Дениева З.Г., 136  
Денисов А.А., 118, 253  
Джагаров Б.М., 71  
Джимак С.С., 77  
Дмитриев Е.В., 226  
Долговечная В.В., 127  
Доманская И.Н., 321, 326  
Драпеза А.И., 134  
Дремук И.А., 191, 200  
Дубовская Т.Г., 215, 243  
Дубровский М.Л., 312  
Дудинова О.Н., 131, 340  
Дуж Е.В., 364  
Душанов Э.Б., 193  
Емельянова А.В., 323  
Ерёмин Н.В., 95  
Ермилова Т.И., 196, 198, 269  
Ермоленко Е.М., 304  
Ерофеев А.С., 110  
Ефимова Е.С., 194  
Ефимова Е.С., 245  
Ефременко А.В., 141  
Ефремов Р.Г., 42  
Жаворонкова А.С., 320  
Жогла В.А., 35, 288  
Заводник И.Б., 120  
Зайцева Т.Н., 117, 188  
Зеньков А.В., 61  
Зинченко В.П., 24  
Змитрович И.В., 80  
Зорин В.П., 196, 198, 292  
Зорина Т.Е., 196, 198, 292  
Зубко В.С., 167  
Зубрицкая Г.П., 200, 201  
Зуёнок С.С., 138  
Зыкова Д.Д., 324, 336, 343, 346  
Иванов А.А., 203  
Иванов Б.Н., 337  
Иванов В.А., 204  
Иванова А.А., 206  
Иванова Л.А., 48, 121, 132, 179  
Ивановская Е.В., 111  
Ивашкевич Д.Е., 280  
Игнатова А.А., 157, 235, 254  
Игнатова Л.К., 337  
Игнатъева М.М., 122  
Игнатъев-Качан А.О., 35  
Ильин А.Ю., 55  
Ильич Т.В., 120  
Ильющик И.А., 124  
Ионова А.Г., 255  
Ионова Е.Д., 207, 225  
Исакова-Сивак И.Н., 30  
Йулдошев Б.Г., 367  
Кабачевская Е.М., 54, 115, 160, 325  
Кабашникова Л.Ф., 26, 143, 317, 326, 334, 352, 353  
Кадырбаева А.А., 367  
Казаков М.С., 148, 180  
Камилов Х.П., 367  
Канев И.Л., 249, 289  
Касич А.С., 214  
Каскех В., 196, 292  
Касьяненко Н.А., 81, 291  
Качан А.В., 270  
Кашевский С.Б., 302  
Квачева З.Б., 125, 265  
Кизино Е.М., 191  
Кинжалов М.А., 81  
Кирпичников М.П., 141  
Кирсанов Р.С., 152  
Кленицкий Д.В., 328, 329  
Клименко В.В., 126  
Клименкова О.В., 256  
Климович О.В., 200  
Клыч А.В., 269, 361  
Коблов И.В., 196, 198, 292  
Ковалев Р.А., 103, 266  
Ковалёв Р.А., 164  
Коваленя Т.А., 120  
Козел А.В., 149  
Козел Н.В., 115, 139, 315, 330  
Козин С.В., 208  
Козлякова О.В., 203  
Козячая А.С., 258

Колесникова И.С., 169  
Колмогоров В.С., 110  
Колосова Н.П., 363  
Колчина А.О., 95  
Комилов Э.Ж., 367  
Кононов А.И., 278  
Константинов Ф.О., 57, 91  
Константинова А.Н., 136, 324, 336  
Копица Г.П., 121, 132  
Коптяева М.И., 294  
Копылева Д.В., 364  
Корень С.В., 276  
Королевич А.Э., 116  
Королик А.К., 203  
Корпусова Е.И., 140  
Косенко М.Н., 360, 363  
Косенков А.М., 133, 135  
Космачёва С.М., 255  
Костарев К.В., 130  
Костевич В.А., 204  
Костюченко Н.С., 59  
Котов Д.А., 80  
Кохан А.Ю., 127, 129, 189, 243  
Кочеткова О.Ю., 249  
Кошель С.А., 116  
Кравченко И.Е., 196, 198, 292  
Краецкая О.Ф., 209, 211  
Красняков И.В., 130  
Критцкая К.А., 133  
Крицкая К.А., 106, 135, 166, 224  
Крицкий М.С., 316, 351  
Крук Н.Н., 328, 329  
Крученюк Ю.В., 131  
Крылов А.Б., 328, 329  
Крытынская Е.Н., 104, 258  
Крюкова Е.А., 141  
Ксендзова Г.А., 266  
Куделич О.А., 256  
Кудряшева Н.С., 61  
Кузнецов А.Н., 363  
Кузнецов А.С., 42  
Кузнецова Е.А., 180  
Кузьмина Н.В., 42  
Кулагова Т.А., 41, 193, 227, 276, 294  
Кулаков И.А., 48, 179, 213  
Кулик В.К., 193, 276  
Кульминская А.А., 121, 132  
Курьянчик Т.Г., 115, 323, 330  
Кустов А.В., 198  
Кухнинова А.А., 82  
Куцевол Н.В., 292  
Кучкарова Л.С., 367  
Кушнерова Е.В., 263  
Кью Дж., 52  
Лазарев В.Н., 218  
Лапшина Е.А., 120  
Ларюшкин Д.П., 24, 133, 135  
Ласюков Е.А., 251  
Лахвич Ф.Ф., 62  
Лебедев В.Т., 298  
Лебедев Д.В., 121, 132  
Лебедева С.Ю., 239, 241  
Лебедева Ю.В., 269, 361  
Лепешкевич С.В., 71  
Лесовой Д.М., 42  
Леусенко И.А., 340  
Лобан В.А., 134  
Ловягина Е.Р., 332  
Логинова Н.В., 266  
Логунов К.Т., 80  
Локтюшкин А.В., 332  
Лубневская Г.Г., 203  
Луговский А.А., 76, 214, 280  
Луговский А.П., 41, 237, 347  
Лукша В.И., 143, 319, 334  
Лукьяненко Л.М., 215  
Лукьянова К.А., 67  
Луцкович Д.В., 260  
Лю Г., 247  
Люля А.С., 165  
Ляшенко Л.С., 347  
Мажораль Ж.П., 52  
Майоров В.П., 336  
Майоров С.А., 133, 135  
Макаров А.Ю., 64, 225  
Максимович А.В., 261  
Максимчик Ю.З., 75  
Макшанова Н.С., 296  
Малахов В.И., 261  
Малибаева А., 24  
Малиборский А.Я., 66  
Мальтанова А.М., 41  
Мальцева В.Н., 362  
Мамедова Х.Х., 86, 234  
Маноян Д.Г., 139  
Маноян Дж.Г., 315

Мартинович Г.Г., 217, 279  
Мартинович И.В., 217, 279  
Марченко В.Ю., 363  
Маскевич А.А., 76  
Маскевич С.А., 220  
Матвеевкова Т.Д., 161  
Матусевич М.В., 285  
Махина О.Ю., 200  
Махонько А.А., 136  
Мацкевич В.С., 80, 100, 113, 137, 149, 163, 315  
Мелешко А.Н., 260, 263, 270  
Мельникова Е.А., 67  
Мельничук С.В., 232  
Микулич А.В., 340  
Милойкович Л.А., 221  
Миндукшев И.В., 157  
Мисюкевич А.Ю., 262  
Митчел Вальдес-Соса, 215  
Митьковская Н.П., 201  
Михалева Т.Д., 116  
Михальчик Е.В., 93, 222, 285, 286  
Мицкевич Е.Д., 214  
Мищуков А.А., 145  
Моисеенко В.М., 126, 176, 275  
Молодцова И.В., 82  
Молчан О.В., 321, 326  
Мороз Г.Д., 218  
Мосиевич Д.В., 93  
Мотевич И.Г., 220  
Муравицкая А.О., 138, 139, 315  
Мурина М.А., 221, 222, 286  
Мусаев Н.А., 102  
Мухаметшина А.С., 269  
Мыслейко М.А., 315  
Нагорный Р.К., 340, 347  
Надеев А.Д., 106, 166, 224  
Надеева Е.М., 337  
Найда Е.Н., 201  
Наквасина М.А., 140  
Неверов К.В., 351  
Некрасова О.В., 141, 254  
Никандров В.Н., 124  
Никифоров А.В., 118  
Новиков В.В., 82  
Новикова В.А., 124  
Обухов Ю.Н., 351  
Обыденный С.И., 145  
Онхонова Г.С., 360, 363  
Орешко О.В., 67  
Орлов Н.А., 141  
Орлович В.А., 72  
Осипов А.Н., 49, 64, 84, 207, 225, 239, 241, 242  
Осипова А.В., 189  
Осипович Н.П., 266  
Осташева Н.В., 125  
Ощепкова Ю.И., 237  
Павич Т.А., 55, 94  
Павлов К.В., 42  
Падня П.Л., 299  
Панада Я.В., 69  
Панарин А.Ю., 297  
Панасенко О.М., 28, 93, 167, 204, 218, 285, 286  
Пантелеев М.А., 29, 111, 145, 157, 178, 235  
Пантина Р.А., 103  
Паремузова О.Ф., 208  
Пархоменко В.А., 214, 280  
Пархоц М.В., 71  
Паршина Е.Ю., 247  
Пашкевич В.И., 187  
Пашкевич Л.В., 143, 319, 326, 334  
Пашкова О.Л., 112  
Першин С.М., 72  
Першукевич П.П., 73  
Песняк А.В., 75  
Петрова А.О., 82  
Петухов В.И., 226  
Пинчук С.В., 109, 125, 265  
Пищальников Р.Ю., 339  
Плавская Л.Г., 340, 347  
Плавский В.Ю., 131, 340, 347  
Плигин Е.И., 76  
Плюснина Т.Ю., 342, 350  
Побойнев В.В., 88  
Погонялова М.Ю., 146, 180  
Подоплелова Н.А., 145  
Поздеева Л.Е., 343  
Позиллов М.К., 150  
Позняк С.К., 41  
Покладок Е.С., 263  
Полешко А.Г., 125, 262, 265  
Помогаев В.А., 278  
Пономаренко Е.А., 157

Попко Н.М., 220  
 Попов Д.Ю., 148, 180  
 Потапнев М.П., 183, 255, 256  
 Потапович М.И., 364  
 Прищепчик Ю.В., 115  
 Прокопенко Н.Д., 340  
 Прокофьев И.И., 127, 215  
 Прокулевич В.А., 364  
 Пушкина А.А., 149  
 Пшемьский М.А., 117  
 Пшибытко Н.Л., 80, 306, 314, 345  
 Ракитина Т.В., 42  
 Рахимов А.Д., 150  
 Реут В.Е., 282  
 Решетникова О.В., 77  
 Ризниченко Г.Ю., 342, 350  
 Ринейская О.Н., 62, 181, 304  
 Родионова Н.Н., 82  
 Розанова О.М., 274  
 Рокицкая Т.И., 152  
 Романова И.В., 365  
 Ронищенко Б.В., 297  
 Рошупкин Д.И., 221, 222  
 Рубин А.Б., 342, 350  
 Рубникович С.П., 366  
 Рудак Ю.И., 154  
 Руденко Н.Н., 337  
 Руденко Т.В., 232  
 Рукояткин Н.С., 77  
 Русакович А.А., 78, 80, 314  
 Рухлова Е.А., 363  
 Рыжиков А.Б., 360, 363  
 Рычихина Е.Д., 73  
 Рязанцева П.Е., 135  
 Саваневская Е.Н., 154  
 Савенко П.О., 37  
 Савицкий А.С., 156, 315  
 Савко А.И., 120  
 Савченко Г.Е., 317, 349  
 Садовничук М.Д., 229  
 Сак Е.В., 282  
 Самович Т.В., 115, 139, 315  
 Самохина В.В., 80  
 Самцов М.П., 41, 214, 236, 237  
 Сараджи Н.Г., 140  
 Саранцева С.В., 298  
 Свердлов Р.Л., 66, 164, 266  
 Светлаков В.И., 139  
 Светлик М.В., 232  
 Свечко А.Д., 340  
 Свешникова А.Н., 111, 145, 169, 191, 243  
 Свидельская Г.С., 157  
 Святченко С.В., 363  
 Северинчик Т.П., 297  
 Семанюк Т.В., 54  
 Семенкова Г.Н., 67, 125, 227, 294  
 Сёмин Б.К., 332  
 Сергеев В.Г., 122  
 Серебрякова И.А., 194  
 Серебрянская Т.В., 81  
 Сидоренко А.В., 228  
 Сидоров А.В., 158  
 Симакин А.В., 282  
 Симоненко Е.Ю., 206  
 Скоробогатова А.С., 215, 229  
 Сливина Ю.И., 245  
 Слобожанина Е.И., 200, 201, 230, 353  
 Смаглий Л.В., 117, 188, 232  
 Смирнов А.А., 160  
 Смирнова А.Е., 136  
 Смирнова Е.Н., 274  
 Смолева С., 225  
 Снастин М.В., 82  
 Снопич Ф.Ю., 118  
 Собчук А.Н., 340  
 Соколик А.И., 37, 139, 315  
 Соколов А.В., 30, 167, 185, 204, 218, 286  
 Соколов В.С., 324, 336, 343, 346  
 Соколов П.А., 50  
 Соловых Н.В., 312  
 Соловьева П.А., 145  
 Солодуха Н.А., 228  
 Сорока Д.А., 187  
 Становая А.И., 299  
 Стародубцева М.Н., 161, 267, 268  
 Старухин А.С., 55, 94  
 Стенникова П.С., 243  
 Степанов Г.О., 49, 64, 82, 84, 207, 225  
 Стожаров А.Н., 88  
 Стойков И.И., 299  
 Стрекаль Н.Д., 220  
 Стрельникова Н.С., 274  
 Стручкова А.А., 84, 225  
 Стужин П.А., 73

Султанова Г.Г., 86, 234  
Сунцова Е.В., 235  
Сурков Ю.И., 194  
Сусленкова А.Е., 161, 267  
Суховеева С.В., 160, 162, 325  
Сучков М., 225  
Сушко Е.С., 61  
Сысоев М.Д., 235  
Сыч Т.С., 278  
Таболич А.А., 347  
Тайлаков М.Е., 289  
Тамашевский А.В., 112, 301  
Тарасик М.С., 88, 203  
Тарасов Д.С., 236, 237  
Тарасов С.А., 82  
Тарасова Д.А., 89  
Татур В.В., 348  
Тахирова К.А., 367  
Ташкин В.Ю., 343, 346  
Телегина Т.А., 238, 316  
Теплов И.Ю., 24  
Терехов С.Н., 297  
Терехова М.М., 52  
Терпинская Т.И., 302, 305  
Теселкин Ю.О., 239, 241  
Титов В.Ю., 241, 242  
Тогтохтур Т., 193  
Толкач А.А., 163  
Толкачева Ю.В., 116  
Топорова В.А., 141  
Трахтман П.Е., 169  
Третьякова А.И., 340, 347  
Трофимов Ю.В., 325  
Туромша И.С., 266  
Тучина Е.С., 194, 245  
Тюлькова Е.Г., 349  
Тюрин Ф.В., 24  
Улосевич Д.С., 304  
Урбан В.А., 57, 91  
Уродкова Е.К., 324  
Усанов С.А., 42, 43, 45  
Фалетров Я.В., 69, 95  
Федорова Н.Д., 110, 164, 266  
Федорович С.В., 165  
Федотова Е.И., 106, 166, 224  
Феофанов А.В., 141, 254  
Филипцова Г.Г., 348  
Фирова Р.Х., 93  
Фомина Е.Г., 276  
Фролова Н.С., 69, 95  
Фурсова П.В., 350  
Хайлова Л.С., 152  
Харитоновна А.Ю., 136  
Хомутов Г.Б., 273  
Хрусталёв В.В., 88, 366  
Хрусталёва О.В., 88, 366  
Хрусталёва Т.А., 59  
Хрущев С.С., 342, 350  
Хэ Л., 288  
Чабин И.А., 145  
Челнокова И.А., 161, 268  
Червицов Р.Н., 342  
Черенков И.А., 89, 122  
Черепанов Д.А., 351  
Черепанов И.С., 89  
Черныш М.А., 37  
Чернявская Е.А., 138  
Чжунжуй Х., 247  
Чиж О.И., 265  
Чурсанова Е.Н., 140  
Шалина Р.И., 239, 241, 242  
Шамова Е.В., 127, 129, 189, 191, 230, 243  
Шарабарина Т.В., 194, 245  
Шарко О.Л., 35  
Шаховская О.В., 161  
Швецов А.В., 110  
Шелаев И.В., 351  
Шереметьева Л.З., 365  
Шершень В.С., 94  
Ши К., 52  
Ши С., 288  
Шиабиев И.Э., 299  
Шитикова Е.Ю., 148, 180  
Шклярова А.Н., 161, 267, 268  
Шман Т.В., 196, 198, 251, 269, 361  
Шманай В.В., 35  
Шмелева Е.В., 167  
Шпилевский С.Н., 352  
Шульга А.В., 220  
Шумко А.Д., 129  
Шумский В.А., 191, 243  
Шэнь М., 288  
Щербин Д.Г., 35, 52, 288, 299  
Эмануэль В.Л., 48, 179  
Эргашев Н.А., 367

Эрнандес Касерес Х.Л., 215  
Юдин И.И., 358  
Юдин М.С., 218  
Яблокова Е.В., 82  
Якимов С.А., 141  
Якимчук С.В., 134, 340  
Яковец П.С., 95  
Якубова Н.Х., 150

Янг Ч., 247  
Янковская М.Б., 312  
Янчарский В.А., 185  
Янченко Т.Л., 305  
Япрынцев А.Д., 121, 132  
Яроцкая М.А., 270  
Ястребов И.А., 169  
Яцзин Ш., 306