



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

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

# ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОФИЗИКА

*8–10 февраля 2022 года*



Издательство  
Синхробук  
(Synchrobook™)  
ПУЩИНО  
2022



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Российская академия наук  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт теоретической и экспериментальной биофизики  
Российской академии наук

**МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ**  
**ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И**  
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ**  
**БИОФИЗИКА**

*8–10 февраля 2022 года*

Издательство Синхробук (Synchrobook™)

Пушино  
2022

**Теоретическая и экспериментальная биофизика** : Материалы конференции «Теоретическая и экспериментальная биофизика», 8–10 февраля 2022 года. — Пушино : Синхробук (Synchrobook™), 2022. — 103 с, ISBN 978-5-91874-908-1

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

Настоящий сборник составлен по материалам, отражающим наиболее значимые результаты научных исследований, представленных сотрудниками ИТЭБ РАН в 2021 г. на ежегодной отчетной конференции. Сборник содержит работы в области изучения нелинейных процессов в биосистемах, исследований структурно-функциональных свойств различных биомолекул, математического моделирования, разных разделов нейробиологии, исследования различных аспектов воздействия ионизирующего излучения на живые объекты, разработки инновационных терапевтических подходов для лечения различных заболеваний, а также методов их диагностики.

## СОДЕРЖАНИЕ

<i>Абдуллаев С.А., Глухов С.И., Газиев А.И.</i> РАДИОПРОТЕКТОРНЫЕ И РАДИОМИТИГАТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ МЕЛАТОНИНА В ТКАНЯХ С РАЗЛИЧНОЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ И РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ .....	9
<i>Алилова Г.А., Тихонова Л.А., Косенко Е.А.</i> НАКОПЛЕНИЕ АММИАКА В МОЗГЕ, КАК ОДИН ИЗ ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПОБОЧНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОЭПИЛЕПТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ВАЛЬПРОАТА НАТРИЯ .....	12
<i>Аникина В.А., Сорокина С.С., Попова Н.Р., Замятина Е.А., Шемаков А.Е.</i> РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МОДЕЛИ ПРОТОН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДЕРМАТИТА НА МЫШАХ .....	13
<i>Архипова Л.В., Гаврилюк В.Б., Куликов А.В.</i> ГЕНДЕРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ .....	15
<i>Асланиди К.Б., Харакоз Д.П.</i> НЕРВНАЯ СИСТЕМА ОПРЕДЕЛЯЕТ ПРЕДЕЛЫ ТЕМПЕРАТУРНОЙ АДАПТАЦИИ ЖИВОТНЫХ .....	17
<i>Борисова М.П.</i> РОЛЬ С-ТЕРМИНАЛЬНОГО ДОМЕНА VASILLUS CEREUS ГЕМОЛИЗИНА II В ПРОЯВЛЕНИИ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ.....	19
<i>Бражник Е.С., Новиков Н.И.</i> ДВИГАТЕЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ И РИТМЫ МОЗГА В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫСЫ .....	21
<i>Венедиктова Н.И., Соломадин И.Н., Миронова Г.Д.</i> СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ И СЕРДЦА КРЫС ПРИ ГИПЕРТИРЕОИДИЗМЕ .....	22
<i>Грабарская М.А., Михайлова Г.З., Грицына Ю.В., Уланова А.Д., Попова С.С., Захарова Н.М., Вихлянцев И.М.</i> ИЗМЕНЕНИЯ ИЗОФОРМНОГО СОСТАВА И ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ТИТИНА И ОБСКУРИНА В ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦАХ ДЛИННОХВОСТОВОГО СУСЛИКА ( <i>UROSAURUS UNDULATUS</i> ) ПРИ ГИБЕРНАЦИИ .....	25
<i>Деев А.А., Воробьев В.В.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА FUS-МЫШЕЙ — ТРАНСГЕННОЙ МОДЕЛИ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА.....	28
<i>Евдокимовский Э.В., Jeon. R., Park. S., Пименов О.Ю., Алексеев А.Е.</i> РОЛЬ ИЗОФОРМ A2-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В ПОДАВЛЕНИИ Ca-ТОКОВ L-ТИПА В КАРДИОМИОЦИТАХ МЫШИ .....	30
<i>Емельянова М.С., Ломаева М.Г., Ломаев Г.В.</i> ЭМБРИОГЕНЕЗ <i>G. GALLUS</i> В УСЛОВИЯХ ОСЛАБЛЕНИЯ МАГНИТНОГО ПОЛЯ ЗЕМЛИ.....	32

<i>Заичкина С.И., Дюкина А.Р., Сорокина С.С., Поцелуева М.М., Юсупов В.И.</i> ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ДОЗ ИМПУЛЬСНОГО ИЛИ НЕПРЕРЫВНОГО ЛАЗЕРНЫХ И РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЙ, А ТАКЖЕ ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КРОВИ И ЛИМФОИДНЫЕ ОРГАНЫ МЫШЕЙ <i>IN VIVO</i> .....	35
<i>Зенченко Т.А.</i> НОВЫЕ АСПЕКТЫ МЕТОДОЛОГИИ ГЕЛИОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	37
<i>Иваницкий Г.Р.</i> ФОРМУЛА АДАПТАЦИИ.....	40
<i>Калмыков Л.В., Калмыков В.Л.</i> РЕШЕНИЕ ДИЛЕММЫ «ЛИМИТИРУЮЩЕЕ СХОДСТВО VS. ЛИМИТИРУЮЩЕЕ РАЗЛИЧИЕ» МЕТОДОМ ПРОЗРАЧНОГО ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА.....	43
<i>Карманова Е.Е., Черников А.В., Иванов В.Е., Усачева А.М., Брусков В.И.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ А-ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА, ИНДУЦИРОВАННОГО РЕНТГЕНОВСКИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ.....	46
<i>Колманович Д.Д., Иванов В.К., Попов А.Л.</i> РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО КЛАССА ТЕРАНОСТИКОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛОВ ДЛЯ РАДИОТЕРАПИИ ОПУХОЛИ.....	48
<i>Коломбет В.А., Лесных В.Н.</i> САМОВОСПРОИЗВОДЯЩИЕСЯ АВТОМАТЫ: ЖИЗНЬ, УНИВЕРСАЛЬНАЯ СИСТЕМА УТРАИВАЮЩИХСЯ ПЕРИОДОВ, ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ.....	50
<i>Конаков М.В., Левин С.Г., Теплов И.Ю., Ненов М.Н.</i> АНТИГИПОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЦИТОКИНА ИНТЕРЛЕЙКИН-10 ОПОСРЕДОВАН МОДУЛЯЦИЕЙ TASK КАНАЛОВ.....	53
<i>Корыстов Ю.Н., Корыстова А.Ф., Кублик Л.Н., Левитман М.Х., Самохвалова Т.В., Шапошникова В.В.</i> ЧАЙ ПРЕДОТВРАЩАЕТ ИНДУЦИРОВАННЫЙ РАДИАЦИЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В АОРТЕ КРЫС.....	55
<i>Куликов А.В., Архипова Л.В.</i> ИЗУЧЕНИЕ РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ВОДЫ, ЭКСПОНИРОВАННОЙ В ПИРАМИДЕ, НА МОДЕЛИ УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ.....	57
<i>Ларюшкин Д.П., Майоров С.А., Гайдин С.Г., Зинченко В.П., Косенков А.М.</i> КЛАССИФИКАЦИЯ ПАТТЕРНОВ ПАРОКСИЗМАЛЬНОГО ДЕПОЛЯРИЗАЦИОННОГО СДВИГА ПРИ ПОМОЩИ АЛГОРИТМОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ.....	58
<i>Ломовская Я.В., Кобякова М.И., Ломовский А.И., Фадеев Р.С.</i> МАКРОФАГОПОДОБНЫЕ КЛЕТКИ ТНР-1, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ, УСТОЙЧИВЫ К TRAIL-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИБЕЛИ ЗА СЧЕТ ПОДАВЛЕНИЯ DR4 И DR5.....	60

<i>Маевский Е.И., Кожурин М.В., Запатрина Е.Н., Гришина Е.В., Богданова Л.А., Leopard P.</i> СУКЦИНАТ — ВРАГ И ДРУГ .....	63
<i>Митрошина И.Ю., Сирота Н.П., Прокофьев В.Н., Кузнецова Е.А.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ СООТНОШЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЯДЕРНОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК СЫВОРОТКИ И ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ РАЗНОГО ПОЛА И ВОЗРАСТА .....	65
<i>Михеева И.Б., Жуйкова Н.С., Павлик Л.Л.</i> УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИИ ГЛАЗОДВИГАТЕЛЬНЫХ ЯДЕР МОЗГА МЫШЕЙ ПОСЛЕ 30-СУТОЧНОГО КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА И НЕДЕЛЬНОЙ РЕАДАПТАЦИИ К УСЛОВИЯМ ЗЕМНОЙ ГРАВИТАЦИИ .....	68
<i>Никифорова А.Б., Бабурина Ю.Л., Борисова М.П., Сурин А.К., Харечкина Е.С., Крестинина О.В., Суворина М.Ю., Круглова С.А., Круглов А.Г.</i> БЕЛКИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -АТФ-СИНТАЗой, МОГУТ УЧАСТВОВАТЬ В ФОРМИРОВАНИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ CA <sup>2+</sup> -ЗАВИСИМОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ (РТР) .....	71
<i>Панаит А.И.</i> ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ И ДЕЗИНТЕГРАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ .....	73
<i>Панчелюга В.А., Панчелюга М.С.</i> О ВНЕШНЕЙ ОБУСЛОВЛЕННОСТИ СПЕКТРА ОКОЛОЧАСОВЫХ ПЕРИОДОВ .....	76
<i>Першина Е.В., Черноморец И.Ю., Жуйкова Н.С., Гарджук А.А., Архипов В.И.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ С ПОМОЩЬЮ СОВМЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ БЛОКАДЫ НМДА И ПОЗИТИВНОЙ МОДУЛЯЦИИ МГЛУ4 РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ .....	79
<i>Полозов Р.В., Грохлина Т.И., Панченко Л.А., Иванов В.В.</i> СЕМЕЙСТВО КОМПЛЕКСОВ ГОМЕОДОМЕННЫХ БЕЛКОВ С ДНК: КЛАССИФИКАЦИЯ, АНАЛИЗ, СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ .....	80
<i>Прохоров Д.А., Азев В.Н., Микулинская Г.В., Чулин А.Н., Молчанов М.В., Уверский В.Н., Кутышенко В.П.</i> СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ГИДРОЛИЗ СИНТЕТИЧЕСКОГО МИМЕТИКА ПЕПТИДОГЛИКАНА ЭНДОЛИЗИНАМИ БАКТЕРИОФАГОВ T5, RV43 и RV49 .....	83
<i>Сирота Н.П.</i> РАЗЛИЧИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К РАДИАЦИОННОМУ ФАКТОРУ .....	86
<i>Смолянинов В.В., Потапова Т.В., Асланиди К.Б.</i> ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ЧЕРЕЗ ПРОНИЦАЕМЫЕ КОНТАКТЫ .....	87

<i>Тараненко А.М.</i> ФРАКТАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ МОЗГА, ИХ ФРАКТАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ И ФРАКТАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ.....	90
<i>Тимченко М.А., Молчанов М.В., Слядовский Д.А., Молчанов В.Г., Согорин Е.А.</i> <sup>1</sup> H ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ КАК БЫСТРЫЙ МЕТОД СКРИНИНГА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ.....	91
<i>Хижняк Е.Л., Сирота Н.П., Кузнецова Е.А., Хижняк Л.Н., Сирота Т.В.</i> ВЛИЯНИЕ НАГРЕВА И КОНВЕКЦИИ НА ПРОЦЕСС ЭЛЕКТРОФОРЕЗА.....	93
<i>Хмель Н.В., Павлик Л.Л., Успенко Н.И., Шигаева М.И., Агафонов А.В., Миронова Г.Д.</i> УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА КРЫС С ИСХОДНО РАЗНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К ДЕФИЦИТУ O <sub>2</sub> .....	96
<i>Хундерякова Н.В., Медведева В.П., Мосенцов А.А., Белослудцева Н.В., Хмель Н.В., Миронова Г.Д.</i> МОДУЛЯЦИЯ УРИДИНОМ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС.....	99
<i>Шляпников Ю.М., Малахова Е.А., Канев И.Л., Шляпникова Е.А.</i> СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОАНАЛИЗА НА НИЗКОАДГЕЗИВНЫХ ПОВЕРХНОСТЯХ.....	102
<i>Шубина В.С., Козина В.И., Шаталин Ю.В.</i> СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ РЯДА ФЛАОВОИДОВ И КОНЬЮГАТА ТАКСИФОЛИНА С ГЛИОКСАЛЕВОЙ КИСЛОТОЙ.....	104



## **РАДИОПРОТЕКТОРНЫЕ И РАДИОМИТИГАТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ МЕЛАТОНИНА В ТКАНЯХ С РАЗЛИЧНОЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ И РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ**

*Абдуллаев С.А., Глухов С.И., Газиев А.И.*

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

Данное исследование является продолжением работы, результаты которой частично докладывались в отчетах прошлого года. Результаты, полученные в 2021 году, представлены в печать и опубликованы недавно [1]. (Статья в открытом журнале доступна для чтения полностью). Как показывают результаты исследований Международной комиссии по радиационной защите, у пострадавших при ядерных катастрофах (Чернобыль и Фукусима) при использовании не только радиопротекторов, но и надежных радиомитигаторов, радиационных последствий для людей было бы существенно меньше [2]. Кроме того, поскольку ионизирующие излучения (ИИ) широко применяются в терапии различных видов опухолей, критическим остается вопрос снижения лучевых поражений нормальных тканей в процессе радиотерапии [3]. Воздействие космического излучения на космонавтов также является критическим фактором для полетов за пределами земной орбиты [4]. В этом случае, как полагают, основные риски больше всего связаны с возможными последствиями воздействия радиации на центральную нервную систему и на селезенку, что чревато потенциальными неврологическими расстройствами, дегенеративными эффектами, снижением иммунной системы и многих систем здоровья экипажа [4]. Поэтому поиск, изучение эффективных радиопротекторов, радиомитигаторов и средств лечения лучевых поражений остается весьма актуальными проблемами. Наше исследование было посвящено сравнительной оценке ряда маркеров повреждений в тканях коры головного мозга и селезенки после облучения всего тела мышей рентгеновскими лучами и возможности модуляции этих повреждений при введении мелатонина (МЕЛ) до (режим радиопротекции) и после (режим радиомитигации) их облучения. Согласно анализу данных большого числа исследований, обоснованы положения о возможности использования МЕЛ для защиты астронавтов от жесткого космического облучения, хотя имеются и ограничения. Потенциальные повреждения селезенки при лучевой терапии опухолей внутрибрюшных ор-

ганов также ограничивают использование ИИ для этих целей. К таким повреждениям можно отнести активацию ферроптоза и нарушения иммунной системы клеток селезенки.

Для оценки повреждений тканей мышей (селезенки и коры головного мозга), и их модуляции введением МЕЛ мы использовали различные маркеры. Мы оценивали уровни повреждений и их модуляции введением МЕЛ мышам до и после их облучения. При этом в качестве основных маркеров радиационных повреждений и их модуляции использовались: (1) повреждения и восстановления ядерной ДНК (яДНК), (2) митохондриальной ДНК (мтДНК), (3) биогенез и мутагенез мтДНК, (4) уровень АТФ (как маркер энергетического статуса), (5) уровня генерации  $H_2O_2$  (как наиболее стабильной и способной мигрировать на большие расстояния активной формы кислорода) для оценки индукции окислительного дистресса [5], (6) перекисное окисление липидов, оцениваемое по содержанию малонового диальдегида (МДА) и (7) снижение антиоксидантной активности по уровню восстановленного глутатиона (GSH). Изменения уровней указанных маркеров наблюдали в течение 48 часов пострadiационного времени, как при введении МЕЛ (Per os), так и без его введения. Для определения повреждения и восстановления яДНК и мтДНК мы использовали метод количественной полимеразной цепной реакции с длинными ампликонами (LA-QPCR), с учетом нашего предыдущего опыта [6]. При этом поврежденные основания, АП-сайты, одонитевые и двунитевые разрывы ДНК, шивки ДНК-белок могут блокировать активность комбинации ДНК-полимераз (в работе использовались Taq-ДНК полимеразы и модифицированная ДНК полимеразы архей Типа В — The KAPA Long Range HotStart PCR kit). Таким образом, этот метод позволяет оценить общий уровень повреждений ДНК. Данные этого исследования показали, что повреждения яДНК на ранних пострadiационных сроках восстанавливались более активно в селезенке, чем в коре головного мозга мышей, облученных и обработанных МЕЛ. Биогенез мтДНК был активирован в обеих тканях облученных мышей. Значительная доля вновь синтезированных молекул мтДНК представляет собой мутантные копии, которые усиливают окислительный стресс с экспрессией мутантных генов в их составе. МЕЛ снижал количество мутантных копий мтДНК и уровень  $H_2O_2$  в обеих тканях облученных мышей. МЕЛ способствовал восстановлению уровня АТФ в тканях облученных мышей. В тканях мышей после воздействия рентгеновского излучения уровень МДА повышается, и МЕЛ способен его снижать. Концентрация МДА в ткани коры головного мозга выше, чем в ткани селезенки мыши. Однако содержание GSH в селезенке более чем в два раза ниже, чем в

коре головного мозга. В тканях мыши после облучения уровень GSH резко снижается. Это согласуется с недавними сообщениями о резком снижении антиоксидантной активности в крови мышей в течение 50 дней после их облучения [7]. МЕЛ способствует восстановлению уровня GSH в тканях облученных мышей. Несмотря на то, что ткани селезенки и коры головного мозга мышей различаются по исходным значениям анализируемых маркеров, в обеих тканях наблюдается радиопротекторный и радиомитигаторный потенциал МЕЛ.

Многочисленные исследования показывают, что МЕЛ является сильным антиоксидантом, обладающим радиопротекторным действием. Наше исследование, основанное на результатах оценки влияния МЕЛ на ткани с различной пролиферативной активностью у мышей, подвергшихся воздействию ИИ, подтверждает эту позицию. Наши результаты демонстрируют также, что МЕЛ эффективно снижает различные радиационные повреждения при его введении мышам после их облучения. Результаты исследования показали, что, хотя ткани селезенки и коры головного мозга мышей отличаются исходными контрольными значениями анализируемых маркеров, антирадиационный потенциал МЕЛ успешно реализуется в обеих тканях. Следует также отметить, что в настоящее время обсуждается вопрос о целесообразности спленэктомии при лучевой терапии опухолей органов брюшной полости или у космонавтов во время длительных космических полетов за пределами защиты магнитосферы Земли. Конечно, данные, полученные при воздействии рентгеновских лучей на организм, трудно полностью экстраполировать на повреждение нормальных тканей в процессе адронной терапии опухолей или на воздействие космической радиации на космонавтов. Тем не менее, поскольку окислительные дистрессы разного уровня возникают, когда клетки подвергаются воздействию различных ИИ ( $^{56}\text{Fe}$ , протонов и рентгеновских лучей), представляется возможным существенно подавить их с помощью МЕЛ и воздержаться от спленэктомии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Abdullaev S.A., Glukhov S.I. and Gaziev A.I.* Antioxidants. 2021. 10. 1885.
2. International Commission on Radiological Protection (ICRP). Editor-in-Chief C.H. Clement. *Annals of the ICRP*. 2021. V. 50. № S1.
3. *Karri J., Lachman L. et al.* Adv. Ther. 2021. 38. 1425—1446.
4. *Laiakis E.C., Shuryak I. et al.* Int. J. Mol. Sci. 2021. 22. 3070.
5. *Sies H.* Redox Biology. 2021. 41. 101867.
6. *Abdullaev S.A., Gubina N.E., Bulanova T.S., Gaziev A.I.* Int. J. Mol. Sci. 2020. 21. 1196.
7. *Sun L., Inaba Y., Sogo Y. et al.* Sci. Rep. 2021. 11. 6716.

# **НАКОПЛЕНИЕ АММИАКА В МОЗГЕ, КАК ОДИН ИЗ ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПОБОЧНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОЭПИЛЕПТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ВАЛЬПРОАТА НАТРИЯ**

*Алилова Г.А., Тихонова Л.А., Косенко Е.А.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия  
*E-mail:* hells2012@yandex.ru

Аммиак — нормальный клеточный метаболит, который постоянно образуется в тканях и выполняет множество жизненно важных функций в организме. Однако в повышенных концентрациях он является мощным нейротоксином. Поэтому его концентрация в физиологических условиях относительно мала и не превышает 50 мкмоль/л. Это достигается путем его детоксикации в цикле мочевины, протекающем исключительно в клетках печени.

Всего лишь двукратное повышение концентрации аммиака в крови (гипераммониемия), особенно у детей, приводит к гепатоэнцефалопатии, сопровождающейся потерей сознания, судорогами, комой, которая часто заканчивается смертью.

Общепризнано, что гипераммониемия возникает при любом заболевании, связанном с повреждением клеток печени. Однако современные данные указывают на то, что гипераммониемия может возникать на фоне нормальной детоксикационной функции печени при многих других патологиях, таких как нейродегенерация, диабет, болезни почек, пересадка костного мозга, а также при приеме некоторых медикаментозных препаратов.

Так, было обнаружено, что прием противосудорожного препарата вальпроата натрия у детей с эпилепсией вызывает развитие энцефалопатии, сопровождающейся судорогами, причем было отмечено, что у всех обследованных пациентов концентрация аммиака в крови была повышена, но при этом «печеночные пробы», характеризующие целостность клеток печени и ее детоксикационную функцию, не отличались от нормы.

Это давало возможность предположить, что в мозге при эпилепсии вальпроат-индуцированная энцефалопатия может быть связана с активацией эндогенных аммиак-образующих реакций, которые могут носить самостоятельный вклад в развитие судорожных приступов, независимо от его концентрации в крови и обезвреживания в печени.

С целью выявления эндогенных источников аммиака было изучено влияние вальпроата на активность глутаматдегидрогеназы, глутаминазы, аденозин-

дезаминазы, глутаминсинтетазы, АМФ-дезаминазы, аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы в разных отделах мозга крыс.

Было обнаружено, что главными ферментами, участвующими в усиленном образовании и накоплении аммиака в мозге животных под воздействием вальпроата натрия, являются глутаматдегидрогеназа и глутаминаза митохондрий. Тогда как в цитозоле таким ферментом является аденозиндезаминаза.

Механизм действия вальпроата натрия, приводящий к активации аммоний-образующих ферментов в мозге, неизвестен и требует дополнительных исследований.

Проведенные исследования помогут выявить не только новые механизмы токсического действия аммиака, но и определить факторы риска развития судорог, возникающих на фоне нормальной детоксицирующей функции печени после приема многочисленных медикаментозных препаратов. Они также создадут основу для разработки инновационных лекарственных препаратов, которые существенно расширят арсенал средств медицинского назначения и повысят качество медицинских услуг в области лечения заболеваний, сопровождающихся гипераммониемией.

## **РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МОДЕЛИ ПРОТОН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДЕРМАТИТА НА МЫШАХ**

*Аникина В.А.<sup>1</sup>, Сорокина С.С.<sup>1</sup>, Попова Н.Р.<sup>1</sup>, Замятина Е.А.<sup>1</sup>, Шемяков А.Е.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

<sup>2</sup> Физико-технический центр ФИАН, Протвино, Россия

*E-mail: viktoriya.anikina@list.ru*

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Международного агентства по атомной энергии (МАГАТЭ) более чем 50% пациентов, страдающих от онкологических заболеваний, проходят курс радиационной терапии. Наиболее часто встречающимся побочным эффектом такой терапии является радиационно-индуцированное повреждение кожи, радиационный дерматит. По оценкам Ferreira E.B. и соавторов [1], у 80—90% всех пациентов с раком головы, шеи и молочной железы, получающих радиотерапию, развивается радиационный дерматит той или иной степени. Кроме того, у одного из трех пациентов развивается хронический радиодерматит, который проявляется, как правило, в течение 10 лет после завершения курса радиотерапии [2].

На сегодняшний день, терапия радиационного дерматита осуществляется теми же средствами и мерами что и при термических ожогах. Однако патогенезы радиационного дерматита и термического ожога существенно разнятся. Ра-

диационный дерматит характеризуется наличием латентного периода в среднем от 7—14 дней. Это связано с накоплением в тканях высокой суммарной поглощённой дозы от 45—70 Гр в зависимости от типа и стадии онкологического заболевания. Такая доза достигается хроническим фракционированным облучением одного и того же участка тела, что приводит к прямой и косвенной ионизации и постепенному разрушению эпидермального барьера кожи. Это, в свою очередь, вызывает отсроченные патологические эффекты, которые проявляются через недели и месяцы после начала лечения. Таким образом, актуальной проблемой современной радиационной биомедицины является поиск и разработка новых эффективных и специфических методов профилактики и лечения радиационного дерматита. Однако для анализа таких средств необходимо разработать и получить стойкую экспериментальную модель радиационного дерматита. Важно отметить, что на сегодняшний день существуют воспроизводимые модели радиодерматита индуцированные редкооизирующим излучением (гамма-, рентгеновское излучения) и отсутствуют модели, индуцированные плотноионизирующим излучением (протоны). В связи с чем, целью данного исследования являются разработка и валидация модели протон-индуцированного дерматита на мышах.

Для получения стойкой модели радиационного дерматита была проведена серия экспериментов для подбора оптимальной дозы, мощности и глубины проникновения пучка, площади воздействия, фиксации и наркотизации животного, предварительной эпиляции/или нет кожных покровов, при которых не были затронуты жизненно важные органы и имелась 100% воспроизводимость и стадийность формирования радиационного дерматита у мышей без долгого латентного периода. Для исследований были использованы самцы белых беспородных мышей SHK (29—32 г), которых содержали в клетках по 5 особей в виварии ИТЭБ РАН (режим освещённости — 12 ч/12 ч, свободный доступ к воде и корму). Животных однократно облучали на протонном синхротроне («Прометеус», ФТЦ ФИАН, Протвино). Перед животными, индивидуально зафиксированными на наклонной платформе, располагали фантом с водой для замедления частиц. Расчётная доза на поверхности животного — 50 Гр. Площадь равномерного (95%) покрытия заданной дозой — 15×15 мм. Энергия пучка на выходе из ускорителя — 88,5 МэВ. Облучение импульсное, с циклом 2 с. Длительность облучения 2,5 мин.

На основании полученных данных, можно сделать вывод, что для получения стойкой модели радиационного дерматита 3 степени у мышей, необходимо проводить эпиляцию кожи с последующим локальным облучением ее на спине животного в дозе 50 Гр. Предложенная методика позволяет получить заданную

степень радиационно-индуцированного повреждения кожи и определить длительности периодов патогенеза радиационного дерматита у мышей. Третья степень радиационного дерматита является оптимальной для экспериментальной оценки патогенеза радиационного поражения кожи, и общего времени заживления радиационно-индуцированного повреждения кожи. Кроме того, такая модель позволяет провести сравнительный анализ периодов лучевого поражения кожи или снижение степени тяжести повреждения в различных экспериментальных группах и, следовательно, может быть использована для оценки эффективности терапевтических средств, предназначенных для экстренной профилактики и лечения местных радиационных поражений кожи.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Ferreira E.B., Vasques C.I., Gadia R. et al.* Topical interventions to prevent acute radiation dermatitis in head and neck cancer patients: a systematic review // *Support Care Cancer*. 2017. 25(3). 1001—1011.
2. *Whelan T.J., Pignol J.P., Levine M.N. et al.* Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer // *The New England Journal of Medicine*. 2010. 362(6). 513—520.

### ГЕНДЕРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

*Архипова Л.В., Гаврилюк В.Б., Куликов А.В.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино, Россия  
E-mail: 29.04.55@mail.RU

Во всем мире вне зависимости от расовой, религиозной принадлежности женщины в среднем живут дольше мужчин [1—3]. Вопрос, почему это происходит, является очень интересным, но всё ещё нерешённым в геронтологии. Существует ряд предложений для объяснения механизмов, лежащих в основе этого феномена, но чётко подтверждённых или опровергнутых среди них пока нет. Вероятно, это связано с тем, что крайне сложно организовать проверку подобных гипотез на *Homo sapiens*, а имеющиеся данные по животным часто противоречивы, и их результаты нельзя в полной мере переносить на человека. В докладе мы сформулируем один из возможных механизмов, приводящих к половым различиям в продолжительности жизни в человеческой популяции и у животных.

Тестостерон вырабатывается как в мужском, так и в женском организме. Угнетающее влияние тестостерона на иммунную систему женщин значительно слабее, чем на иммунную систему мужчин. Мужчины вырабатывают этого

гормона в 10—18 раз больше, чем женщины [4—5]. Общепринято считать, что, начиная в среднем с 35 лет, и у мужчин, и у женщин количество тестостерона уменьшается на 1% в год (на самом деле это не совсем так). Но мужчины производят достаточное его количество до глубокой старости (80—90 лет), а у женщин после наступления менопаузы его количество падает сразу еще на (25—50)% [5—11]. На сегодня убедительно показано, что тестостерон отрицательно влияет на функционирование тимуса. Он ингибирует развитие Т-лимфоцитов, играя заметную роль в возрастной атрофии тимуса, вызывает апоптоз CD4+CD8+ тимоцитов в моделях *in vitro* и *in vivo* [12—15].

Таким образом, в большей степени ослабевающая с возрастом иммунная система мужчин приводит к увеличению заболеваемости инфекционными, онкологическими и другими иммунозависимыми патологиями, что и снижает минимальную, среднюю и максимальную продолжительность их жизни по сравнению с женщинами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Yusipov I., Basalini M., Kalyakulina A. et al.* Age-related DNA methylation changes are sex-specific: a comprehensive assessment // *Aging*. 2020. 12(23). 24057—24080.
2. *Seifarth J.E., McGowan C.L., Milne K.J.* Sex and life expectancy // *Gender Med*. 2012. 9. 390—401.
3. *Eskes T., Haanen C.* Why do women live longer than men? // *Eur. J. Obstet. Gyn. R.B.* 2007. 133. 126—133.
4. *Курувей Л.П., Гроссман Т.* Transcend: десять шагов на пути к вечной жизни // М.: Мани, Иванов и Фербер. 2016. 384 с.
5. *Travison T.G., Vesper H.W., Orwoll E.W., Wu F., Kaufman J.M., Wang Y., Lapauw B., Fiers T., Matsumoto A.M., Bhasin S.* Harmonized reference ranges for circulating testosterone levels in men of four cohort studies in the united states and Europe // *J. Clin. Endocr. Metab.* 2017. 102(4). 1161—1173.
6. *Древаль А.В.* Менопауза // *РМЖ (Русский медицинский журнал)*. 2018. 1. 3—7.
7. *Gems D.* Evolution of sexually dimorphic longevity in humans // *Aging*. 2014. 6(2). 84—91.
8. *Samaras N., Papadopoulou M.A., Samaras D., Ongaro F.* Off-label use of hormones as an antiaging strategy: a review // *Clin. Interv. Aging*. 2014. 9. 1175—1186.
9. *Huhtaniemi I.* Late-onset hypogonadism: current concepts and controversies of pathogenesis, diagnosis and treatment // *Asian J. Androl*. 2014. 16(2). 192—202.
10. *Shifren J.L.* Testosterone for midlife women: the hormone of desire? // *Menopause*. 2015. 22(10). 1147—1149.
11. *Dimopoulou C., Ceausu L., Depypere H., Lambrinoudaki I., Mueck A., Pérez-López F.R., Rees M., Schouw Y.T., Senturk L.M., Simonsin T.I., Stevenson J.C., Stute P., Goulis D.G.* EMAS position statement: Testosterone replacement therapy in the aging male // *Maturitas*. 2016. 84. 94—99.



12. Демьяненко С.В., Чистяков В.А., Водопьянов А.С., Брень А.Б. Возрастные изменения тимусзависимого звена иммунной системы // Ж. фонд. мед. и биол. 2012. 1. 17—27.
13. Guevara Patino J.A., Marino M.W., Ivanov V.N., Nikolich-Zugich J. Sex steroids induce apoptosis of CD8+CD4+ doublepositive thymocytes via TNF-alpha // Eur. J. Immunol. 2000. 30. 2586—2592.
14. Olsen N.J., Olson G., Viselli S.M. Gu X., Kovacs W.J. Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development // Endocrinology. 2001. 142(3). 1278—1283.
15. Hince M., Sakkal S., Vlahos K. Dudakov J., Boyd R., Chidgey A. The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymus involution // Cell. Immunol. 2008. 252(1—2). 122—138.

## НЕРВНАЯ СИСТЕМА ОПРЕДЕЛЯЕТ ПРЕДЕЛЫ ТЕМПЕРАТУРНОЙ АДАПТАЦИИ ЖИВОТНЫХ

Асланиди К.Б., Харакоз Д.П.

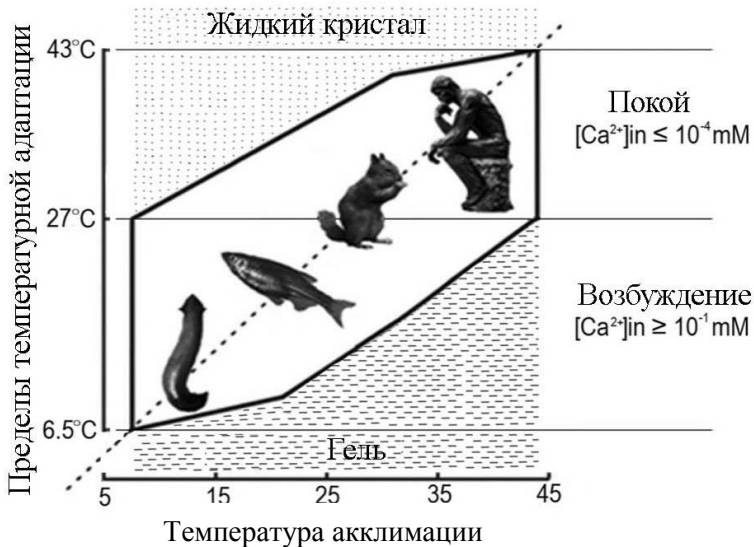
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия  
E-mail: kbaslanidi@gmail.com

Регистрация температур, при которых происходила потеря координации и подвижности (*loss of righting reflex*) позволила определить пределы температурной адаптации у рыбок *Danio rerio*. Зависимости температуры теплового шока  $T_T$  и температуры холодового шока  $T_X$  от температуры длительной акклимации  $T_A$  в диапазоне заведомо толерантных температур  $20\text{ }^\circ\text{C} < T_A < 30\text{ }^\circ\text{C}$  имели вид:

$$\begin{aligned} T_X &= 0,7 T_A - 4,12; \\ T_T &= 0,53 T_A + 24,2. \end{aligned}$$

Диапазон жизнедеятельности для *Danio rerio* располагался между  $(T_X)_{\min} = 6,5\text{ }^\circ\text{C}$  и  $(T_T)_{\max} = 43\text{ }^\circ\text{C}$  и составлял  $36,5\text{ }^\circ\text{C}$ , а  $(T_T)_{\min} = (T_X)_{\max} = 27\text{ }^\circ\text{C}$ .

Этот диапазон, определяемый по нарушению синаптической проводимости вблизи температуры фазового перехода липидов синаптических везикул, хорошо соответствует диапазону жизнедеятельности подавляющего большинства многоклеточных организмов, включая человека в раннем постнатальном онтогенезе. Эти температуры  $(T_X)_{\min} = 6,5\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $(T_T)_{\max} = 43\text{ }^\circ\text{C}$  и  $(T_T)_{\min} = (T_X)_{\max} = 27\text{ }^\circ\text{C}$  следует считать универсальными биологическими постоянными, имеющими вполне определённый физический смысл:



- $(T_{X})_{\min} = 6,5^{\circ}\text{C}$  является самой низкой температурой фазового перехода между жидким (жидкий кристалл) и твердым (гель) состояниями самых легкоплавких липидов пресинаптической мембраны при низком уровне внутриклеточном  $\text{Ca}^{2+}$  в состоянии покоя;
- $(T_{T})_{\max} = 43^{\circ}\text{C}$  является самой высокой температурой фазового перехода между жидким (жидкий кристалл) и твердым (гель) состояниями самых тугоплавких липидов пресинаптической мембраны при высоком уровне внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , вызванного возбуждением;
- $(T_{T})_{\min} = (T_{X})_{\max} = 27^{\circ}\text{C}$  является температурой термопреферендума, которую рыбки выбирают в широком градиенте температур, а после длительной акклимации при  $T_A = 27^{\circ}\text{C}$  рыбки могут одинаково легко переносить как охлаждение, так и нагрев почти на  $12^{\circ}\text{C}$ ;
- $(T_{T})_{\min} = 27^{\circ}\text{C}$  является самой низкой температурой фазового перехода между жидким (жидкий кристалл) и твердым (гель) состояниями самых легкоплавких липидов пресинаптической мембраны при высоком уровне внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , вызванного возбуждением;
- $(T_{X})_{\max} = 27^{\circ}\text{C}$  является самой высокой температурой фазового перехода между жидким (жидкий кристалл) и твердым (гель) состояниями самых тугоплавких липидов пресинаптической мембраны при низком уровне внутриклеточном  $\text{Ca}^{2+}$  в состоянии покоя.

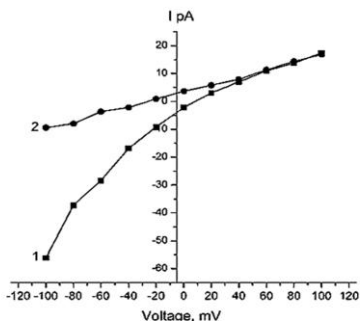
# РОЛЬ С-ТЕРМИНАЛЬНОГО ДОМЕНА *BACILLUS CEREUS* ГЕМОЛИЗИНА II В ПРОЯВЛЕНИИ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Борисова М.П.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Гемолизин II *Bacillus cereus*, порообразующий токсин  $\beta$ -ствола (HlyII), имеет С-концевое удлинение из 94 аминокислотных остатков, обозначенное как С-концевой домен HlyII (HlyIICTD). HlyIICTD способен образовывать олигомеры в водных растворах. Олигомеризация HlyIICTD значительно усиливалась в присутствии эритроцитов и липосом. Его сродство к эритроцитам различного происхождения различалось незначительно, но было заметно выше к Т-клеткам. HlyIICTD разрушал моноциты THP-1 и макрофаги J774, наиболее эффективно действовал на Т-лимфоциты Jurkat и практически не влиял на В-клеточные линии.

Если С-концевой домен несет заряженные группы, взаимодействующие с заряженными группами на поверхности мембран (это может быть положительный заряд от азота или отрицательный от кислорода, находящиеся в гидрофильной головной части фосфолипидной молекулы), то они могут служить якорем для затаскивания белковой молекулы в гидрофобную область бислоевой мембраны. В таком случае отделенный от целой молекулы С-домен может не терять своих свойств для взаимодействия с мембраной и проникать в ее гидрофобную область. Ранее было изучено влияние *HlyII* на липидный бислой и выявлена способность этого белка образовывать ионселективные поры в искусственной и нативной мембранах [1, 2]. Факты по олигомеризации белка в присутствии мембран эритроцитов кролика [3] и снижению гемолиза *HlyII* без С-концевого домена [4] послужили отправными точками для проведения наших исследований. В нашей работе мы исследовали сравнительные характеристики действия белков HlyII и HlyIICTD на липидную мембрану. Сначала белок HlyIICTD был встроен в БЛМ, и мы убедились, что полученный белок-домен встраивается в мембрану и меняет ее характеристики. Затем мы оценили параметры мембран со встроенной молекулой HlyII. Поры, образованные белком-доменом, отличались по своим характеристикам от пор, образованных исходной молекулой HlyII. Полученные каналы отличались по кинетике, проводимости, по зависимости от знака приложенного потенциала. Приведенная запись вольтамперных характеристик этих белков подтверждает существующую разницу для пор, образованных целой молекулой белка и ее частью.



**Рис.** Вольт-амперные характеристики мембран в присутствии HlyII (1) and HlyICTD (2), внесенных с одной стороны от мембраны (out). Концентрация HlyII 8,46  $\mu\text{g/ml}$ , концентрация HlyICTD 30  $\mu\text{g/ml}$ . Раствор KCl, 1M;  $n = 7$  и 5 соответственно.

3) полученные факты выявляют роль с-терминального домена HlyII в гемолитической активности токсина.

Полученные результаты опубликованы в International Journal of Biological Macromolecules 200 (2022) 416—427 совместно с сотрудниками институтов:

1. Филиал института биоорганической химии РАН им. Шемякина-Овчинникова;
2. ПНЦБИ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им. Г.К. Скрябина;
3. Институт белка РАН.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Zhanna I. Andreeva et al. The properties of Bacillus cereus hemolysin II pores depend on environmental conditions // Biochimica et Biophysica Acta. 2007. 1768. 253—263.
2. Anatoly A. Kataev, Zhanna I. Andreeva-Kovalevskaya et al. Bacillus cereus can attack the cell membranes of the alga Chara corallina by means of HlyII // Biochimica et Biophysica Acta. 2012. 1818. 1235—1241.
3. Rudenko N.V., Karatovskaya A.P. et al. C-Terminal Domain of Bacillus cereus Hemolysin II Is Able to Interact with Erythrocytes // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. 46. 321—326.
4. Zamyatina A.V., Rudenko N.V. et al. HlyIIC-15 monoclonal antibody against the C-and domain of B. cereus HlyII interacts with the thrombin recognition site // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. 46. 1214—1220.

Идентичность действия блокатора на обе структуры позволяет нам говорить о роли с-терминального домена для встраивания гемолизина II в мембраны клетки-хозяина, а инертность к нему В-клеточной линии о роли в локализации этого токсина.

В предложенной работе было показано:

- 1) HlyICTD-домен формировал ионопроводящие каналы на бислоевой липидной мембране;
- 2) каналы, образованные С-терминальным доменом, по своим свойствам отличаются от пор, образованных целыми молекулами белка HlyII;

## **ДВИГАТЕЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ И РИТМЫ МОЗГА В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫСЫ**

*Бражник Е.С., Новиков Н.И.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Болезнь Паркинсона (БП) — это прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, обусловленное избирательной потерей дофаминергической иннервации базальных ганглиев (BG), что приводит, в первую очередь, к нарушению двигательной активности и способности удерживать тело в равновесии. При БП активность в нейронной сети BG характеризуется наличием устойчивых 30-Гц бета-осцилляций, которые, как считается, нарушают обработку информации, связанной с движением, и приводят к возникновению моторной симптоматики (брадикинезия/акинезия и нарушение походки). Леводопа устраняет эти осцилляции, что сопровождается временной нормализацией двигательной функции. Однако, при длительном лечении леводопой у большинства пациентов возникают побочные эффекты этого препарата — леводопа-индуцированная дискинезия с характерным появлением патологических 100-Гц гамма-осцилляций в таламусе и моторной коре. Механизмы, лежащие в основе патологической синхронизации в BG-таламо-кортикальных нейронах и их вклад в процесс возникновения тяжелых двигательных нарушений и леводопа-индуцированной дискинезии, до конца не изучены. Выявление критических компонентов моторных нейросетей мозга, участвующих в этом процессе, может стать основой для разработки новых терапевтических методов лечения пациентов с БП.

Наружный отдел бледного шара (GPe) является ключевым звеном в нейросети BG, координирующим активность его входящих, от моторной коры и таламуса, и выходящих информационных сигналов на двигательные центры ствола мозга, и, таким образом, непосредственно влияет на двигательную функцию. Мы исследовали эффекты фармакологической блокады селективных входов GPe с помощью CPP, антагониста глутамата, и пикротоксина, антагониста ГАМК-A-рецепторов, а также обратимое подавление активности GPe мусцимол, агонистом ГАМК-A-рецепторов, на выраженность аномальных ритмов, и их способность устранять двигательную дисфункцию у бодрствующих крыс с экспериментальной болезнью Паркинсона.

Полученные результаты свидетельствуют, что мусцимол, CPP, а также пикротоксин, введенные в GPe, существенно уменьшали мощность 30-Гц бета-осцилляций в BG-таламо-кортикальных цепях и устраняли двигательный де-

фицит при ходьбе в круговом тредмилле. У крыс, получавших леводопу в высоких дозах, что приводило к развитию леводопа-индуцированной дискинезии, мусцимол или СРР, введенные в GPe, устраняли 100-Гц гамма-осцилляции локальных полевых потенциалов в моторной коре и вентро-медиальном ядре таламуса. Однако, только полное подавление активности GPe с помощью мусцимола предотвращало или в значительной степени снижало вероятность возникновения леводопа-индуцированной дискинезии.

На основании результатов работы можно сделать вывод, что модуляция активности в GPe у крыс с экспериментальной БП сопровождается восстановлением нормального баланса сетевой активности ядер ВГ и активности в проекционных связях от МСx к двигательным центрам ствола мозга, что приводит к (1) уменьшению моторного дефицита и (2) значительному подавлению выраженности леводопа-индуцированной дискинезии.

## **СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ И СЕРДЦА КРЫС ПРИ ГИПЕРТИРЕОИДИЗМЕ**

*Венедиктова Н.И., Соломадин И.Н., Миронова Г.Д.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

*E-mail:*\*tiggra4@yandex.ru

Гормоны щитовидной железы (тиреоидные гормоны, ТГ) участвуют в регуляции многих функций организма. Наиболее широко признанным эффектом тиреоидных гормонов у млекопитающих является их действие на энергетический метаболизм, также известный как гиперметаболический эффект (калоригенез). Некоторые исследователи считают, что тироксин способен индуцировать биогенез митохондрий, усиливая способность клеток к генерации энергии необходимой для биологических процессов (1). В ответ на изменения энергетического метаболизма наблюдаются и ультраструктурные перестройки митохондрий (видоизменение и нарушение локализации крист, набухание матрикса и изменение формы) (2). Таким образом, становится все более очевидным, что модификация митохондриальной морфологии может также оказывают драматическое воздействие и на клеточный метаболизм. Одним из способов регуляции окислительного фосфорилирования является динамика митохондрий (деление, слияние, перемещение органелл внутри клетки) и изменение популяции митохондрий (биогенез, разрушение). Так, дисфункция белка (OPA1) отвечающего за слияние митохондрий не только приводит к фрагментации органелл, но и нарушает мембранный потенциал, что указывает на его роль в работе комплексов электронной транспортной цепи (3). ТГ влияют и на эти процессы.

Целью настоящей работы было изучение структурно-динамических особенностей митохондрий печени и сердца крыс на модели гипертиреоза. Для моделирования гипертиреоза был использован тироксин ( $T_4$ ), в концентрации 200 мкг на 100 г массы животного внутривнутрибрюшинно, время применения составляло 7 дней. Развитие гипертиреоза подтверждали измерением концентрации свободных  $T_3$  и  $T_4$  в сыворотке крыс. У экспериментальных животных уровень  $T_3$  и  $T_4$  был повышен в 1.8 и 3.4 раза по сравнению со значениями в контрольной группе. Кроме того, введение тироксина животным вызвало снижение массы тела и сердца. Прирост массы тела у гипертиреоидных крыс (ГК) был снижен более чем в 2 раза. Увеличение соотношения массы сердца к массе тела у ГК свидетельствовало о значительной гипертрофии сердца, вызванной  $T_4$ . Электронные микрофотографии митохондрий печени контрольных крыс (КК) показали органеллы овальной или удлинённой формы, которые имели хорошо упакованные кристы и электронно-плотной матрикс без нарушений в положении крист. У гипертиреоидных крыс почти 50% митохондрий находилось в набухом состоянии. В этих митохондриях отмечалось снижение электронной плотности матрикса, но число крист изменялось незначительно. В некоторых органеллах была отмечена вакуолизация матрикса, а кристы были уменьшены как по количеству, так и по длине, а также меняли ориентацию и были смещены либо к центру, либо к периферии. В гепатоцитах ГК было зарегистрировано изменение конфигурации ядерной мембраны и конденсация хроматина. Ни в одном из образцов не было обнаружено ни некроза, ни каких-либо других патологических изменений. Миофибриллы имели типичное строение для сердца животных. Ядра кардиомиоцитов имели округлую форму и были ориентированы вдоль направления мышечных волокон. Для ядершек глобулярно-фибрилярной природы была характерна повышенная электронная плотность. Умеренно волнистая ядерная мембрана образовывала единичные инвагинации. В цитоплазме миоцитов наблюдались жирные липидные капли. Саркоплазматический ретикулум имел вид коротких цистерн, пузырьков и канальцев, располагающихся вблизи ядра, между митохондриями или пучков миофибрилл. Сходное строение кардиомиоцитов было зарегистрировано и в ткани ГК, за исключением отека цитоплазмы. Морфометрический анализ электронных снимков гепатоцитов показал, что количество митохондрий у ГК увеличилось на 33% ( $7.6 \pm 0.7$  vs  $11.3 \pm 0.8$ ), тогда как в сердце число органелл не изменилось ( $51 \pm 2$  vs  $49 \pm 2$ ).

Следующий этап работы заключался в определении содержания белков, участвующих в делении или слиянии митохондрий животных. Митохондрии функционируют как динамическая сеть, постоянно претерпевающая слияние и деление. Баланс между слиянием и делением важен для поддержания целостно-

сти митохондрий и облегчает перемешивание мембран и обмен ДНК между митохондриями. Митофузин-2 (Mf2) — это митохондриальный мембранный белок, который участвует в слиянии митохондрий и способствует поддержанию и работе митохондриальной сети. OPA1 еще один белок регулирующий слияние митохондрий и структуру крист во внутренней митохондриальной мембране. Mf2 опосредуют слияние внешней мембраны, в то время как OPA1 участвует в слиянии внутренней мембраны. DRP1 регулирует деление митохондрий. Деление помогает облегчить митофагию, которая представляет собой разрушение и переработку поврежденных митохондрий. Оказалось, что в митохондриях печени ГК происходило снижение уровня белков слияния в среднем на 30%, а количество белка деления увеличивалось на 54%. В митохондриях сердца ГК количество OPA1 увеличилось на 34%, а DRP1-на 28% по сравнению с контрольными значениями. Количество Mf2 в митохондриях сердца контрольных и опытных животных не изменялось. Снижение количества Mf2 и OPA1 в печени ГК может привести к фрагментации митохондриальной сети и подавить механизмы контроля качества митохондрий, такие как митофагия и аутофагия. Кроме того, известное усиление потребления кислорода со сниженной эффективностью фосфорилирования АДФ в печени (4) при гипертиреозе может объясняться именно изменением в содержании белков деления и слияния, а, следовательно, и процесса митофагии. Следует отметить и то, что данная модель гипертиреоза (внутрибрюшинное введение T4 в дозе 200 µg/100 g массы тела) оказывает более сильное воздействие на клетки печени по сравнению с сердцем.

Часть работы была выполнена на базе Сектора электронной микроскопии ЦКП ПНЦБИ РАН (№670266, <http://www.ckp-rf.ru/ckp/670266/>).

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-015-00132.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Lanni A., Moreno M., Goglia F.* Mitochondrial Actions of Thyroid Hormone // *Compr Physiol.* 2016. 6(4). 1591—1607.
- Hackenbrock C.R.* Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria // *J. Cell Biol.* 1966. 30. 269—297.
- Cogliati S., Frezza C., Soriano M.E., Varanita T., Quintana-Cabrera R., Corrado M. et al.* Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency // *Cell* 155. 2013. 160—171.
- Venediktova N., Mashchenko O., Talanov E., Belosludtseva N., Mironova G.* Energy metabolism and oxidative status of rat liver mitochondria in conditions of experimentally induced hyperthyroidism // *Mitochondrion.* 2020. 52. 190—196.



# ИЗМЕНЕНИЯ ИЗОФОРМНОГО СОСТАВА И ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ТИТИНА И ОБСКУРИНА В ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦАХ ДЛИННОХВОСТОВОГО СУСЛИКА (*UROCITELLUS UNDULATUS*) ПРИ ГИБЕРНАЦИИ

*Грбарская М.А.<sup>1</sup>, Михайлова Г.З.<sup>1</sup>, Грицына Ю.В.<sup>1</sup>, Уланова А.Д.<sup>1</sup>,  
Попова С.С.<sup>1</sup>, Захарова Н.М.<sup>2</sup>, Вихлянцев И.М.<sup>1</sup>*

- <sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук
- <sup>2</sup> Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Актуальным вопросом современной науки является раскрытие молекулярных механизмов ремоделирования мышечной ткани в условиях гипотермии. Зимняя спячка (гибернация) — эволюционно закреплённая способность некоторых теплокровных животных адаптироваться к низким температурам за счёт снижения активности всех физиологических систем организма. Известно, что сократительная способность скелетных мышц восстанавливается в течение 2—3 часов после выхода гибернанта из гипотермии, однако не ясно, по какой причине атрофические изменения в поперечнополосатых мышцах этих животных не сопровождаются нарушениями структуры саркомеров и ухудшением сократительной способности мышц. На сегодняшний день накоплены экспериментальные данные, подтверждающие, что титин и обскурин (гигантские белки саркомерного цитоскелета) участвуют в процессе ремоделирования мышечной ткани. Титин (тайтин/коннектин) является каркасом для сборки миозиновых нитей и саркомеров; участвует в поддержании саркомерной структуры и регуляции актин-миозинового взаимодействия. Показано, что в комплексе с сигнальными белками, титин играет роль сенсора растяжения и напряжения, участвуя в регуляции экспрессии генов мышечных белков и белкового обмена в саркомере. Эластичная часть молекулы титина в I-зоне способна развивать пассивное напряжение при растяжении и возвратную силу при сокращении саркомера. Альтернативный сплайсинг мРНК титина является основой разнообразия изоформ этого белка, имеющих различную длину в разных частях саркомера и, прежде всего, в I-зоне. Функциональный смысл подобного разнообразия изоформ титина до конца не ясен. Другой гигантский мышечный белок, обскурин, также подвергается альтернативному сплайсингу, вследствие которого экспрессируются более длинные (~800 кДа) или более короткие

(~40—500 кДа) изоформы этого белка. Показано, что обскурин взаимодействует с титином и другими белками саркомерного цитоскелета в М-линии и Z-дисках саркомеров, формируя трёхмерный цитоскелетный каркас, поддерживающий структуру миофибрилл и мышцы в целом. В отличие от титина, участвующего в формировании продольных размеров саркомеров, обскурин определяет поперечные размеры саркомеров и мышечных волокон. Более того, молекулы обскурина выходят за пределы саркомера и взаимодействуют с белками саркоплазматического ретикулула и субсарколеммальными белками, играя роль в поддержании целостности сарколеммы. Взаимодействие обскурина с титином в А/І-зоне саркомера и участие обскурина во встраивании титина в Z-диск свидетельствуют о тесной структурной и функциональной взаимосвязи этих двух гигантских белков.

Известно, что ремоделирование сердечной мышцы при развитии кардиомиопатий [Makarenko *et al.*, *Circ Res.* 2004], а также вследствие пребывания в экстремальных условиях, например, в условиях космического полёта [Vikhlyantsev *et al.*, *Biochemistry (Mosc)*, 2011], сопровождается увеличением содержания более высокомолекулярных (более длинных) изоформ титина. У зимнеящих животных наблюдается ремоделирование как миокарда (гипертрофия), так и скелетных мышц (атрофия) в период гибернации. Однако, несмотря на достаточно значительные изменения структуры и сократительной способности мышц, эти изменения быстро обратимы и не приводят к развитию патологических последствий после завершения сезона гибернации. Молекулярные механизмы уникальной пластичности поперечнополосатых мышц зимнеящих животных остаются во многом не раскрытыми.

Мы предположили, что сезонное обратимое ремоделирование миокарда и скелетных мышц зимнеящих будет сопровождаться изменением изоформного состава и экспрессии генов гигантских белков саркомерного цитоскелета титина и обскурина. В частности, в период гибернации возможно появление/увеличение доли более длинных изоформ титина и обскурина, что будет иметь определяющее значение для поддержания структуры саркомеров и необходимого уровня функциональной активности мышц в диапазоне температур от 0 °С до 37 °С.

В качестве модельного объекта исследования был выбран длиннохвостый суслик *Urociellus undulatus*. Спячка у этих животных продолжается 5—8 месяцев и состоит из циклов (баутов), за которыми следуют кратковременные пробуждения на период от нескольких часов до суток. Во время баута температура тела животного снижается до 2—4 °С, частота сердцебиения — до 4—20 ударов в минуту. Функциональная активность скелетных мышц сусликов

полностью ингибирована, в то время как сердечная мышца в этот период сохраняет активность. Выход животного из состояния гипотермии и разогрев до температуры +36—37 °С происходит в течение 1.5—3 часов. При этом скелетные мышцы полностью восстанавливают свою сократительную способность, а сердечная мышца испытывает большую функциональную нагрузку: ЧСС возрастает до 400 и более уд./мин.

Методами ДСН-гель-электрофореза, Вестерн-блоттинга и ОТ-ПЦР в реальном времени исследованы сезонные изменения изоформного состава титина и обскурина и изменения экспрессии генов этих белков в миокарде левого желудочка сердца и в скелетной мышце *m. longissimus dorsi* у сусликов четырёх экспериментальных групп: «Летняя активность» (нормотермия, 38 °С, июнь—июль,  $n = 7$ ); «Осенняя активность» (нормотермия, 38 °С, сентябрь,  $n = 7$ ), «Гипотермия» (глубокое оцепенение, декабрь—март, температура сердечной мышцы 1.5—2.0 °С, продолжительность периода гипотермии 4—11 суток,  $n = 5$ ); «Зимняя активность» (нормотермия, 36—37 °С, периодически повторяющиеся временные промежутки (не более суток) между периодами гипотермии, взятие материала через 10—12 ч эутермного состояния после пробуждения,  $n = 5$ ).

При константном уровне мРНК титина в миокарде длиннохвостого суслика в разные периоды годового цикла, в скелетных мышцах наблюдалось увеличение (в 2—3 раза,  $p \leq 0.01$ ) содержания мРНК этого белка в периоды «осенней» и «зимней» активности. По всей вероятности, это увеличение сопряжено со значительными “slow-to-fast” изменениями изоформного состава тяжёлых цепей миозина и других белков, которые протекают в периоды «осенней» и «зимней» активности в скелетных мышцах многих гибернантов [Popova et al., Sci Rep., 2020]. С помощью высокоразрешающего ДСН-электрофореза в крупнопористом 2%-полиакриламидном геле, укрепленном агарозой, исследованы сезонные изменения изоформного состава титина и содержания этого белка в поперечнополосатых мышцах длиннохвостого суслика. Нами не обнаружены «новые» (помимо известных: N2B, N2BA, N2A, NT) изоформы титина, однако зарегистрировано увеличение (в 1.5 раза  $p \leq 0.01$ ) относительного содержания наиболее высокомолекулярной NT-изоформы и увеличение (в 2 раза,  $p \leq 0.01$ ) относительного содержания более длинной (чем N2B) N2BA-изоформы в левом желудочке сердца сусликов группы «Зимняя активность». При этом наблюдалось увеличение ширины белковой полосы, соответствующей N2BA-изоформе, в сторону более высокомолекулярных белков. Эти результаты можно отнести в поддержку нашего предположения о том, что в сердечной мышце

длиннохвостого суслика в течение сезона гибернации синтезируются более высокомолекулярные (более длинные) изоформы N2BA-изоформы титина.

Методами ДСН-гель-электрофореза и Вестерн-блоттинга не выявлено сезонных изменений содержания изоформы обскурина с м.м. ~700 кДа в исследованных поперечнополосатых мышцах сусликов четырёх экспериментальных групп. При этом, с помощью используемых в работе антител на обскурин (Merck KGaA, Sigma-Aldrich®) (Anti-Obserurin Antibody, clone 5H10A) другие изоформы этого белка не выявлены. Однако выявлены сезонные изменения экспрессии гена обскурина. В частности, методом ОТ-ПЦР в реальном времени обнаружено увеличение (в 2.5—6 раз,  $p \leq 0.01$ ) содержания мРНК обскурина в исследованных поперечнополосатых мышцах сусликов из групп «Осенняя активность», «Зимняя активность», «Гипотермия». Таким образом, мы впервые получили результаты, которые позволяют предположить, что как в период подготовки длиннохвостого суслика к спячке («осенняя» активность), так и в период «зимней» активности в поперечнополосатых мышцах может наблюдаться повышенный синтез обскурина и, возможно, более высокомолекулярных его изоформ.

Адаптационное значение выявленных изменений, направленных на увеличение содержания более длинных изоформ титина и обскурина, может заключаться в поддержании необходимого уровня функциональной активности поперечнополосатых мышц в широком температурном диапазоне: от 0 °С—5 °С в период гипотермии до 37 °С в период выхода гибернанта из состояния гипотермии. Полученные данные расширяют фундаментальные представления о мышечной пластичности и имеют прикладное значение, заключающееся в разработке эффективных методов коррекции патологических изменений мышечной ткани.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00204.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА FUS-МЫШЕЙ — ТРАНСГЕННОЙ МОДЕЛИ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА**

*Деев А.А.<sup>1</sup>, Воробьев В.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

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

*E-mail:* ss\_deev@ Rambler.ru

Ранняя диагностика нейродегенеративных изменений в головном мозге, лежащих в основе формирования таких его патологий как болезни Альцгейме-

ра, Паркинсона и Хантингтона, а также рассеянный и боковой амиотрофический склерозы, чрезвычайно важна для поиска адекватной терапии этих заболеваний.

Одним из наиболее распространённых подходов в решении проблемы ранней диагностики заболеваний мозга является анализ его электрической активности, электроэнцефалограммы (ЭЭГ), изменения в которой отражают наличие и характер патологических (в частности, нейродегенеративных) процессов в мозге. Регистрация ЭЭГ от различных структур мозга позволяет получить представление об их функциональном состоянии и отклонениях от нормы, лежащих в основе развития болезни.

Боковой амиотрофический склероз (БАС) характеризуется прогрессирующей дегенерацией моторных нейронов коры и спинного мозга, что приводит к атрофии мышц. Для исследования БАС на мышцах используются трансгенные модели (в частности, так называемая “FUS”-модель), позволяющие анализировать механизмы, связанные с генетически детерминированным развитием этой патологии. В настоящее время мало что известно о роли центральных механизмов БАС, связанных с взаимоотношениями различных областей головного мозга в развитии этой болезни при генетической предрасположенности к ней.

В настоящем исследовании, проведённом на молодых и более старых (возрастом 2 и 5 месяцев, соответственно) FUS (Tg) и нетрансгенных (nTg) мышцах, регистрировали ЭЭГ от путамен (Pt) и от первичной моторной коры (M1). Частотные спектры ЭЭГ анализировали в течение 30 мин до (фоновые ЭЭГ) и 60 мин после системной инъекции дофамино-миметика, апоморфина (APO), и физиологического раствора (ФР). Основные результаты исследования представлены в работе [1].

Для анализа частотных спектров последовательных 12-секундных эпох ЭЭГ использовалось модифицированное периодо-амплитудное преобразование. Абсолютные значения амплитуд полутонов с периодами/частотами в каждом из выбранных частотных поддиапазонов ЭЭГ суммировались с последующей их нормировкой на сумму всех полученных значений. Частотные спектры ЭЭГ, полученные на каждом последующем 10-мин интервале, усредняли у каждой мыши и для всех животных одного возраста отдельно для nTg и Tg групп. Относительные различия в усреднённых спектрах ЭЭГ, полученных в экспериментах с физиологическим раствором (день 1) и APO (день 2) в каждой группе, были нормализованы к соответствующим фоновым значениям и вычислялись как  $(APO - \text{ФР})/\text{ФР}$  в процентах, обеспечивая оценку эффектов APO.

Достоверность динамических различий в спектрах ЭЭГ, усредненных на 10-мин интервалах в рамках «классических» частотных диапазонов (дельта1, дельта2, тета, альфа, бета1 и бета2), оценивали методом ANOVA для повторных измерений. Для множественных сравнений использовался апостериорный тест Бонферрони. Результаты считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Результаты исследований показывают, что у M1 молодых Tg и nTg мышей фоновые спектры ЭЭГ были сопоставимы, тогда как в Pt у Tg мышей усиливалась бета-активность.

У более старых Tg мышей бета активность доминировала в ЭЭГ как M1, так и Pt, тогда как тета и дельта2 были снижены по сравнению с nTg мышами. У более молодых Tg мышей, АРО усиливал тета и снижал бета2 преимущественно в M1. У старых Tg мышей, эффекты АРО в этих частотных диапазонах были инвертированы и сопровождалось усилением дельта2 и ослаблением альфа по сравнению с nTg мышами.

Предполагается, что выявленные модификации электроэнцефалограмм у FUS мышей связаны с ранними изменениями во взаимоотношениях стриатума (путамен) и моторной коры головного мозга и их дофаминергической медиации с последующими адаптивными внутримозговыми трансформациями. Полученные данные свидетельствуют также о том, что частотные спектры ЭЭГ могут использоваться как эффективные центральные маркеры БАС патологии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Vorobyov V., Deev A., Sengpiel F., Nebogatikov V. and Ustyugov A.A. Cortical and Striatal Electroencephalograms and Apomorphine Effects in the FUS Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis // J. of Alzheimer's Disease. 2021. 81. 1429—1443.

### **РОЛЬ ИЗОФОРМ $\alpha 2$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В ПОДАВЛЕНИИ Ca-ТОКОВ L-ТИПА В КАРДИОМИОЦИТАХ МЫШИ**

*Евдокимовский Э.В.<sup>1</sup>, Jeon. R.<sup>2</sup>, Park. S.<sup>2</sup>, Пименов О.Ю.<sup>1</sup>, Алексеев А.Е.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

<sup>2</sup> Department of Cardiovascular Medicine, Center for Regenerative Medicine, Mayo Clinic, Rochester, USA

*E-mail: onletaet@gmail.com*

Как было нами показано в предыдущих работах, помимо  $\alpha 1$ - и  $\beta$ -адренергических рецепторов, на клеточной мембране кардиоцитов присутствуют также  $\alpha 2$ -адренорецепторы ( $\alpha 2$ -АР), которые наряду с другими адренергически-

ми рецепторами контролируют стресс-реактивный ответ этих клеток [1, 2]. Мы установили, что, в дополнение к установленному  $\alpha 2$ -АР-опосредованному подавлению высвобождения катехоламинов надпочечниками,  $\alpha 2$ -АР в сердечных миоцитах улучшают  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостаз и поддерживают сократимость миокарда [2, 3]. Полученные данные свидетельствуют о том, что защитный потенциал  $\alpha 2$ -АР в кардиомиоцитах может быть использован не только против пагубных эффектов хронической стимуляции избытком катехоламинов, но и против ангиотензинергической нагрузки для смягчения развития сердечных дисфункций [1, 4]. В связи с этим, будущие работы, направленные на терапию сердечных заболеваний, связанные на восстановление или усиление  $\alpha 2$ -АР сигнализации, требуют идентификации изоформ  $\alpha 2$ -АР в кардиомиоцитах.

В данной работе мы проанализировали профиль экспрессии подтипов  $\alpha 2A$ ,  $\alpha 2B$  и  $\alpha 2C$  в левом желудочке сердца мыши и провели электрофизиологический анализ антагонистов, оценивая вклад этих изоформ в подавление тока  $\text{Ca}^{2+}$  L-типа ( $I_{\text{CaL}}$ ). Электрофармакологические исследования с использованием патч-клямпа показали, что в подавлении  $I_{\text{CaL}}$ , вызванном агонистом  $\alpha 2$ -адренорецепторов, участвует в основном изоформа  $\alpha 2C$ , в меньшей степени  $\alpha 2B$ , и не участвует  $\alpha 2A$  изоформа. Оценка экспрессии изоформ данных  $\alpha 2$ -адренорецепторов с помощью RT-qPCR подтвердила наличие мРНК генов *adra2b* и *adra2c* (гены изоформ  $\alpha 2B$  и  $\alpha 2C$ , соответственно), не *adra2a* (ген изоформы  $\alpha 2A$ ) в левом желудочке мыши. Иммуноблоттинг подтвердил присутствие в этой ткани только белков  $\alpha 2B$  и  $\alpha 2C$ .

Мы считаем, что полученные результаты еще больше подчеркивают значение  $\alpha 2$ -АР сигнализации, которая, улучшая гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  внутри клеток, может повысить эффективность сократительной систолической функции и снизить риск вредной клеточной перегрузки  $\text{Ca}^{2+}$  [5]. Кроме того, эти данные на молекулярном и генетическом уровне, обеспечивают важную основу для понимания функциональных реакций клеток миокарда на активацию  $\alpha 2$ -АР. Такая информация будет иметь решающее значение для будущей разработки животных моделей с тканеспецифическим нокаутом или активацией экспрессии изоформ  $\alpha 2$ -АР, а также для перспективной новой генной или клеточной терапии, направленной на лечение кардиомиопатии и сердечной недостаточности [1].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Alekseev A.E., Park S., Pimenov O.Y., Reyes S., Terzic A.* Sarcolemmal  $\alpha 2$ -Adrenoceptors in Feedback Control of Myocardial Response to Sympathetic Challenge // *Pharmacol. Ther.* 2019. 197. 179—190.
2. *Kokoz Y.M., Evdokimovskii E.V., Maltsev A.V., Nenov M.N., Nakipova O.V., Averin A.S., Pimenov O.Y., Teplov I.Y., Berezhnov A.V., Reyes S. et al.* Sarcolemmal  $\alpha 2$ -

- Adrenoceptors Control Protective Cardiomyocyte-Delimited Sympathoadrenal Response. // J. Mol. Cell. Cardiol. 2016. 100. 9—20.
3. *Averin A.S., Nakipova O.V., Kosarsky L.S., Pimenov O.Y., Galimova M.H., Nenov M.N., Berejnov A.V., Alekseev A.E.* Activation of Sarcolemmal  $\alpha 2$  Adrenoceptors Supports  $Ca^{2+}$  Homeostasis and Prevents Ventricular Arrhythmia under Sympathetic Stress // Biophysics. 2019. 64. 793—798.
  4. *Reyes S., Varagic J., VonCannon J., Cheng C.P., Ferrario C.M.* Novel Action of Cardiomyocyte  $\alpha 2$ -Adrenergic Receptors in Reversing Angiotensin II Mediated Cardiac Hypertrophy // Circulation. 2018. 138 (Suppl. S1). A16308.
  5. *Baier M.J., Klatt S., Hammer K.P., Maier L.S., Rokita A.G.*  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Is Essential in Hyperacute Pressure Overload // J. Mol. Cell. Cardiol. 2020. 138. 212—221.

## **ЭМБРИОГЕНЕЗ *G. GALLUS* В УСЛОВИЯХ ОСЛАБЛЕНИЯ МАГНИТНОГО ПОЛЯ ЗЕМЛИ**

*Емельянова М.С.,<sup>1</sup> Ломаева М.Г.,<sup>2</sup> Ломаев Г.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Ижевский государственный технический университет им. М.Т. Калашникова, г. Ижевск, Россия

<sup>2</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

*E-mail:* lommg1@gmail.com

В мире ширится интерес к таким экологическим факторам как воздействие электромагнитных излучений (ЭМИ) на живые организмы, в том числе изучаются вариации геомагнитного и электрического полей. Колебания геомагнитного поля (ГМП) в диапазоне нескольких процентов ощущаются всеми живыми организмами и, в том числе, человеком (так называемые «магнитные бури»). Особенно негативно на живые организмы и протекающие в них процессы (от молекулярного до организменного уровня) влияет гипогеомагнитное поле (ГГМП), то есть ослабленное геомагнитное поле. В течение ряда лет нами проводились измерения величины ГМП в квартирах, на заводах и в офисах, на транспорте, в результате были обнаружены многочисленные магнитопатогенные зоны [1]. Особенную опасность в этом плане, на наш взгляд, представляют сооружения, проектируемые по монолитной и каркасной технологии. У людей, работающих или живущих в магнитопатогенных зонах, обнаружены функциональные нарушения центральной и периферической нервной системы (бессонница, снижение памяти, утомляемость, депрессии, двигательные расстройства), а также сердечно-сосудистой системы (уменьшение интенсивности кровоснабжения). Особенно ярко влияние ЭМИ



проявляется во время активного роста и развития живых биологических объектов и систем.

Целью нашей работы было изучить влияние ГМП на органы и ткани эмбриона. Для проведения данного исследования в качестве модели мы использовали эмбрионы кур *Gallus gallus* кросса «Ломан Браун Классик» как активно развивающиеся организмы, от оплодотворенного яйца до однодневных цыплят. Развитие эмбрионов проходило в течение 21-го дня в автоматических лабораторных инкубаторах вместимостью 63 яйца (тип ИБ2НБ фирмы «БАГАН» РФ г. Новосибирск).

Для ослабления ГМП использовались квадратные катушки Гельмгольца (КГ). Особенностью данного опыта является использование вместо трех пар КГ, как это чаще всего делается, только одной пары. Это достигнуто тем, что одна из граней КГ лежит в плоскости «север — юг», а ось КГ коллинеарна вектору ГМП. Яйца были разделены на одну контрольную и три опытные группы. Контрольная группа инкубировалась в окружении естественного ГМП, а три опытные группы в — ГМП. Во время инкубации трех опытных групп ГМП было ослаблено, соответственно, в 2, 4, 6 раз с погрешностью 10%. При выборе степени ослабления ГМП мы руководствовались нормой отечественного СанПиНа. На 7, 11 и 18-е сутки инкубации эмбрионов и у однодневных цыплят регистрировалось состояние и соответствие этапов их развития стандартам, описанным в литературе [2]. Контроль развития эмбрионов осуществлялся путем взвешивания яиц и просвечиванием на овоскопе. На просвет можно было увидеть размер и сложность развития кровеносной системы эмбриона. Скорость изменения массы яйца свидетельствовала о скорости развития эмбриона. Исследование развития куриных эмбрионов в условиях ГМП ослабленного в 2, 4 и 6 раз показало замедление, в сравнении с контролем, потребления питательных веществ из желточного мешка на 11,8%, 17,9% и 20,4%, соответственно. У эмбрионов и вылупившихся цыплят были изучены размеры и морфология сердца, печени, легких, желудочно-кишечного тракта и фабрициевой сумки, а также клинический анализ крови. Кроме того, у цыплят были оценены внешний вид (в том числе состояние оперения) и качество первичных инстинктов.

Показатели крови (уровень лейкоцитов, эритроцитов и гемоглобина) эмбрионов кур контрольной группы находились в пределах физиологической нормы, а показатели крови эмбрионов в опытных группах достоверно отличались от нее в меньшую сторону. Так, ожидалось, что количество лейкоцитов в крови будет нарастать с 7 по 11-е сутки, в контрольной группе этот показатель увеличился в 5 раз, а в опытных — в среднем в 3 раза. Концентрации гемогло-

бина и эритроцитов в крови значительно увеличилась лишь в двух группах: контрольной и ГМП/2, в двух других опытных группах шло значительное снижение уровня гемоглобина в крови эмбрионов, и, как следствие, снижался гематокрит.

В опытных группах, развивавшихся в условиях ослабленного в 2, 4 и 6 раз ГМП, в сравнении с контрольной, патологоанатомическое исследование показало увеличение размеров сердца на 21,1%, 47,4% и 84,2%, соответственно и печени на 13,4%, 22,3% и 28,6%, соответственно. Также часто регистрировалось воспаление печени, с серовато-белыми очажками некроза, переполнение желчного пузыря желчью, очаги некроза в сердце, легких, воспаление слизистой оболочки кишечника. Наблюдалось уменьшение значения размера мышечного желудка (на 11,8%, 14,7% и 21,1%, соответственно) по сравнению с контролем. Фабрициева сумка была недоразвита, мало дифференцирована на корковое и мозговое вещество, имела слабо выраженную дольчатость. У цыплят, развивавшихся при уменьшении магнитного поля Земли даже в два раза, обнаруживалась эмбриональная алиментарная дистрофия: липкость пера, воспаление суставов. Цыплята опытных групп после вылупления демонстрировали изменения в проявлениях первичных инстинктов (в том числе инстинкта клевания) или полное их отсутствие. Например, при ослаблении ГМП в 6 раз более 80% эмбрионов на 21-й день развития не смогли проклонуть скорлупу.

Таким образом, было показано, что воздействие ГГМП на эмбриогенез, начиная с самых ранних сроков развития, отражается как на количественных, так и на качественных показателях жизнеспособности биообъекта. Нами было установлено, что ослабление ГМП в более чем в два раза является экологическим (паталогическим) уровнем, на котором становятся заметны морфологические и структурные изменения в эмбрионах *G. gallus*. Морфологические и гематологические показатели эмбрионов *G. gallus* опытной группы с ослаблением ГМП в 2, 4 и 6 раз достоверно отличаются от контрольных.

Работа выполнена при участии гранта: ШАВ/20-67-21 «Разработка организационно-технологических решений нормализации опасных уровней электромагнитного излучения в городской среде».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ломаев Г.В., Рябов Ю.Г., Емельянова М.С. Концепция создания комфортных электромагнитных условий в помещениях зданий и сооружений // Качество и жизнь. 2014. 4(4). 47—52.
2. Фисинин В.И., Журавлев И.В., Айдинян Т.Г. Эмбриональное развитие птицы / Всеоюз. Акад. с.-х. наук им В.И. Ленина. — М. : Агропромиздат. 1990. 240 с. ISBN 5-10-001984-5.

## ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ДОЗ ИМПУЛЬСНОГО ИЛИ НЕПРЕРЫВНОГО ЛАЗЕРНЫХ И РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЙ, А ТАКЖЕ ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КРОВИ И ЛИМФОИДНЫЕ ОРГАНЫ МЫШЕЙ *IN VIVO*

Заичкина С.И.<sup>1</sup>, Дюкина А.Р.<sup>1</sup>, Сорокина С.С.<sup>1</sup>, Поцелуева М.М.<sup>1</sup>, Юсупов В.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

<sup>2</sup> Институт фотонных технологий Федеральный научный исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН, г. Москва, г. Троицк, Россия

E-mail: Dyukina@rambler.ru

Различные ионизирующие и неионизирующие излучения, как природного, так и техногенного характера, являются факторами экологического риска. Поиск способов выявления действия этих факторов до сих пор является актуальной проблемой современной радиоэкологии. В настоящее время ведутся интенсивные исследования по поиску нефармакологических способов лечения различных заболеваний с помощью активации биологического резерва устойчивости к различным повреждающим воздействиям, которые могут привести к генетическим нарушениям, злокачественному перерождению клеток и возникновению дефектов развития у потомства. Исходя из наших многочисленных исследований действия низких доз ионизирующей радиации на разные объекты *in vitro* и *in vivo*, мы предполагаем, что наиболее перспективным для выявления и изучения этого резерва устойчивости является использование феномена радиационного адаптивного ответа, который заключается в том, что предварительное облучение объекта в малых адаптирующих дозах гамма- или рентгеновского излучений приводит к снижению чувствительности к последующему выявляющему воздействию больших доз этих же воздействий (0.1 Гр + 1.5 Гр). Проблема поиска различных агентов физической или химической природы, способных, как и малые дозы ионизирующей радиации, активировать естественную защиту организма, является до сих пор актуальной.

Цель настоящей работы — выявление клеточных реакций в цельной крови и лимфоидных тканях мышей при облучении различными физическими и химическими агентами: с помощью анализа клеточного состава и уровня продукции активных форм кислорода в цельной крови, а также клеточности лимфоидных органов (тимуса и селезенки). Работу проводили на самцах мышей линии SHK. В качестве физических агентов использовали низкие дозы ионизирующего (рентгеновские лучи (0.1 Гр, 0.5 Гр) и неионизирующих излучений (фемтосекундный лазер (АВЕСТА, РФ) (525 нм, 200 фс, 70 МГц) при мощностях дозы 0.05, 0.5 и 5 мВт, и экспозиции облучения от 1 до 50 с, что соответ-

ствует плотности потока энергии 0.1 — 52 мДж/см<sup>2</sup>), непрерывный зеленый лазер (532 нм, 3.7 мВт, 1, 5 и 10 с, что соответствует плотности потока энергии 4.8, 24 и 48 мДж/см<sup>2</sup>) и химических агентов — иммуномодулятор СаСl<sub>2</sub> (1г/250 мл воды в течение 6 суток) и противовоспалительный препарат ибупрофен (в/б 10 мг/кг однократно). Через сутки по отработанной ранее нами схеме индукции радиационного адаптивного ответа все группы животных дополнительно облучали рентгеновским излучением в дозе 1.5 Гр (60 мДж/см<sup>2</sup>). На каждую экспериментальную точку использовали не менее 5 мышей.

С помощью стандартных методик был проведен гематологический анализ, определен уровень продукции АФК в цельной крови методом люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции (СHEMILUM-12, Россия) и индекс относительной массы тимуса и селезёнки.

Обнаружено, что при всех вариантах обработки мышей химическими и физическими агентами клеточный состав крови, уровень продукции АФК в цельной крови и клеточность лимфоидных органов не отличались от спонтанного фона.

Анализ клеточности лимфоидных органов показал, что предобработка животных всеми изученными агентами приводила к снижению радиочувствительности при последующем облучении рентгеновским излучением в дозе 1.5 Гр по сравнению с непредобработанными животными, т.е. индекс массы лимфоидных органов оставался в пределах контрольных значений, кроме групп предварительно облученных рентгеновским излучением в более высокой дозе 0.5 Гр, фемтосекундным лазерным излучением в дозе 2.1 и 52 мДж/см<sup>2</sup> (0.5 мВт), 21 и 52 мДж/см<sup>2</sup> (5 мВт) и непрерывным зеленым лазерным излучением в дозе 48 мДж/см<sup>2</sup> (3.7 мВт) не защищало от действия последующего облучения в дозе 1.5 Гр, т.е. приводило к снижению индекса массы органа по сравнению с необлученным контролем. Определение уровня продукции АФК показало, что индекс активации, рассчитанный по отношению индуцированной светоплощади к спонтанной, был достоверно выше у всех предобработанных групп мышей, что говорит об активации резерва естественной защиты по сравнению с группой животных, облученных только в дозе 1.5 Гр. В то же время предварительное облучение животных рентгеновским излучением в дозе 0.5 Гр или фемтосекундным лазерным излучением в дозе 2.1 и 52 мДж/см<sup>2</sup> (0.5 мВт), 21 и 52 мДж/см<sup>2</sup> (5 мВт) и непрерывным зеленым лазерным излучением в дозе 48 мДж/см<sup>2</sup> (3.7 мВт) не увеличивало индекс активации по сравнению с непредобработанными животными. Обнаружено изменение клеточного состава крови в зависимости от дозы и мощности излучения. Защитный эффект всех изученных агентов выявляется в одинаковом узком диапазоне доз и коррелирует

с образованием АФК, что указывает на схожий механизм его индукции и на возможность активации резерва естественной защиты организма.

Таким образом, полученные результаты по исследованию защитных свойств различных агентов на мышах, облученных рентгеновским излучением, зависят от величины и качества дозы активирующего воздействия, выбранных тканей и методов и могут служить дополнительным чувствительным тестом для выявления повреждений от различных экологических факторов. По количеству факторов, запускающих процессы адаптивного ответа, свидетельствующих об активации естественной защиты организма и количеству реакций организма в одной и той же области потоков энергии, нам кажется, что триггерный механизм естественной защиты организма неспецифичен.

## **НОВЫЕ АСПЕКТЫ МЕТОДОЛОГИИ ГЕЛИОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

*Зенченко Т.А.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия,  
*E-mail: zench@mail.ru*

Одной из главных проблем изучения солнечно-биосферных связей является недостаточная воспроизводимость результатов, получаемых в разных исследованиях.

Часть эффектов относится к числу более воспроизводимых и повторенных многими исследователями, например, обнаруженный А.Л. Чижевским эффект развития глобальных эпидемий преимущественно вблизи максимумов солнечной активности (СА) [1]. Или вывод ряда исследователей о повышении числа обострений сердечно-сосудистых заболеваний во время магнитных бурь [2]. К числу многократно воспроизведенных результатов относится и эффект повышения уровня артериального давления (АД) у пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, как индивидуального, так и среднегруппового [3, 4].

Другие результаты воспроизводятся хуже, например, характер реакции частоты сердечных сокращений (ХСС) человека или животных на геомагнитные возмущения (ГМВ). Разные авторы сообщают о разнонаправленных типах реакции: в одних исследованиях ЧСС возрастает по время ГМВ, в других снижается, в третьих, эффекта не обнаружено.

На протяжении многих десятилетий в гелиобиологии основные усилия были сосредоточены на доказательстве самого факта реальности и неслучайно-

сти солнечно-биосферных связей. В то же время задачу поиска причин нестабильности эффекта, которая проявлялась в виде различий характеристик получаемых результатов, авторы работ оставляли на будущее, объясняя его существованием ряда неконтролируемых (и даже неизвестных толком) дополнительных внешних факторов, влияющих на степень и характер гелиобиологического эффекта.

На наш взгляд, полученных за 100 лет результатов достаточно, чтобы попытаться выявить и сформулировать эти неконтролируемые факторы. Ранее мы предположили, что нестабильность гелиобиологического эффекта обусловлена в первую очередь методологическими причинами: существующие методологические подходы, традиционные для физики и для биологии, плохо пригодны для исследования системы солнечно-биосферных связей в силу сложности изучаемой системы.

За последнее десятилетие, в том числе при активном участии нашей группы, были выявлены, подтверждены и включены в общее мировоззрение несколько моментов, специфических именно для гелиобиологических исследований:

1) индивидуальный характер реакции: анализ индивидуальных данных дает намного более самосогласованные и логичные результаты, чем традиционно принятый в медицине средне-групповой подход. Операция усреднения по группе в значительной степени скрывает гелиобиологический эффект;

2) обязательность одновременного учета действия факторов земной и космической погоды: эти два класса факторов воздействуют на одни и те же системы организма, и их сочетание может как усиливать, как и ослаблять метеотропный эффект;

3) учет временного фактора, т.е. фазы ритмических гелиофизических процессов, причем в любом масштабе времени: 11-летнего солнечного цикла, среднего уровня ГМА в период проведения наблюдений, на внутрисуточном масштабе — соотношение фаз магнитной бури и суточной геомагнитной вариации.

Нами была выполнена систематизация максимально широкого набора гелиобиологических результатов, и мировых, и российских, полученных за последние примерно 25 лет [5]. Для систематизации были предложены три критерия:

1) временной масштаб дискретизации биологических и гелиогеофизических данных (годовой, суточный, внутрисуточный (часы и минуты));

2) уровень организации исследуемой биологической системы (популяция, группа, индивидуум, система организма, отдельный орган);

3) степень ответа биосистемы (норма, адаптация, срыв адаптации (болезнь), катастрофа (смерть)).

Было показано, что известные гелиобиологические эффекты подчиняются общей закономерности: чем крупнее рассматриваемый масштаб времени, тем выше уровень организации исследуемой биологической системы и тем сильнее (катастрофичнее) степень ее ответа на действие факторов космической погоды.

В качестве следствий из проведенной систематизации нами были сформулированы еще два важных принципа.

1. *Существование оптимального частотного окна для изучения реакции определенной биосистемы.* Так, для изучения закономерности возникновения эпидемий наиболее удобен годовой масштаб дискретизации данных, для реакции показателей АД — суточный, для реакции сердечного ритма и электрической активности мозга — минутный (или даже еще более частый). Для суточного масштаба показатели сердечного ритма обладают слишком быстрой изменчивостью, что и приводит к упомянутой выше нестабильности получаемых эффектов. Аналогичный вывод можно сделать относительно изучаемых гелио и геофизических факторов. Поэтому в случае, когда для изучения эффекта исследователем выбран неоптимальный масштаб дискретизации данных, получаемый результат оказывается либо полностью сглаженным (нет эффекта), либо слишком вариабельным, т.е. нестабильным.

2. *Существование разных типов ответа биологической системы на разных временных масштабах.* Биологический эффект электромагнитных колебаний на частотах Шумановских резонансов или геомагнитных пульсаций многократно был зарегистрирован в виде сдвига частоты ритмических биологических процессов, которое не сопровождалось сдвигом среднего значения ФП. Попытки обнаружить действие этих факторов именно по сдвигу среднего значения могут также приводить к нестабильности выявляемого эффекта.

Таким образом, методологические принципы, как уже вошедшие в гелиобиологические исследования в последние 10 лет, так и новые, полученные на основании проведенной систематизации гелиобиологических эффектов, позволяют в значительной мере снизить процент необъяснимых невоспроизводимых результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Чижевский А.Л.* Земное эхо солнечных бурь. М. : Мысль, 1976. С. 249—268.
2. *Бреус Т.К.* Влияние солнечной активности на биологические объекты : дисс. ... д-ра ф-м. наук. 2003. 248 с.
3. *Dimitrova S., Stoilova I., Cholakov I.* Influence of local geomagnetic storms on arterial blood pressure // *Bioelectromagnetics*. 2004, 25:408—414. doi: 10.1002/bem.20009

4. *Зенченко Т.А.* Метод последовательных приближений в задаче исследования механизма индивидуальных гелиометеотропных реакций // Сборник материалов международной конференции «Влияние космической погоды на здоровье человека в космосе и на Земле». Москва, 4—7 июня 2012, с. 633—648. <http://www.iki.rssi.ru/books/2013breus2.pdf>
5. *Zenchenko T.A., Breus T.K.* The Possible Effect of Space Weather Factors on Various Physiological Systems of the Human Organism // *Atmosphere*. 2021. 12. 346. <https://doi.org/10.3390/atmos12030346>

## ФОРМУЛА АДАПТАЦИИ

*Иваницкий Г.Р.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия  
*E-mail:* ivanitsky@iteb.ru

Для ориентации в условиях постоянных изменений внешней среды нужна многоуровневая организация обработки информации, комплементарная ей, которая обеспечивает устойчивость живой системы. Это было показано в работе [1]. Каждое действие, производимое организмом, имеет свою цену  $H$ . Эта цена есть функция:

$$H = f(E, \tau),$$

где  $E$  — потребляемая энергия;  
 $\tau$  — время действия.

В стрессовых ситуациях скачком увеличивается величина затрачиваемой энергии, а время действия  $\tau_i$ , каждого этапа уменьшается. Следовательно, частота  $\Omega_i$  выполнения всех действий при переходе от уровня к уровню снизу-вверх увеличивается. Если имеет место  $N$  иерархических уровней, где каждый из них может вносить свою лепту в затрату накопленной энергии, то суммарные затраты энергии возрастают и достигают максимума. В результате имеем:

$$E_{\max} = \frac{1}{2\pi} \sum_{i=1}^N H_i \Omega_i \quad (1)$$

где  $\Omega$  — частота действия.

Это выражение соответствует ситуациям в условиях сильного стресса. Сумма затрат энергии в выражении (1) определяется уровнями с большой величиной слагаемых, т.е. нижними уровнями, работающими с высокой частотой (квантовым, молекулярным и макромолекулярным). В слабо стрессовых ситуациях, связанных, например, с обучением, минимизируется суммарная цена



действия. Все  $N$  уровней работают в неполную силу, что соответствует выражению:

$$H_{\min} = 2\pi \sum_{i=1}^N \frac{E_i}{\Omega_i} \quad (2)$$

При этом в суммарную цену действия  $H_{\min}$  наибольший вклад вносят уровни, работающие с малой частотой: социальным (общественное мнение и поощрение), организменным (комфорт индивида), органным (комфорт внутренней среды при взаимодействии между органами) и т.д. Вывод: *изменение скорости адаптации живых систем к изменениям внешней среды основано на механизме ускорения ↔ торможения*. Дефекты такого механизма могут приводить к гибели животного.

В работе [2] нами был рассмотрен механизм ускорения адаптации, основанный на возникновении перекрестной диффузии (кросс-диффузии) за счет обратной связи при парном взаимодействии каждого из двух уровней — верхнего со своим нижним уровнем. Например, ускорение клеточного метаболизма (активатора) в цикле обратной связи способствует ускорению адаптационной работы органа, составленного из этих клеток:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= f(u, v) + D_1 \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \pm h_1 \frac{\partial}{\partial x} \left( Q_1(u, v) \frac{\partial v}{\partial x} \right) \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= g(u, v) + D_2 \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} \mp h_2 \frac{\partial}{\partial x} \left( Q_2(u, v) \frac{\partial u}{\partial x} \right) \end{aligned} \quad (3)$$

где  $u$  и  $v$  — соответственно скорости поступления активатора и ингибитора;

$t$  — время;

$x$  — координата в пространстве;

$D$  — коэффициент диффузии.

При  $h_1 = h_2 = 0$  модель (3) представляет собой обычную систему типа «реакция-диффузия», но с коэффициентами диффузии  $D_1 \geq 0$ ,  $D_2 \geq 0$  (по крайней мере, один  $D_i \neq 0$ ). В случае, когда хотя бы один из коэффициентов  $h_i \neq 0$  (знак может быть любым), то система является кросс-диффузионной. Линейной кросс-диффузии соответствует  $Q_i(u, v) = \text{const}$  для  $i = 1, 2$ , для нелинейной кросс-диффузии  $Q_i(u, v) \neq \text{const}$  хотя бы для одного  $i$ . При этом предполагается, что вектор направления движения активатора и ингибитора не меняет направления движения. Например, такой системой является кора мозга человека, в которой распространение волны возбуждения по нейронной сети не меняет направления движения волны при решении мозгом данной задачи [1]. Однако

такая ситуация возникает не всегда. В общем случае в уравнение (3) необходимо внести дополнительное слагаемое, которое учитывало возможность смещения, именуемое *адвекцией*. Термин *адвекция* происходит от лат. *advectio* (доставка) — это волновое движение какого-либо вещества, которое переносит в пространстве свои свойства (информацию, температуру, влажность и т.п.). В метеорологии говорят, например, об адвекции тепла и холода, переносимого ветром. В гидромеханике вместо термина «адвекция» чаще используют термина *конвекция*. В недавно опубликованной нами работе [3] получено уравнение, одновременно описывающее кросс-диффузию и кросс-адвекцию:

$$\begin{aligned}\frac{\partial u}{\partial t} &= -u - v + H(u - a) + D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + h \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + j \frac{\partial v}{\partial x} \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= \varepsilon(u - v) + D \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} - h \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} - j \frac{\partial u}{\partial x}\end{aligned}\quad (4)$$

Если сравнить запись уравнения (3) и уравнение (4) [при  $f(u, v) = -u - v + H(u - a)$  и  $g(u, v) = \varepsilon(u - v)$ , где  $H$  — функция Хевисайда,  $\alpha$  — порог активации,  $\varepsilon$  — коэффициент], то нетрудно заметить наличие в уравнении (4) дополнительного слагаемого, которое соответствует адвекции с коэффициентом  $j$ . Кросс-диффузионная часть с коэффициентом  $h$  и кросс-адвективная часть с коэффициентом  $j$ , имеют противоположные знаки и содержат одну положительную константу  $j$  (для выражения ускорения), а вторую отрицательную для выражения торможения. Во многих случаях  $\varepsilon$  мало. В работе [3] был рассмотрен случай, когда  $\varepsilon = 1$ . Анализ показал, что ускорение (активация) способствует удержанию волны на траектории, а торможение (ингибирование) способствует поперечному сносу распространения волны, т.е. бифуркации.

Если исследование моделей с эффектом лишь кросс-диффузии (уравнение 3) привело к обнаружению новых особенностей волн, т.е.: существованию фронтов сложной формы, конечных цугов импульсов, взаимодействию солитонного типа при столкновении, то включение кросс-адвекции в дополнение к кросс-диффузии приводит к новому пространственно-временному поведению волн. Диаграмма зависимости скорости от коэффициента поперечного переноса для импульсов демонстрирует разветвление волны, когда одна волна разбивается на множество ветвей, с разными профилями и значениями скорости. Закон дисперсии для цугов волн содержит колебательные режимы, и разрывы волны на две ветви. Численное моделирование показывает, что при больших значениях периода существуют два волновых цуга, которые сближаются и в конечном итоге сливаются в один волновой цуг по мере уменьшения значения

периода. Было показано, что учёт перекрестной адвекции имеет нетривиальные эффекты, качественно изменяющие пространственно-временную динамику реакционно-диффузионных систем с перекрестной диффузией. Главное направление будущих работ касается анализа устойчивости обнаруженных различных решений уравнения (4), что можно будет трактовать как изменение устойчивости систем, описываемых этими уравнениями. Возможно, что в будущем удастся с этой позиции ответить также на вопрос: что такое сознание человека с позиции физики?

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Иваницкий Г.П.* Робот и Человек. Где находится предел их сходства? // Успехи физических наук. 2018. 188. 965—991.
2. *Цыганов М.А., Бикташев В.Н., Бриндли Дж., Холден А.В., Иваницкий Г.П.* Волны в кросс-диффузионных системах — особый класс нелинейных волн // Успехи физических наук. 2007. 177. 275—300.
3. *Zemskov E.P., Tsyganov M.A., Ivanitsky G.R. and Horsthemke W.* Solitary pulses and periodic wave trains in a bistable FitzHugh-Nagumo model with cross diffusion and cross advection // PHYSICAL REVIEW E. 2022. 105.014207. 1—10.

### РЕШЕНИЕ ДИЛЕММЫ «ЛИМИТИРУЮЩЕЕ СХОДСТВО VS. ЛИМИТИРУЮЩЕЕ РАЗЛИЧИЕ» МЕТОДОМ ПРОЗРАЧНОГО ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА

*Калмыков Л.В.<sup>1</sup>, Калмыков В.Л.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

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

Часть проблем в науке возникают из-за многозначности и неясности используемых понятий. Как следствие, возникают противоречия и парадоксы. Дополнительной проблемой является непрозрачность математических моделей. Большая часть моделей сложных систем относятся к моделям типа черный ящик. Такие модели не позволяют прямо исследовать внутренние механизмы изучаемых объектов. Наш анализ этих проблем представлен в специальном методологическом исследовании [1]. Здесь представлено исследование, в котором мы разобрались с одним очень запутанным экологическим парадоксом [2]. Решить эту старую проблему нам удалось устранением неясностей и противоречий в используемых понятиях, применением метода автоматического логического вывода и полностью прозрачных математических моделей. Мы проверили две противоречащие друг другу экологические гипотезы. Механизмы межвидовой конкуренции, лежащие в

основе теории эволюции, до сих пор остаются недостаточно изученными. Поиск конкретных механизмов реализации конкурентного исключения стал критически важным для экологов. Поскольку принцип конкурентного исключения гласит, что сходные виды не могут занимать одну и ту же ресурсную нишу, была сделана попытка понять пределы сходства видов, при которых они все еще могут сосуществовать. Так экологами была сформулирована гипотеза лимитирующего сходства, которая предполагает наличие максимально допустимого уровня сходства конкурирующих видов, превышение которого ведет к конкурентному исключению. Позже была сформулирована противоположная точка зрения — гипотеза лимитирующего различия. Гипотеза лимитирующего различия предполагает наличие максимально допустимого уровня различий конкурентоспособности противоборствующих видов, превышение которого ведет к конкурентному исключению. Возникла дилемма, так как гипотеза лимитирующего сходства и гипотеза лимитирующего различия делают взаимоисключающие утверждения. Как мы выяснили, эта путаница происходит по четырем причинам. Кратко: (1) невозможность тщательной экспериментальной проверки гипотетических механизмов, реализующих принцип конкурентного исключения, т.к. всегда остается подозрение, что какие-то скрытые факторы эксперимента не были учтены, (2) непрозрачность математических моделей, которая затрудняет прямое изучение механизмов, (3) многофакторный характер межвидовой конкуренции, когда сочетание множественного разнообразия экологических ресурсов и условий окружающей среды, внутренних видовых предпочтений в отношении ресурсов и функциональных характеристик конкурирующих видов порождает множество механизмов, которые способствуют сосуществованию, (4) четвертый источник трудностей при проверке этих гипотез — высокая степень неопределенности понятия «ниша». В общем смысле термин «ниша» относится ко всему набору экологических характеристик вида, включая характеристики среды обитания (ресурсов), характеристики потребностей в ресурсах и функциональные характеристики адаптивных способностей вида. Для точного изучения механизмов конкурентного сосуществования в наших математических моделях мы четко разделили функциональные признаки видов и их ресурсную среду обитания. Основное внимание исследователей уделялось преимущественно гипотезе лимитирующего сходства. При этом одна часть исследователей поддерживает гипотезу лимитирующего сходства, а другая часть исследователей её критикует. Мы предположили, что изменение относительных различий в конкурентоспособности двух видов, которые являются идентичными потребителями, конкурирующими только за один лимитирующий ресурс, позволит нам количественно проверить справедливость гипотез и решить дилемму.

Мы реализовали прозрачную математическую модель рационального мышления как автоматический дедуктивный гиперлогический вывод благодаря построению продукционных правил логического клеточного автомата на основе аксиом общей теории экосистемы. Поведение микрообъектов моделируемой системы при этом логически «зашивается» в единый целостный макрообъект с помощью локальных взаимодействий, опосредуемых клеточно-автоматной окрестностью. Главной особенностью нашего подхода является сочетание структурной прозрачности нашей модели экосистемы с автоматическим логическим выводом. Это позволило нам детально исследовать межвидовую конкуренцию в экосистеме. Представлена общая методология исследования, основные определения и аксиомы теории экосистемы, формализм автоматического дедуктивного вывода, исходный код нашей модели на языке C++, видеоролики компьютерных экспериментов и все первичные данные компьютерных экспериментов. Ранее данным методом мы проверили справедливость формулировок принципа конкурентного исключения [3], решили парадокс биоразнообразия [4] и впервые создали полностью дискретные модели экологических катастроф [5].

В представляемой работе мы показали, что два трофически идентичных вида, агрессивно конкурирующих только за один лимитирующий ресурс, могут сосуществовать в одной ограниченной нише, несмотря на полное сходство их функциональных адаптивных признаков. В то же время, при прочих равных, установлено, что максимальное значение порога межвидового различия функциональных признаков, превышение которого приводит к конкурентному исключению, составляет 31%. Эти результаты отвергают гипотезу лимитирующего сходства и подтверждают гипотезу лимитирующего различия. Обсуждаются причины долгой неопределенности относительно справедливости этих противоречащих друг другу гипотез.

Полученные результаты важны для эволюционной теории и для поиска путей экологической устойчивости. Исследование демонстрирует возможность прозрачного многоуровневого и многочастичного моделирования сложных систем в результате сочетания аксиоматической теории экосистемы с формализмом логических клеточных автоматов. Наше индивидуально-ориентированное моделирование сложных систем, основанное на прозрачном искусственном интеллекте, открывает большие перспективы для более глубокого изучения механизмов сложных систем и для разработок в области искусственного интеллекта.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Kalmykov V.L., Kalmykov L.V.* On ecological modelling problems in the context of resolving the biodiversity paradox // *Ecological Modelling*. 2016. 329. 1—4.

2. *Kalmykov L.V., Kalmykov V.L.* A solution to the dilemma 'limiting similarity vs. limiting dissimilarity' by a method of transparent artificial intelligence // *Chaos, Solitons & Fractals*. 2021. 146. 110814.
3. *Kalmykov L.V., Kalmykov V.L.* Verification and reformulation of the competitive exclusion principle // *Chaos, Solitons & Fractals*. 2013. 56(0). 124—131.
4. *Kalmykov L.V., Kalmykov V.L.* A Solution to the Biodiversity Paradox by Logical Deterministic Cellular Automata // *Acta Biotheoretica*. 2015. 63(2). 203—221.
5. *Калмыков Л.В., Калмыков В.Л.* Исследование индивидуально-ориентированных механизмов динамики одновидовой популяции с помощью логических детерминированных клеточных автоматов // *Компьютерные исследования и моделирование*. 2015. 7(6). 1279—1293.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ А-ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА, ИНДУЦИРОВАННОГО РЕНТГЕНОВСКИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

*Карманова Е.Е.<sup>1,2</sup>, Черников А.В.<sup>1</sup>, Иванов В.Е.<sup>1</sup>, Усачева А.М.<sup>1</sup>, Брусков В.И.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия;

<sup>2</sup> Институт биофизики клетки ФИЦ НЦБИ РАН, Пушкино, Россия

*E-mail:* silisti@bk.ru; bruskov\_vi@rambler.ru

Основной мишенью при воздействии ионизирующего излучения являются водные среды организма. При этом образуются свободные радикалы и активные формы кислорода (АФК). При образовании АФК свыше уровня антиоксидантной защиты они вызывают окислительный стресс и окислительное повреждение липидов, белков и ДНК. Установлено, что  $\alpha$ -липовая кислота (ЛК), используемая для лечения диабетической и алкогольной невропатии и в комплексной терапии ряда заболеваний [1] эффективно нейтрализует продукты радиолиза воды, индуцируемого рентгеновским излучением. ЛК проявляет генопротекторные свойства *in vitro* и *in vivo*, а также радиомитигаторные (терапевтические) свойства *in vivo*, снижая образование микроядер в полихроматофильных эритроцитах красного костного мозга мышей после облучения.

Антиоксидантные свойства ЛК исследованы *in vitro* путем ее влияния на образование  $H_2O_2$  в системе (4-йодфенол-люминол-пероксидаза) и ОН-радикалов (с использованием высокоспецифичного флуоресцентного зонда — кумарин-3-карбоновая кислоты) при радиолизе 1 мМ фосфатного буфера, рН 7,4 (ФБ) под действием рентгеновского излучения в дозе 10 Гр. ЛК снижает образование  $H_2O_2$  на 45% при концентрации 100 мкМ и на 50% при 500 мкМ. С увеличением концентрации ЛК от 500 мкМ до 10 мМ наблюдается насыще-

ние ее антиоксидантных свойств на уровне 20—25% от контроля. Помимо короткоживущих АФК, индуцируемых ионизирующим излучением, в клетках и в растворах белков образуются долгоживущие активные формы белков (ДАФБ) [2, 3]. Установлено, что ДАФБ альбуминов (БСА) и  $\gamma$ -глобулинов (БГГ) сыворотки крови при распаде вызывают продление окислительного стресса, длительно генерируя АФК [3, 4]. В данной работе исследовано влияние ЛК на процесс генерации  $H_2O_2$  ДАФБ на протяжении 6 ч после облучения БСА 10 мг/мл и БГГ 5 мг/мл. Облучение раствора БСА приводит к уменьшению концентрации пероксида водорода до величин, в 1,5 раза меньших, чем в контроле без белка, а ЛК в диапазоне от 5 мкМ и 500 мкМ не влияет на данный процесс.

В растворе БГГ ЛК влияет на образование  $H_2O_2$ , индуцированное облучением, существенно иначе, чем в растворе БСА. Уровень  $H_2O_2$  сразу после облучения превышает контрольные значения и составляет  $\sim 1,75$  мкМ [4]. ЛК в концентрации 5 мкМ не влияет на данный процесс, однако в концентрациях 50 мкМ и 500 мкМ к 6 ч после облучения уменьшает образование  $H_2O_2$  на 15 и 25% соответственно, что предполагает насыщение данного эффекта. Поскольку имеет место пропорциональное снижение  $H_2O_2$ , можно полагать, что влияние ЛК обусловлено конкурентным перехватом АФК в начальный период эксперимента.

Исследовано влияние ЛК на окислительные повреждения ДНК *in vitro* и *in vivo*. Для оценки генопротекторных свойств ЛК при облучении *in vitro* был использован иммуноферментный анализ для определения образования 8-ОГ — ключевого биомаркера окислительных повреждений ДНК [2]. ЛК в диапазоне концентраций 0,05—0,4 мМ при облучении раствора ДНК в дозе 10 Гр уменьшает образование 8-ОГ в ДНК на 67%. Это максимально эффективные концентрации ЛК в данной системе. В концентрации 0,005 мМ эффект ЛК отсутствует, а при повышении концентрации до 0,7—1 мМ наблюдается понижение эффективности до 50% от контрольных значений.

Микроядерный тест красного костного мозга позволяет проводить анализ повреждений ядерной ДНК *in vivo* после облучения животных. При внутрибрюшинном введении мышам на частоту образования ПХЭ с МЯ после облучения в дозе 1,5 Гр установлено, что ЛК в дозах 5 мг/кг и 40 мг/кг снижает частоту образования МЯ в ПХЭ костного мозга мышей на 70 и 75% соответственно. В дозе 100 мг/кг ЛК не оказывает статистически значимого влияния на частоту образования МЯ.

Таким образом, *in vitro* ЛК снижает образование 8-ОГ — ключевого биомаркера окислительных повреждений ДНК. Показаны генопротекторные

и радиомитигаторные свойства ЛК *in vivo*, позволяющие уменьшить количество поврежденных хромосом клеток красного костного мозга мышей после облучения. Однако данные эффекты сильно зависят от концентрации ЛК, которая в избыточном количестве оказывает слабое токсическое и радиосенсибилизирующее действие *in vivo*. Поэтому необходимы дальнейшие исследования этого феномена. В целом, полученные результаты свидетельствуют об эффективных радиомитигаторных и терапевтических свойствах ЛК, которые могут быть использованы в дальнейшем как для предотвращения пагубных последствий ионизирующего излучения при его медицинских воздействиях, так и при использовании их в военных конфликтах и террористических актах.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Усачева А.М., Черников А.В., Карманова Е.Е., Брусков В.И. // Хим.-фарм. ж. 2021. 55 (11). 9—17.
2. Штаркман И.Н., Гудков С.В., Черников А.В., Брусков В.И. // Биохимия. 2008. 73(4). 576—586.
3. Иванов В.Е., Черников А.В., Гудков С.В., Брусков В.И. // Биофизика. 2018. 63(5). 873—879.
4. Карманова Е.Е., Черников А.В., А.М. Усачева, Брусков В.И. // Хим.-фарм. ж. 2020. 54(7). 10—14.

### **РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО КЛАССА ТЕРАНОСТИКОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛОВ ДЛЯ РАДИОТЕРАПИИ ОПУХОЛИ**

*Колманович Д.Д.<sup>1</sup>, Иванов В.К.<sup>2</sup>, Попов А.Л.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия;

<sup>2</sup> Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова, Москва, Россия

*E-mail:* antonpopovleonid@gmail.com

Онкологические заболевания до сих пор являются причиной высокой смертности в мире. Наиболее эффективным методом лечения опухолей на сегодняшний день является лучевая терапия, которая используется в 70% случаев, как самостоятельно, так и в сочетании с другими видами терапии. Однако, существующие технологии лучевой терапии, основанные на использовании рентгеновского и гамма — излучения, имеют большое количество побочных эффектов. Новейшие технологии позволяют использовать потоки заряженных частиц (протоны, ионы и др.),



способных уничтожать раковые клетки с более высокой эффективностью, за прецизионности облучения. Один из способов повышения эффективности протонной терапии является использование радиосенсибилизаторов. В качестве таких радиосенсибилизаторов могут выступать наноконпозиты на основе оксидов редкоземельных металлов, например, гадолиния. Соединения гадолиния могут быть использованы не только для МРТ визуализации опухолей, но и для повышения чувствительности опухолевых новообразований к радиотерапии за счет более эффективного взаимодействия гадолиния с заряженными частицами и другими видами излучения, посредством высвобождения фотоэлектрических и оже-электронов, которые локализовано вносят вклад в пагубное воздействие излучения на опухолевые клетки [1]. В связи с этим нами была разработана схема синтеза гадолиний-содержащих наночастиц, обладающих одновременно цитотоксическим эффектом и способностью выступать в качестве МРТ контраста.

Гидротермально-волновым методом синтезированы наночастицы оксида церия, допированные гадолинием (20 мас. %) ультрамалого размера (4–6 нм), имеющие высокую степень кристалличности и время релаксации по T1 ( $3.6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Исследование цитотоксичности было проведено на культуре мезенхимальных стволовых клетках (МСК) человека и клетках рака аденокарциномы молочной железы линии MCF-7. Методом МТТ-теста и анализа соотношения живых/мертвых клеток (Live/Dead assay) показано селективное цитотоксическое действие наночастиц в отношении клеток линии MCF-7, что выражалось в увеличении уровня внутриклеточных АФК и количества апоптотических клеток через 24 часа культивирования в присутствии наночастиц [2]. Наночастицы не проявляли гено- и гематоксического действия, что позволяет сделать предварительные выводы о высокой степени их биосовместимости и возможности внутривенного введения. Редокс-активность и состав синтезированных наночастиц позволяет говорить о перспективности их использования в качестве тераностика в рамках радиотерапии опухолевых клеток протонными пучками.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-74-00086.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Verry C., Dufort S., Lemasson B., Grand S., Pietras J., Troprès I., Crémillieux Y., Lux F., Mériaux S., Larrat B., Balosso J., Le Duc G., Barbier E.L., Tillement O. Targeting brain metastases with ultrasmalltheranostic nanoparticles, a first-in-human trial from an MRI perspective // *Sci Adv.* 2020, Jul 15. 6(29):eaay5279.
2. Popov A., Abakumov M., Savintseva I., Ermakov A., Popova N., Ivanova O., Kolmanovich D., Baranchikov A., Ivanov V. Biocompatible dextran-coated gadolinium-doped cerium oxide nanoparticles as MRI contrast agents with high T1 relaxivity and selective cytotoxicity to cancer cells // *J. Mater. Chem. B.* 2021. 9. 6586—6599 (Q1, IF 6.33).

# САМОВОСПРОИЗВОДИЩИЕСЯ АВТОМАТЫ: ЖИЗНЬ, УНИВЕРСАЛЬНАЯ СИСТЕМА УТРАИВАЮЩИХСЯ ПЕРИОДОВ, ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

*Коломбет В.А., Лесных В.Н.*

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

Биосфера Земли возникла в результате работы самовоспроизводящегося автомата (т.н. автомата фон Неймана [1]), занятого удвоением генетического материала в форме молекулярных текстов. С момента Большого Взрыва (13.8 млрд. лет назад) до момента возможности появления этих текстов произошла серия взрывов сверхновых звезд, обогатившая протосолнечную межзвездную среду химическими элементами в количестве, достаточном для возникновения и эволюции молекулярных текстов. Так как жизнь на Земле возникла ~3.5 млрд. лет тому назад, на обогащение среды ушло практически 10 млрд. лет. Короткое время доминировала исходная форма автомата, но в результате ошибок при воспроизведении текстов возникли мутантные версии автомата. В условиях дефицита молекулярных ресурсов коэффициент размножения исходного автомата уменьшился с двойки до единицы, и стала возможной конкуренция различных версий автомата, т.е. возникла биологическая эволюция и, как следствие, современная биосфера.

В работах 2016—2021 гг. мы описали возможный след работы второго автомата фон Неймана [2, 3]. Он проявился в форме т.н. универсальной системы утраивающихся периодов (УСУП). Она протянулась от микроскопического (возможно, от планковского) масштаба времени до космологического. Мы предположили по аналогии, что как биологический автомат создал биосферу, так и автомат УСУП мог создать всю вселенную. У этого автомата коэффициент размножения оказался тройкой во всех исследованных масштабах времени. Конкуренции мутантных версий этого автомата с исходной версией не наблюдается, т.к. коэффициент размножения не уменьшается, а остается тройкой. Возможно, что тщательные измерения отклонения коэффициента размножения от тройки помогут оценить истинный размер такой постинфляционной вселенной. Для описания спектра наблюдаемых периодов  $T_{n,m}$  используется формула С. Петца:  $T_{n,m} = T_0 3^n / 2^m$ . Здесь  $T_0 = 114.6$  лет,  $n$  — номер поколения,  $m$  — эффективное число мутаций. Для действующего в аналогичном режиме биологического автомата (например, клеточной культуры) аналогом формулы Петца является формула для массы  $M_{n,m} = M_0 2^n / 2^m$ , где  $M_0$  — масса клетки, а  $m$  — разность между количеством вставочных (избыточных, дополнительных) по-

колений и количеством пропущенных поколений. В рекуррентном виде, связывающем соседние поколения, приведенные формулы выглядят как  $T_{n+1} = 3T_n$  и, до включения эволюции, как  $M_{n+1} = 2M_n$

Сейчас мы предположили, что третий тип автоматов фон Неймана могут представлять собой фундаментальные физические взаимодействия: гравитационное, слабое, сильное и электромагнитное. См. наши работы с 1981 по 1986 гг. [4—6]. Там мы нашли, что физическим полям можно поставить в соответствие рекуррентные формулы (см. Таблицу), связывающие массы субатомных частиц. Смысл этой рекуррентности оставался в то время в значительной степени неясным.

Перемещение проблемы рекуррентности в контекст автоматов фон Неймана вдруг создало возможность интерпретации. Например, оставалось неясным, почему в этих рекуррентных формулах именно неподвижные точки отвечают массам переносчиков соответствующих взаимодействий. С новой позиции становится ясным, что в этих точках работа самовоспроизводящегося автомата деградирует к единичному коэффициенту размножения, к точному самовоспроизведению, что, как видно из примера биологического автомата фон Неймана, отвечает возникновению эффективной конкуренции разных версий автомата, т.е. возникновению в чисто физическом явлении аналога биологической эволюции. (Кстати, из особенностей применения формул третьего типа можно заключить, что этот тип эволюции тесно опирается на существование массивных частиц холодной темной материи [8]). Вероятно, при каждом изменении обстоятельств, как и в биосфере, — например, при частичном вымирании популяции по второстепенным (случайным, сторонним) причинам, — коэффициент размножения переносчиков может сильно возрастать от единичного, компенсируя эти изменения, и затем возвращаться в устойчивое состояние, т.е. в режим точного самовоспроизведения.

Таблица

**Спектр найденных нами рекуррентных формул для фундаментальных взаимодействий, связывающих между собой массы субатомных частиц [7, 8]**

k	Отображение	Неподвижная точка		Спин
		Переносчик	Масса (Гэв/c <sup>2</sup> )	
-3	$Y_n = C^{3/k} / Y_{n+1}^{3*k}$	$\eta^0$ ?	0,55 0	0
-2		$Z^?$ ?	10000 0	1
-1		? g	$10^{33}$ 0	2
0	$Y_n = Y_{n+1}/K$	$\gamma \phi^0$ ?	0 1,02 20,5	1,1,1?
1	$Y_n = C^{3/k} / Y_{n+1}^{3*k}$	? ?	$10^{15}$	2
2		$W^\pm Z^0$	81	1
3		$\pi^\pm \pi^0$	0,137	0

Здесь  $C = 1,51 \times 10^{16}$ ,  $n$  — по-прежнему, номер поколения, а величины  $y = (m/m_e)^{2/3}$  позволяют вычислять массы  $m$  соответствующих субатомных частиц. Величины  $y^{-1}$  — это вероятности, близкие по физическому смыслу к знаменитой константе электромагнитного взаимодействия  $1/137$ . Целочисленный параметр  $k$  определяет фундаментальные взаимодействия:  $|k| = 0, 1, 2$  и  $3$  отвечают электромагнитным, гравитационным, слабым и сильным взаимодействиям. Параметр  $K$  — частная особенность электромагнитного взаимодействия [6—8].

Бесспорно, что биологический автомат фон Неймана создал биосферу, и мы уже предполагали, что автомат УСУП мог аналогичным образом создать всю вселенную. Теперь можно думать, что подобные автоматы, соответствующие физическим взаимодействиям, заполнили вселенную обычной материей [7, 8].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Von Neumann J. Theory of self-replication automata / A.W. Burks (ed.) — University of Illinois Press, 1966. Рус. перевод: Дж. фон Нейман. Теория самовоспроизводящихся автоматов. — М. : Мир, 1971. 382 с.*
2. *Коломбет В.А., Архипов В.Ю., Елистратов А.В., Лесных В.Н., Коломбет Е.В., Серая О.Ю. Стохастика и мутации в универсальной системе утраивающихся периодов // Известия Института инженерной физики. 2018. 2(48). 56—62.*
3. *Коломбет В.А., Лесных В.Н., Елистратов А.В. Трипликатор как механизм формирования универсальной системы утраивающихся периодов // Известия Института инженерной физики. 2020. (58). 5—10.*
4. *Коломбет В.А. О возможности представления масс элементарных частиц и атомных ядер единой системой целых чисел. / Препринт. — Пушкино : ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1981.*
5. *Коломбет В.А. Об аномальных значениях масс элементарных частиц. / Препринт. — Пушкино : ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1981.*
6. *Коломбет В.А. Попытка феноменологического синтеза спектра масс элементарных частиц и спектра безразмерных констант взаимодействий / № 2388-86 Деп. — Москва : ВИНТИ, 1986.*
7. *Коломбет В.А. Феноменология субатомных частиц и фундаментальных взаимодействий при взгляде из области низких энергий // Система «планета Земля»... — М. : ЛЕНАРД, 2020. С. 183—203. ISBN 978-5-9710-7407-6.*
8. *Коломбет В.А. Феноменологическая единая теория, указывающая на пару скрытых частиц, возможно являющихся частицами холодной темной материи // Система «планета Земля»... : 25 лет сборнику «Система „Планета Земля“». — М. : ЛЕНАНД, 2022.*

# АНТИГИПОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЦИТОКИНА ИНТЕРЛЕЙКИН-10 ОПОСРЕДОВАН МОДУЛЯЦИЕЙ TASK КАНАЛОВ

*Конаков М.В., Левин С.Г., Теплов И.Ю., Ненов М.Н.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Ранее нами было показано, что анти-воспалительный цитокин интерлейкин-10 (ИЛ-10) способен устранять индуцируемое кратковременными эпизодами гипоксии развитие пост гипоксической гипервозбудимости пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа. Так на фоне ИЛ-10 эффективность кратковременных эпизодов гипоксии устранять активность нейронов во время гипоксического эпизода достоверно снижалась. Нами было предположено, что одной из наиболее вероятных мишеней, через которые ИЛ-10 способен осуществлять свой модулирующий эффект на активность нейронов мозга могут фоновые двух-поровые (2P) калиевые каналы. Известно, что одно из подсемейств фоновых 2P калиевых каналов, чувствительный к внеклеточным значениям pH и гипоксии — TASK (TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> канал), широко представлены в гиппокампальных нейронах, особенно TASK-1 и TASK-3 подтипы и модулируют процессы воспаления и нейродегенерации в центральной нервной системе. В связи с этим, мы исследовали возможность вклада мембранных 2P калиевых каналов TASK-1 и TASK-3 подтипов в модулирующее действие ИЛ-10 на активность нейронов в первичной нейроглиальной культуре гиппокампа.

Для этого с помощью метода whole-cell patch clamp эффект гипоксии и ИЛ-10 был исследован в отношении фоновых токов утечки ( $I_{leak}$ ) и сопротивления мембраны ( $R_{in}$ ) регистрируемых от пирамидальных нейронов из первичной нейроглиальной культуры гиппокампа DIV 12-15. Протокол регистрации представлял собой прямоугольный импульсы продолжительностью 500 мс с шагом от -120 мВ до -60 мВ (инкремент 10 мВ) от поддерживаемого потенциала в -70 мВ. Фоновые токи регистрировались в конце каждого прямоугольного импульса (усреднение с отрезка 460—480 с) для того, чтобы исключить вклад гиперполяризацией-активируемых калиевых каналов (HCN), а также потенциал-зависимых натриевых и кальциевых каналов. Дополнительно в экспериментальный раствор вводились следующие блокаторы: ZD7288 (20 мкМ) — блокатор HCN каналов для исключения вклада гиперполяризацией-активируемых калиевых токов, NBQX (20 мкМ) и AP-5 (50 мкМ) — блокаторы AMPA и NMDA каналов — для исключения вклада возбуждающей глутаматергической передачи и бикокуллин (20 мкМ) — блокатор ГАМК каналов А типа — для исключения вклада тормоз-

ной ГАМКергической передачи в амплитуду регистрируемых фоновых токов утечки опосредуемых активностью TASK каналов. Фильтрация сигнала проводилась при частоте 2 кГц, оцифровка — при 10 кГц.

Вначале нами был исследован эффект кратковременного эпизода гипоксии  $I_{leak}$  и  $R_{in}$  в гиппокампальных нейронах. Было показано, что однократный 10-минутный эпизод гипоксии приводил к значительному подавлению  $I_{leak}$  и росту  $R_{in}$ . Далее нами было исследовано, способен ли ИЛ-10 предотвращать негативный эффект однократного эпизода гипоксии. Было установлено, что прединкубация с 10 нг/мл ИЛ-10 за 15 минут до гипоксического эпизода полностью подавляет угнетающее действие гипоксии в отношении  $I_{leak}$  и  $R_{in}$ . Чтобы проверить, связан ли антигипоксический эффект ИЛ-10 с модуляцией активности 2P TASK каналов нами были использованы селективные блокаторы TASK каналов 1 и 3 типов — ML 365 и РК-THPP, соответственно. Было показано, что совместное добавление 100 нМ ML 365 или 100 нМ РК-THPP с 10 нг/мл ИЛ-10 за 15 минут до гипоксического эпизода полностью отменяло протектирующее действие ИЛ-10 в отношении  $I_{leak}$  и  $R_{in}$ . Таким образом, нами было показано, что защитный эффект ИЛ-10 в отношении гипоксией ингибированного фонового тока утечки опосредован модуляцией активности TASK каналов 1 и 3 типов. Ранее было показано, что быстрые эффекты ИЛ-10 могут быть опосредованы активацией фосфоинозитид-3-киназы (PI3K). Что бы проверить вклад PI3K в регуляцию фоновых токов утечки ИЛ-10, мы использовали блокатор данной протеинкиназы — LY 294002. Было показано, что предварительная инкубация с 10 мкМ LY 294002 и 10 нг/мл ИЛ-10 за 15 минут до гипоксического эпизода полностью отменяет протектирующее действие ИЛ-10 в  $I_{leak}$  и  $R_{in}$ .

Таким образом, с использованием ингибиторного анализа с блокаторами TASK каналов 1 и 3 типов и ингибитором PI3K нами было показано, что антигипоксический эффект ИЛ-10 реализуется за счет усиления фоновых токов утечки через модуляцию активности TASK каналов 1 и 3 типа, что в свою очередь приводит к снижению мембранного сопротивления. Антигипоксический эффект ИЛ-10, связанный с модуляцией активности TASK каналов, может быть опосредован PI3K/Akt сигнальным каскадом. Исследование возможной роли мембранных 2P калиевых каналов TASK подтипа, и опосредуемого ими фонового тока утечки в модулирующем действии ИЛ-10 на активность нейронов, через модуляцию мембранного сопротивления позволит пролить свет на выяснение механизмов взаимодействия нейронов и медиаторов клеток иммунной системы в мозге. Понимание этих механизмов имеет важное значение для разработки терапевтических средств лечения нейродегенеративных и воспалительных процессов в центральной нервной системе.

## ЧАЙ ПРЕДОТВРАЩАЕТ ИНДУЦИРОВАННЫЙ РАДИАЦИЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В АОРТЕ КРЫС

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

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Сердечно сосудистые заболевания (ССЗ), главной причиной которых является атеросклероз, ответственны за 50% смертности в настоящее время. Накопилось большое количество данных, свидетельствующих о том, что флавоноиды снижают риск ССЗ. Около половины всех поступающих в организм флавоноидов человек потребляют с чаем [1]. Популяционные исследования показывают, что три чашки зелёного или чёрного чая в день достоверно снижают риск ССЗ [1]. Зелёный чай содержит около 30% катехинов от сухого веса листа и 75% из них это галлопроизводные эпикатехина (–)-эпигаллокатехин (ЭГК) и (–)-эпигаллокатехин галат (ЭГКГ) [2]. Чёрный чай получают ферментацией исходного сырья, при котором катехины трансформируются в теафлавины и теарубигины, поэтому в чёрном чае содержание катехинов более чем на порядок меньше, чем в зелёном чае.

Главным фактором инициации атеросклероза в сосудах является окислительный стресс, обусловленный увеличением активных форм кислорода (АФК) [3]. Существенный вклад в увеличение АФК даёт повышенная концентрация ангиотензина II, продукта ангиотензин превращающего фермента (АПФ) [4]. Ангиотензин II активирует NADPH оксидазу, что приводит к увеличению АФК, стимуляции пролиферации клеток, увеличению экспрессии на эндотелии сосудов молекул адгезии к моноцитам, инициации воспаления в сосудах и развитию атеросклероза [5]. Ранее нами было показано, что ионизирующая радиация вызывает увеличение активности АПФ и окислительный стресс в аорте крыс [6, 7]. Влияние чая на окислительный стресс в сосудах *in vivo* не изучалось. В настоящей работе исследовали влияние чёрного и зелёного чая на активность АПФ и образование АФК в аорте облучённых крыс.

Работа выполнена на крысах Вистар самцах весом 300—320 г (9—11 недель). Чай 1—4.5 г на 100 мл воды заваривали при 100 °С 5 мин. Чай вводили крысам двумя способами: 1 — 1 мл (1 г/100 мл) внутривентриально, 2 — 1 мл (0.03—4.5 г/100 мл) в рот. Для внутривентриального введения в чай перед введением добавляли 0.14 М NaCl для достижения физиологической осмолярности раствора. Крыс облучали дозой 2.5 Гр X лучами 200 кV на установке RUT-250-15-1 20 mA (Институт биофизики клетки РАН) при фильтрах, 1 мм Al, 1 мм Cu

при мощности дозы 1 Гр/мин. Крысы забивали через 2 ч после облучения. Активность АПФ в сегментах аорты определяли по гидролизу субстрата АПФ гиппурил-гистидил-лейцина, а образование АФК по окислению дихлордигидрофлуоресцеина.

Изучены динамики и дозовые зависимости эффектов зелёного и черного чая на активность АПФ и образование АФК в аорте облучённых крыс. Показано, что как зелёный, так и чёрный чай предотвращают увеличение активности АПФ и образование АФК в аорте при разных способах введения. Однако чёрный чай более эффективен. Полное устранение индуцированного радиацией увеличения активности АПФ и образования АФК, развивается быстрее: за 3 ч против 6 и в 12 раз меньшей дозе. Исследовано также влияние галлопроизводных катехина на активность АПФ и образование АФК в аорте. Показано, что ЭГК и ЭГКГ вызывают увеличение активности АПФ и образование АФК в аорте. Таким образом, меньшая эффективность зелёного чая объясняется тем, что в его составе содержится гораздо больше галлопроизводных катехина, которые сами вызывают окислительный стресс в аорте. Это приводит к уменьшению соотношения флавонолов, подавляющих окислительный стресс и галлопроизводных катехина его вызывающих в зелёном чае.

Человек потребляет чай, заваренный обычно 1 г/100 мл, порционно 2—3 раза в день около 230 мл (8 OZ) в порции. Приняв средний вес человека 70 кг, получим, что с одной порцией чая человек получает около 3.3 мл/кг чая. Крысы, использованные в наших опытах, весили в среднем 310 г, следовательно, при введении им 1 мл чая в рот они получали дозу 3.2 мл/кг, сопоставимую с количеством получаемым человеком при потреблении чашки чая.  $IC_{50}$  подавления активации АПФ для крыс равно 1 мл чая, заваренного 2.1 г/100 мл, что эквивалентно дозе 6.7 мл/кг чая заваренного 1 г/100 мл. Учитывая гораздо меньшую скорость метаболизма и выведения различных препаратов у человека по коэффициентам пересчёта (крыса весом 0.3 кг — 7.5 и человек весом 70 кг — 39 [8]) получим, что  $IC_{50}$  для человека равно:  $(6.7 \text{ мл/кг} \cdot 7.5) / 39 = 1.3 \text{ мл/кг}$  чая, заваренного 1 г/100 мл. Это значение почти в три раза меньше количества потребляемого с чашкой чая и даже превосходит дозу полностью подавляющую активацию АПФ облучением. Расчёт проведен для зелёного чая, а, поскольку, чёрный чай гораздо эффективнее, то чашки чёрного чая тем более достаточно для предотвращения окислительного стресса в аорте. Таким образом, одной чашки, как зелёного, так и чёрного чая достаточно для полного снятия эффекта облучения на аорту.

Практическим применением результатов работы может быть рекомендация использования чая для подавления окислительного стресса в сосудах перед радиотерапией опухолей или при стрессовых ситуациях.



## ЛИТЕРАТУРА

1. *Hodgson J.M., Croft K.D.* // *Mol. Aspects. Med.* 2010. 31. 495—502.
2. *Van het Hof K.H., Kivits G.A.A., Weststrate J.A. et al.* // *Eur. J. Clin. Nutr.* 1998. 52. 356—359.
3. *Grassi D., Desideri G., Ferri C.* // *Nutrients.* 2010. 2. 889—902.
4. *Dzau V.J.* // *Hypertension.* 2001. 37. 1047—1052.
5. *Heeneman S., Sluimer J.C., Daemen M.* // *Circ. Res.* 2007. 101. 441—454.
6. *Arutyunyan T.V., Korystova A.F., Kublik L.N. et al.* // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015. 160. 580—583.
7. *Korystova A.F., Kublik L.N., Levitman M.Kh. et al.* // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018. 165. 216—219.
8. *Freireich E.J., Gehan E.A., Rall D.P. et al.* // *Cancer Chemother Rep.* 1966. 50. 219—244.

## ИЗУЧЕНИЕ РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ВОДЫ, ЭКСПОНИРОВАННОЙ В ПИРАМИДЕ, НА МОДЕЛИ УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ

*Куликов А.В., Архипова Л.В.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия  
E-mail: 29.04.55@mail.ru

То, что с возрастом происходят необратимые изменения, связанные со значительной возрастной необратимой инволюцией тимуса, сегодня не вызывает сомнения [1—6]. То же происходит и при облучении. Известно, что сублетальное облучение является моделью ускоренного старения.

Исследования динамики возрастной инволюции тимуса и разработка способов влияния на этот процесс имеют важное общебиологическое значение и могут помочь в понимании межсистемных отношений в организме.

Планируя настоящий эксперимент, мы предполагали, что за счет радиопротекторных растворов, применяемых как питье животных, мы существенно замедляем инволюцию тимуса. А это, в свою очередь, может значимо увеличить продолжительность жизни животных даже при летальном их облучении.

Моделируя ускоренное старение организма с помощью облучения, мы добились значительного замедления этого процесса за счет применения радиопротекторной воды. Через 2,5 месяца живы по 28,5% мышей (по 4 из 14) из 2-х групп, облученных в летальной дозе 6 Гр. Последняя особь в контрольной группе, также облученной в дозе 6 Гр, умерла через 16 дней после облучения (при средней продолжительности жизни в этой группе 10 дней). В процессе

работы дважды в неделю измерялись объем потребления воды, пищи и масса тела во всех исследованных группах животных.

Анализ результатов позволил скорректировать схему эксперимента. Результатом второй серии экспериментов стало более чем двухразовое увеличение (62%) долговременной выживаемости животных после летального облучения в дозе 6 Гр и достоверное увеличение массы их тимуса. Все физиологические данные, полученные в работе, подтверждают радио- и геропротекторные свойства воды, экспонированной в пирамиде.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Смирнов В.С., Фрейдлин И.С.* Иммунодефицитные состояния. — СПб. : Фолиант. 2002. 568 с.
2. *Пальцев М.А., Кветной И.М.* Руководство по нейроиммуноэндокринологии. — М. : Медицина. 2008. 512 с.
3. *Федорова Е.С.* Возрастная динамика факторов микроокружения в тимусе человека // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — СПб. 2009. 21 с.
4. *Anisimov V.N., Birnbaum L.S., Butenko G.M., Cooper R.* Principles for Evaluating Chemical Effects on the Aged Population. Environmental Health Criteria 144. — Geneva : WHO. 1993. 159 p.
5. *Nance D.M., Sanders V.M.* Autonomic innervation and regulation of the immune system // Brain Behav Immun. 2007. 21(6). 736—745.
6. *Six E.M., Bonhomme D., Monteiro M. et al.* A human postnatal lymphoid progenitor capable of circulating and seeding the thymus // The Journal of Experimental Medicine. 2007. 204(13). 3085—3093.

### **КЛАССИФИКАЦИЯ ПАТТЕРНОВ ПАРОКСИЗМАЛЬНОГО ДЕПОЛЯРИЗАЦИОННОГО СДВИГА ПРИ ПОМОЩИ АЛГОРИТМОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ**

*Ларюшкин Д.П.<sup>1,2</sup>, Майоров С.А.<sup>1</sup>, Гайдин С.Г.<sup>1</sup>, Зинченко В.П.<sup>1</sup>, Косенков А.М.*

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

<sup>2</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

*E-mail:* mr.ldap@yandex.ru

Эпилепсия является одним из распространённых неврологических заболеваний [1]. Согласно современным представлениям, эпилептические приступы возникают при нарушении баланса торможения и возбуждения в мозге [2]. Клеточным коррелятом эпилептических разрядов, проявляющихся при регистрации ЭЭГ, является пароксизмальный деполяризационный сдвиг (ПДС) [3]. ПДС — это аномальная деполяризация клеточной мембраны нейронов, дости-

гающая –15 мВ и длящаяся от 40 до 400 мс, на фоне которой может возникнуть от одного до нескольких потенциалов действия (ПД). Несмотря на то, что феномен ПДС был открыт ещё в 60-ых годах прошлого века, до сих пор нет ясного представления как о механизмах возникновения, так и роли ПДС в эпилепсии [4]. В настоящем исследовании мы показали, что ПДС в различных нейронах существенно отличаются по многим параметрам, включая скорость, амплитуду и частоту, и попытались классифицировать различные виды ПДС на основании этих параметров, используя алгоритмы/принципы машинного обучения.

Объектом исследования служила нейроглиальная культура гиппокампа крысы, в которой ПДС индуцировали ослаблением ГАМК(А)-зависимого торможения. При помощи метода patch-clamp были собраны данные о 30 различных параметрах в 150 нейронах с индуцированными ПДС. Параметры включали такие показатели, как: потенциал покоя нейрона, паттерны нейронной активности на вызванную стимуляцию инъекцией тока, частотно-амплитудные характеристики ПДС и т.д. Далее нами был проведён анализ выбранных параметров в среде разработки R-Studio с использованием пакетов (Randomforest, PCA).

В результате проведенного анализа удалось выявить, что весь набор данных по паттернам нейрональной активности на вызванную стимуляцию инъекцией тока можно разделить на три семейства:

ПДС с высокой частотой ПД на плато, 2) с одним ПД без плато, и 3) одним ПД с плато.

Помимо этого, установлены параметры, наиболее характерные для этих семейств паттернов нейрональной активности: частотные характеристики при вызванной нейронной стимуляции и наличие пост-гиперполяризации. В итоге на основании этих параметров, используя алгоритм «Случайный лес» мы построили прогностические правила для предсказания паттернов нейрональной активности во время ПДС исходя лишь из данных нейростимуляции. Полученные нами результаты в дальнейшем могут быть использованы для понимания фундаментальных механизмов ПДС и эпилепсии в целом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Ngugi A.K., Bottomley C., Kleinschmidt I., Sander J.W., Newton C.R.* Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: A meta-analytic approach // *Epilepsia*. 2010. 51:883—890. doi: 10.1111/j.1528—1167.2009.02481.x.
2. *Shao L.-R., Habela C.W., Stafstrom C.E.* Pediatric Epilepsy Mechanisms: Expanding the Paradigm of Excitation/Inhibition Imbalance // *Children*. 2019. 6:23. doi: 10.3390/children6020023.

3. *Stiglbauer V., Hotka M., Ruitz M., Hilber K., Boehm S., Kubista H.* Ca<sub>v</sub>1.3 channels play a crucial role in the formation of paroxysmal depolarization shifts in cultured hippocampal neurons // *Epilepsia*. 2017. 58:858—871. doi: 10.1111/epi.13719.
4. *Matsumoto H., Marsan C.A.* Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: Interictal manifestations // *Exp. Neurol.* 1964. 9:286—304. doi: 10.1016/0014-4886(64)90025-1.

## **МАКРОФАГОПОДОБНЫЕ КЛЕТКИ ТНР-1, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ, УСТОЙЧИВЫ К TRAIL-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИБЕЛИ ЗА СЧЕТ ПОДАВЛЕНИЯ DR4 И DR5**

*Ломовская Я.В., Кобякова М.И., Ломовский А.И., Фадеев Р.С.*

Институт теоретический и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия  
*E-mail:* yannlomovskaya@gmail.com

Цитокин TRAIL — один из ключевых эффекторов противоопухолевого иммунитета, а повышение устойчивости лейкозных клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу является важным механизмом, необходимым для преодоления противоопухолевого контроля иммунной системы. Приобретение устойчивости лейкозных клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу может быть опосредовано как подавлением внутриклеточных TRAIL-зависимых проапоптотических сигнальных путей, так и нарушением экспрессии TRAIL-рецепторов на клеточной поверхности, включая потерю рецепторов DR4 и DR5, либо увеличение количества рецепторов DcR1 и DcR2 [1]. Модуляция чувствительности клеток к TRAIL также играет важную роль в регуляции гемопоеза. Индукция гранулоцитарной дифференцировки в клетках промиелоцитарного лейкоза HL-60 диметилсульфоксидом (ДМСО) может сопровождаться повышением их TRAIL-резистентности [2]. По-видимому, появление признаков дифференцировки лейкемических клеток, индуцированных экзогенными стимулами, согласуется с формированием у них устойчивости к TRAIL-опосредованному апоптозу [3]. Линия клеток лейкемии человека ТНР-1 является хорошо известной клеточной моделью *in vitro* для иммуномодулирующего подхода. Клетки ТНР-1 могут быть дифференцированы *in vitro* в макрофагоподобный фенотип с использованием РМА или других стимулов. В то же время сообщалось о спонтанном появлении макрофагоподобных клеток в популяциях ТНР-1 без действия каких-либо экзогенных индукторов [4]. Однако данные о TRAIL-резистентности этих дифференцированных клеток ТНР-1 отсутствуют.

В данной работе мы обнаружили повышение устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели лейкозных клеток человека THP-1, что было обусловлено спонтанной дифференцировкой в макрофагоподобный фенотип в высокоплотной культуре *in vitro*. Стрессовые условия, проявляющиеся ингибированием роста клеток и активацией клеточной гибели в высокоплотной культуре клеток THP-1, индуцировали появление клеток, прилипших к культуральным чашкам. Линия клеток THP-1ad была получена путем отбора этих прикрепленных клеток. Генетическое исследование с использованием анализов STR и aCGH показало, что клетки THP-1ad произошли от клеток THP-1 в результате мутагенеза. Клетки THP-1ad обладали высоким пролиферативным потенциалом и макрофагоподобным иммунофенотипом. Было показано, что адгезия клеток THP-1ad к внеклеточному матриксу опосредуется интегрином  $\alpha V\beta 5$ . Продукция цитокинов, а также повышение активности внутриклеточных АФК и NO под действием ЛПС в культуре клеток THP-1ad были характерны для макрофагоподобных клеток. Было обнаружено, что клетки THP-1ad обладают повышенной устойчивостью к TRAIL-индуцированной гибели по сравнению с клетками THP-1. Механизм повышения TRAIL-резистентности возможно связан со снижением экспрессии рецепторов смерти DR4 и DR5 на клетках THP-1ad. Таким образом, формирование макрофагоподобного фенотипа при сохранении высокого пролиферативного потенциала лейкозных клеток, вызванное стрессовыми условиями в культурах клеток высокой плотности *in vitro*, может индуцировать повышение устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели клеток за счет потери рецепторов DR4 и DR5.

Полученные в настоящей работе результаты о ключевой роли TRAIL-рецепторов в чувствительности клеток острого миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированной гибели клеток согласуются с литературными данными. Например, известно, что в лейкоэмических клетках TRAIL-индуцированная гибель клеток запускается через DR4 [5, 6]. Также известно, что в отличие от DR4, который участвует только в инициации апоптоза, рецептор DR5 может участвовать в активации выживания, пролиферации и миграции опухолевых клеток путем воздействия на внутриклеточные сигнальные пути с участием NF- $\kappa$ B, PI3K/Akt, MAPK и JNK [7]. Наши результаты указывают на ключевую роль DR4 и DR5 в снижении чувствительности лейкоэмических клеток человека THP-1ad к TRAIL-индуцированной гибели клеток.

В совокупности наши результаты свидетельствуют о том, что снижение цитотоксического действия TRAIL на клетки THP-1ad по сравнению с клет-

ками ТНР-1 определяется уменьшением субпопуляции клеток, несущих рецепторы DR4 и DR5, без снижения экспрессии этих рецепторов на клетках, сохраняющих эти рецепторы. Формирование макрофагоподобного фенотипа при сохранении высокого пролиферативного потенциала лейкозных клеток, вызванного стрессовыми условиями в культурах клеток высокой плотности *in vitro*, может индуцировать повышение устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели клеток за счет потери проапоптотического TRAIL рецепторы. Возможная реализация этих событий *in vivo* может быть причиной опухолевой прогрессии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №20-34-90061.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Chamuleau M.E., Ossenkoppele G.J., van Rhenen A., van Dreunen L., Jirka S.M., Zev- enbergen A., Schuurhuis G.J., van de Loosdrecht A.A. High TRAIL-R3 expression on leukemic blasts is associated with poor outcome and induces apoptosis-resistance which can be overcome by targeting TRAIL-R2 // *Leuk Res.* 2011. 35. 741—749. doi:10.1016/j.leukres.2010.12.032.
2. Shiiki K., Yoshikawa H., Kinoshita H., Takeda M., Ueno A., Nakajima Y., Tasaka K. Potential mechanisms of resistance to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells during granulocytic differentiation // *Cell Death Differ.* 2000. 7. 939—946. doi:10.1038/sj.cdd.4400727.
3. Evstratova Y.V., Kobayakova M.I., Novikova V.V., Senotov A.S., Akatov V.S., Fadeev R.S. Monocyte-Macrophage Differentiation Suppresses the Expression of Proapoptotic Receptors to Apo2L/TRAIL and Increases Resistance to TRAIL-Induced Apoptosis // *Biophysics.* 2019. 64. 729—731. doi:10.1134/s0006350919050038.
4. Bhattacharya A., Agarwal M., Mukherjee R., Sen P., Sinha D.K. 3D micro-environment regulates NF-kappabeta dependent adhesion to induce monocyte differentiation // *Cell Death Dis.* 2018. 9. 914. doi:10.1038/s41419-018-0993-z.
5. Van der Sloot A.M., Tur V., Szegezdi E., Mullally M.M., Cool R.H., Samali A., Serrano L., Quax W.J. Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the DR5 receptor // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006. 103. 8634—8639. doi:10.1073/pnas.0510187103.
6. Tur V., van der Sloot A.M., Reis C.R., Szegezdi E., Cool R.H., Samali A., Serrano L., Quax W.J. DR4-selective tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) variants obtained by structure-based design // *J Biol Chem.* 2008. 283. 20560—20568. doi:10.1074/jbc.M800457200.
7. Shlyakhtina Y., Pavet V., Gronemeyer H. Dual role of DR5 in death and survival signaling leads to TRAIL resistance in cancer cells // *Cell Death Dis.* 2017. 8. e3025. doi:10.1038/cddis.2017.423.

## СУКЦИНАТ — ВРАГ И ДРУГ

*Маевский Е.И., Кожурин М.В., Запартрина Е.Н., Гришина Е.В., Богданова Л.А.,  
Leonard P.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Сукцинат — энергетически наиболее эффективный субстрат Цикла Кребса в условиях нормоксии и гипоксии, но при анаэробнозе является конечным продуктом Цикла, подобно лактату в анаэробном гликолизе. Торможение сукцинатдегидрогеназы (SDH) вследствие генетического дефекта или действия конкурентных ингибиторов приводит к накоплению сукцината и выходит из митохондрий (MX) и далее из клеток. В концентрации  $10^{-4}$  М сукцината тормозит протеолиз цитозольного гипоксии-индуцируемого фактора HIF1 $\alpha$ , обеспечивая экспрессию более 60 генов, формирующих противогипоксический ответ. Подобным образом «адаптируются» к гипоксии» такие новообразования, как феохромоцитомы, параганглиомы, интерстициальный рак желудка и почек, имеющие мутацию по субъединице SDH $\beta$  (частота 4/1000000). Вне клеток сукцинат является лигандом сукцинатного рецептора SUCNR1. Этот рецептор инициирует прирост внутри клеток концентрации ионов кальция  $[Ca^{2+}]_{in}$  [2]. В результате аутокринно, паракринно и эндокринно сукцинат влияет на функциональную активность многих клеток: эндотелия артерий, нейронов и глии, кардиомиоцитов, почек, печени, кишечника, макрофагов и др. В зависимости от величины и длительности прироста  $[Ca^{2+}]_{in}$  реализуется короткое регуляторное действие от гипертензивного до модуляции иммунитета, либо провоцируются повреждение, воспаление и даже патологическая трансформация клеток.

До настоящего времени нет ясности в вопросе, почему столь двуликий сигнальный субстрат применяют как фармсредство? Суть вопроса в феноменологических противоречиях. Экспериментальная литература последних лет свидетельствует об адаптивной и о негативной роли сукцината в инициации гипертензии и воспаления, повреждении клеток при реперфузии, развитии гепатита, воспаления кишечника, в частности, при ожирении, сахарном диабете, активном онкогенезе, особенно в случае дефектов SDH $\beta$ . С другой стороны десятилетия экспериментального и клинического опыта свидетельствуют о значимом позитивном действии сукцинат-содержащих композиций (ССК) — основы ряда лекарственных средств и пищевых добавок [3, 4, 5, 6], повышающих устойчивость к стрессу и гипоксии (например, современные кардиореставрационные препараты мексидол, реамбирин и т.п.), о благотворном действии при заболеваниях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), недоразвитии

новорожденных, гриппозной и иной вирусной и бактериальной инфекции, врожденных нарушениях ЦНС, высокой утомляемости и т.п.

Очевидно, сигнальное действие сукцината неоднозначно. Так, в макрофагах при повреждении SDH $\beta$  накопление сукцината сопровождается приостановлением синтеза IL-1 $\beta$  — провоспалительного цитокина, а при конкурентном торможении SDH $\alpha$  наблюдается образование противовоспалительного цитокина IL-10 [7, 8]. Клетки tuft обонятельного эпителия и кишечника под влиянием сукцината индуцируют синтез IL-25 и далее запускают иммунный ответ T2 типа [9]. При интенсивной физической работе на фоне ацидоза сукцинат выходит из мышечных клеток и активирует SUCNR1 соседних не мышечных клеток, поддерживающих рост и адаптацию мышц [10].

Ответ на вопрос: враг или друг сукцинат, заключен, по-видимому, в различиях между фармакокинетикой эндогенного (ЭндС) и экзогенного (ЭкзС) сукцината.

ЭндС движется по концентрационному градиенту из МХ и последовательно задействует HIF, а далее SUCNR1. ЭкзС включает эти же системы, но в обратной последовательности: SUCNR1—HIF—МХ. Путь ЭкзС до SUCNR1 и HIF1 намного длиннее, чем у ЭндС. Так, при приеме ССК внутрь ЭкзС контактирует с микрофлорой и тканями ЖКТ, эндотелием брюшных вен, портальной вены печени, клетками паренхимы печени и лишь затем через печеночную вену поступает в нижнюю полую вену. Из нее через правое сердце попадает в легкие, далее в левое сердце, аорту, общий кровоток и, наконец, в межклеточное пространство других тканей. На этом длинном пути концентрация сукцината снижается более чем на 2 порядка вследствие активной утилизации и разведения. И, наконец, главное различие. Метаболические расстройства повышают концентрацию ЭндС в крови в среднем в 5—20 раз сверх физиологического микромолярного уровня и на длительное время: часы—дни—месяцы—годы. ССК не могут столь значимо и долго влиять на концентрацию сукцината ни после внутривенного введения (подъем длится менее 10 мин), ни после поступления через ЖКТ (малое приращение меченого углерода в крови, но не уровня сукцината, наблюдается 30—60 мин). Причем после внутривенного введения большая часть ЭкзС и меченого углерода из ЭкзС обнаружена в почках, в 4 раза меньше — в печени и еще в 3 раза меньше — в других тканях, при интенсивном включении метки в другие метаболиты [11]. После поступления ССК через ЖКТ наибольшая уровень метки найден в печени, в крови меньше в 2 раза, в почках в 6 раз и более 70% метки выявляется в выдыхаемом CO<sub>2</sub> [12].

Итак, ССК кратковременно в физиологическом диапазоне концентраций повышают уровень сукцината. Вероятно, поэтому даже после 2—3 недельного



курса ССК не обнаружено ни у животных, ни у людей гипертензивной реакцией или нарушения функций печени. Напротив, наблюдается уменьшение гипертензии при нагрузке и активация детоксицирующей функции печени при алкогольном отравлении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Gregg L. Semenza* // <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2019/semenza/facts/>.
2. *He W., Miao F.J., Lin D.C. et al.* // *Nature*, 2004, Vol. 429, pp. 188—193.
3. Терапевтическое действие янтарной кислоты. — Сб. статей / под ред. Кондрашовой М.Н. — Пущино : НЦБИ РАН. 1976. 234 с.
4. Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве. — Сб статей. — Пущино : НЦБИ РАН. 1997. 300 с.
4. *Саратиков А.С., Хазанов В.А., Кондрашова М.Н. и др.* Лекарственное средство для лечения ишемии мозга. — Патент РФ №2108095. 10.04.1998.
6. *Смирнов А.В., Нестерова О.Б., Голубев Р.В.* // *Нефрология*. 2014. 4. 10—24.
7. *Mills E.L., Kelly B., Logan A. et al.* // *Cell*. 2016. 167. 457—470.
8. *Ryan D.G., O'Neill A.J.* // *FEBS Letters*. 2017. 591. 2992—3006.
9. *Ting H.-A., von Moltke J.* // *J Immunol*. 2019. 202, 5. 1321—1329.
10. *Chaitanya S.R.* 2021. <https://massivesci.com/notes/muscle-cell-signaling-exercise-succinate/>
11. *Nyhan W.L. & Busch H.* // *Cancer Research*. 1958. 18. 1203—1208.
12. *Маевский Е.И., Розенфельд А.С., Гришина Е.В., Кондрашова М.Н.* Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий. — Пущино : НЦБИ РАН. 2001. 155 с.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СООТНОШЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЯДЕРНОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК СЫВОРОТКИ И ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ РАЗНОГО ПОЛА И ВОЗРАСТА

*Митрошина И.Ю.<sup>1</sup>, Сирота Н.П.<sup>1</sup>, Прокофьев В.Н.<sup>2</sup>, Кузнецова Е.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

<sup>2</sup> Академия биологии и биотехнологии имени Д.И. Иванковский, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

*E-mail:* xf2@rambler.ru

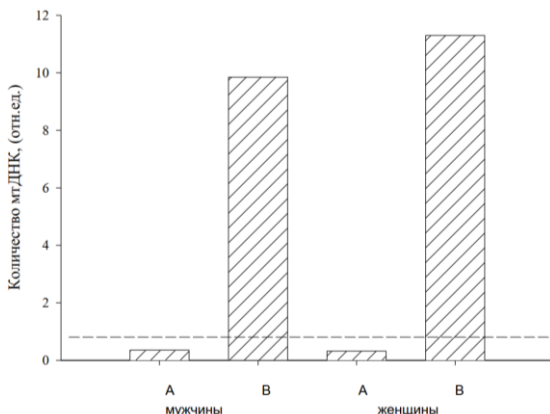
С увеличением продолжительности жизни число пожилых людей во всем мире неуклонно растет. Возраст является основным фактором риска для многих заболеваний — сердечно-сосудистых, инфекционных, онкологических, которые остаются серьезной проблемой здравоохранения. Поиск чувствительных и мало-

инвазивных биомаркеров, позволяющих выявить патологические состояния организма, актуален. Внеклеточная ДНК (вкДНК) — фрагменты ядерного (ядДНК) и митохондриального (мтДНК) геномов — имеет большой потенциал в качестве информативной тест-системы. Однако попытки ее разработки сталкиваются с проблемой индивидуальной вариабельности. Известно, что вкДНК может присутствовать в биологических жидкостях (кровь, моча, слюна) как пациентов с различными заболеваниями, так и у здоровых людей. Что касается состава выборки, то в большинстве случаев результаты определения уровня вкДНК были полученные в смешанных группах мужчин и женщин [1—5].

Задача настоящей работы: выявить, как соотносится уровень суммарной вкДНК (ядерной и митохондриальной) и мтДНК сыворотки крови с возрастом и полом здоровых доноров, и оценить уровни повреждений ДНК у пожилых доноров с хроническими заболеваниями вне периода обострения. В работе были использованы аликвоты венозной крови условно здоровых доноров (доноры, не имеющие на момент забора крови инфекционных или обострения хронических заболеваний) разного пола и возраста, проходивших плановое обследование. Первую группу ( $n = 30$ ) составили мужчины и женщины со средним возрастом 65 лет (48—78 лет). Вторая группа ( $n = 20$ ) состояла из доноров со средним возрастом 26 лет (20—30 лет). ВкДНК крови использовали в качестве матрицы при постановке ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе 7300 RealTime PCR System (Applied Biosystem, США) в Центре коллективного пользования ИТЭБ РАН.  $\Delta Ct$  рассчитывали по формуле  $\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{ref}$ , где  $Ct_{target}$  — значения  $Ct$ , полученные в ходе ПЦР-РВ для митохондриального гена ND1,  $Ct_{ref}$  — значения  $Ct$ , полученные в ходе ПЦР-РВ для ядерного гена  $\beta$ -actin. Значения относительного количества мтДНК в исследуемых группах выражались в процентах относительно такового в группе молодых доноров мужчин, взятого за 100%. Для определения уровня повреждений ДНК лейкоцитов крови использовали щелочную версию «комета-теста», использовали параметр — долю ДНК в хвосте кометы в процентах (per cent of DNA in a comet tail — %TDNA). Обнаружили, что концентрации суммарной вкДНК в целом выше у мужчин по сравнению с женщинами, что согласуется с литературными данными. Обнаружено, что у доноров одного и того же пола концентрации вкДНК достоверно различались по  $U$ -критерию Манна—Уитни ( $p \leq 0.05$ ) в зависимости от возраста: у молодых женщин ниже ( $0.1 \pm 0.1$ ), чем у пожилых ( $0.4 \pm 0.3$ ), у молодых мужчин выше ( $1.3 \pm 0.3$ ), чем у пожилых ( $0.6 \pm 0.4$ ). Обнаружены достоверные гендерные отличия в концентрации вкДНК для групп молодых доноров и отсутствие таковых в группах пожилых доноров. Отсутствие гендерных различий у пожилых доноров, возможно, связано с изменением клеточного метаболизма в пожилом

возрасте. Было показано, что%TDNA не было ассоциировано с наличием хронических заболеваний или проф. вредности, по-видимому, вследствие успешно применяемой терапии.

Количество копий мтДНК в группе молодых женщин превышает таковое в мужской группе. Достоверных гендерных отличий в группах пожилых доноров выявлено не было. Однако было обнаружено очевидное разделение, как мужчин, так и женщин, на две подгруппы по значению  $\Delta Ct$  со средними значениями 5 и 10 (подгруппы А и Б, соответственно). При расчете относительного количества мтДНК по методу  $\Delta\Delta C$  эти различия сохранялись (см. рисунок).



**Рис.** Относительное содержание мтДНК в сыворотке крови пожилых доноров подгруппы А ( $\Delta Ct = 4,8 - 5,0$ ) и подгруппы Б ( $\Delta Ct = 9,8 - 10$ ). Горизонтальная линия: относительное содержание мтДНК в группе молодых мужчин

Возможно, что обнаруженное нами разделение пожилых доноров по уровням мтДНК ассоциировано с изменениями соотношений лейкоцитов и тромбоцитов в крови, а также и с различным уровнем повреждений ДНК лейкоцитов.

Поскольку с увеличением возраста доноров в целом наблюдали уменьшение уровня мтДНК, то возможно также, что тенденция к понижению уровня вкДНК в крови связана и с уменьшением базового уровня повреждений ДНК лейкоцитов крови с возрастом, что было показано нами ранее [6].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Sozzi G., Conte D., Mariani L. et al.* // Cancer Res. 61 (12), 4675 (2001).
2. *Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Rykova E.Yu. et al.* // Clin. Chem. 2005. 51(7). 1317. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.045062>
3. *Zhong X.Y., Hahn S., Kiefer V., Holzgreve W.* // Ann. Hematol. 2007. 86(2). 139. <https://doi.org/10.1007/s00277-006-0182-5>

4. Czeiger G. Shaked, Eini H. et al. // Amer. Soc Clin. Pathol. 2011. 135(2). 264. <https://doi.org/10.1309/AJCP4RK2IHVKTTZV>
5. Jylhava J., Kotipelto T., Raitala A. et al. // Mech Ageing Dev. 2011. 132(1—2). 20. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.11.001>
6. Sirota N.P. and Kuznetsova E.A. // Bull. Exp. Biol. Med. 2008. 145(2). 194.

## **УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИИ ГЛАЗОДВИГАТЕЛЬНЫХ ЯДЕР МОЗГА МЫШЕЙ ПОСЛЕ 30-СУТОЧНОГО КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА И НЕДЕЛЬНОЙ РЕАДАПТАЦИИ К УСЛОВИЯМ ЗЕМНОЙ ГРАВИТАЦИИ**

*Мухеева И.Б.<sup>1</sup>, Жуйкова Н.С.<sup>2</sup>, Павлик Л.Л.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

<sup>2</sup> Пущинский Государственный Естественно Научный Институт, Пущино, Россия

*E-mail:* mikheirina@yandex.ru

В условиях космического полета (КП) живой организм сталкивается с экстремальными изменениями внешней среды, которые выходят за пределы адаптационных механизмов, выработанных в ходе эволюции. Это приводит к развитию разнообразных патологических состояний, клиническое проявление которых становится особенно выражено при реадaptации к земным условиям. Одним из таких патологических состояний является космический адаптационный синдром и космическая болезнь движения [Корнилова Л.Н., Козловская И.Б., 2003]. К проявлениям космической болезни движения относятся нарушения глазодвигательных реакций, в том числе спонтанный нистагм (особенно вертикальный), повышение глазодвигательной активности саккадического и плавного характера, торможение следящей функции глаз и появление при плавном слежении дополнительных саккадических движений с переходом в нистагмоподобные реакции, снижение порогов оптокинетического нистагма, уменьшение при закрытых глазах скорости и амплитуды компенсаторного движения глазных яблок и появление нистагмоподобных реакций. При открытых глазах у человека (без фиксации взора) выражена дестабилизация движения глазных яблок [Корнилова Л.Н. и др., 2017]. Известно, что перемещение глазного яблока в вертикальном направлении осуществляется мышцами, которые иннервируются мотонейронами ядер блокового (IV) (*nervus trochlearis*) и глазодвигательного (III) (*nervus oculomotorius*) нервов [Büttner-Ennever J.A., 2006]. На этом основании можно предположить,

что важная роль в патогенезе атипичного нистагма принадлежит изменениям, происходящим в мотонейронах, иннервирующих мышцы глаза.

Понять механизмы патогенеза в мотонейронах при действии факторов КП помогают биомедицинские исследования на животных, проводимые на биоспутниках (проект «Бион-М1»).

Ранее мы показали, что КП значительно повлиял на геометрию и ориентацию дендритов мотонейронов блокового (4) ядра, что, по-видимому, является важным адаптивным изменением нейронов, которые в условиях пониженной вестибулярной афферентации стремятся усилить приток сенсорной информации за счет реорганизации дендритов [Mikheeva I.B. et al., 2021]. При этом продолжительность этих изменений и характер адаптации к естественной гравитации на Земле остаются малоизученными.

**Цель настоящего исследования** состояла в изучении реакции структуры мотонейронов и нейропиля глазодвигательных (3) и блоковых (4) ядер мозга мышей в условиях 7-сут. реадaptации к земной гравитации после 30-суточного КП.

**Методы.** Исследование проводили на самцах мышей линии C57/BL6N, полученных из питомника «Пушино» филиала Института биоорганической химии РАН. Животных делили на группы: «Полет» (П) — животные после 30-ти суток полета на биоспутнике ( $n = 5$ ), «Контроль к полету» ( $n = 4$ ), «Реадаптация после полета» ( $n = 5$ ), 7 дней пребывания на земле после полета, «Контроль к реадaptации после полета» ( $n = 4$ ). При статистической обработке результатов данные групп «Контроль к полету» и «Контроль к реадaptации после полета» были объединены в группу «Контроль». Животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации согласно Правилам, рекомендованным физиологической секцией Российского Комитета по биоэтике при Комиссии РФ по делам ЮНЕСКО в соответствии с «Биоэтическими правилами проведения исследований на человеке и животных» (Приложение 16) [Andreev-Andreevsky A. et al., 2014]. Эксперименты на животных проводили на основании решения Комиссии по биомедицинской этике ГНЦ РФ — ИМБП РАН (протокол № 319 от 04.04.2013), одобряющего исследования по проекту «Бион-М1». Головной мозг извлекали и на холодной подложке (тающий лед) выделяли нужный фрагмент мозга, содержащий глазодвигательные и блоковые ядра. Фиксацию фрагментов мозга, подготовку ультратонких срезов, их окрашивание и анализ проводили по протоколу, описанному ранее [Mikheeva I.B. et al., 2018].

**Результаты.** При проведении морфометрического анализа мы обнаружили, что реадaptация по-разному повлияла на структуру измененных после

КП параметров изучаемых ядер. В структурах блокового ядра КП, а также последующая реадаптация к условиям земной гравитации не оказали существенного влияния на такие параметры мотонейронов как: периметр сомы, ядра и ядрышка, размеры цистерн ретикулума и периметр митохондрий. Они не отличались от контроля как в группе полета, так и в группе реадаптации. Однако изменилась форма ядра и ядрышка: ядра нейронов в 4 ядре в группе «Полет» стали более упрощенной округлой формы по сравнению со складчатой в контроле. В группе «Рееадаптация» число клеточных ядер с более складчатой формой мембраны уже приближалось к контрольному уровню. Рееадаптация также привела к восстановлению числа митохондрий и числа аксо-дендритных синапсов до уровня контрольных значений.

Не так однозначно и однонаправленно менялась структура глазодвигательного ядра. Также как и в блоковом ядре, периметр ядра и ядрышка оставались неизменными как после КП, так и после реадаптации. В блоковом ядре реадаптация привела к восстановлению числа митохондрий. Однако число синапсов и размеры цистерн ретикулума остались ниже чем в контроле. Увеличенный после полета периметр митохондрий не изменился в последующие 7 дней реадаптации, оставаясь на том же уровне, и не восстановился до уровня контрольных значений.

Полученные результаты указывают на разную скорость нормализации параметров разных структур нейронов в процессе реадаптации к земным условиям гравитации, и что некоторые морфологические нарушения за этот срок не восстанавливаются. Очевидно, что для полного восстановления структурных изменений, возникших в условиях космического полета недостаточно 7-дневного реадаптационного периода, а требуется более продолжительное время.

Работа выполнялась в рамках государственного задания ИТЭБ РАН.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Andreev-Andreevsky A. et al.* // PLoS One. 2014. 18. 9(8):e104830.
2. *Корнилова Л.Н., Козловская И.Б.* // Human Physiology. 2003. 29. 5. 527.
3. *Корнилова Л.Н. и др.* // Физиология человека. 2017. 43. 80—93.
4. *Büttner-Ennever J.A.* // Prog. Brain Res. 2006. 151. 95—125.
5. *Mikheeva I.B. et al.* // Bull Exp Biol Med. 2018. 165(4):457—460.
6. *Mikheeva I.B. et al.* // Brain Res. 2021. 1758. 147331.

## **БЕЛКИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-АТФ-СИНТАЗОЙ, МОГУТ УЧАСТВОВАТЬ В ФОРМИРОВАНИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ Ca<sup>2+</sup>-ЗАВИСИМОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ (РТР)**

*Никифорова А.Б.<sup>1</sup>, Бабурина Ю.Л.<sup>1</sup>, Борисова М.П.<sup>1</sup>, Сурин А.К.<sup>2</sup>,  
Харечкина Е.С.<sup>1</sup>, Крестинина О.В.<sup>1</sup>, Суворина М.Ю.<sup>2</sup>, Круглова С.А.<sup>1</sup>,  
Круглов А.Г.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

<sup>2</sup> Институт белка РАН, Пущино, Россия.

*E-mail:* krugalex@rambler.ru

Открытие РТР в митохондриях инициирует гибель многих типов клеток. В последние годы появляется все больше доказательств того, что мономеры, димеры и отдельные субъединицы F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-АТФ-синтазы участвуют в формировании Ca<sup>2+</sup>-зависимой митохондриальной поры (РТР) [1—6]. Однако данные слишком противоречивы, чтобы однозначно определить молекулярную структуру РТР [5—11]. Мы предположили, что собранный комплекс РТР включает как субъединицы АТФ-синтазы, так и другие митохондриальные белки, которые слабо взаимодействуют или не взаимодействуют с АТФ-синтазой в нормальных условиях. Следовательно, открытие РТР в митохондриях до выделения мономеров и димеров АТФ-синтазы должно повышать стабильность каналов и каналобразующую способность изолированных комплексов. Чтобы проверить данную гипотезу мы сравнили активность, белковый состав и способность к образованию каналов с высокой проводимостью в плоских липидных мембранах димеров и мономеров АТФ-синтазы, выделенных из митохондрий печени и сердца крысы, до и после индукции РТР кальцием.

Открытие РТР регистрировали по EGTA- и циклоспорин А-чувствительному набуханию митохондрий. Разделение мономеров и димеров АТФ-синтазы осуществляли методом электрофореза в не денатурирующих условиях (BN-PAGE). АТФазную активность в гелях регистрировали стандартным методом. Состав полос мономеров и димеров АТФ-синтазы определяли методом тандемной масс-спектрометрии. Электрофизиологические свойства АТФ-синтазы изучали с помощью одноканального рекордера после встраивания комплекса в искусственные плоские липидные бислои.

Обнаружено, что предварительная индукция РТР в митохондриях снижала специфическую АТФазную активность димеров и, в меньшей степени, мономеров АТФ-синтазы в BN-PAGE гелях. Однако, вопреки нашим ожиданиям, индукция РТР резко подавляла способность как димеров, так и мономеров формировать Ca<sup>2+</sup>-активируемые каналы с высокой проводимостью в липид-

ных мембранах. При этом, снижение каналообразующей активности АТФ-синтазы коррелировало со снижением уровня лишь двух белков в полосах: метилмалонат-семиальдегиддегидрогеназы (Aldh6a1) и прохибитина 2 (Phb2), что указывает на возможность их участие в формировании и/или регуляции комплекса РТР.

Полученные данные позволили предложить новый механизм сборки комплекса РТР, состоящего из тетрамера Aldh6a1 в матриксе, связанного с субъединицами g и f АТФ-синтазы во внутренней мембране митохондрий. Индукция РТР начинается с  $Ca^{2+}$ -зависимого разрушения комплекса Phb-Phb2, ассоциированного с димером АТФ-синтазы, что приводит к снижению стабильности последнего и, в свою очередь, способствует вовлечению субъединиц, участвующих в формировании димера, во взаимодействие с ближайшей Aldh6a1.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-04-00327а.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Giorgio V. et al.* Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013. 110. 5887—5892.
2. *Mnatsakanyan N. et al.* A mitochondrial megachannel resides in monomeric  $F_1F_0$  ATP synthase // *Nat Commun*. 2019. 10(1). 5823.
3. *Urbani A. et al.* Purified F-ATP synthase forms a  $Ca^{2+}$ -dependent high-conductance channel matching the mitochondrial permeability transition pore // *Nat Commun*. 2019. 10(1). 4341.
4. *Alavian K.N. et al.* An uncoupling channel within the c-subunit ring of the  $F_1F_0$  ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014. 111. 10580—10585.
5. *Carraro M. et al.* High-Conductance Channel Formation in Yeast Mitochondria is Mediated by F-ATP Synthase e and g Subunits // *Cell Physiol Biochem*. 2018. 50(5). 1840—1855.
6. *Galber C. et al.* The f subunit of human ATP synthase is essential for normal mitochondrial morphology and permeability transition // *Cell Rep*. 2021. 35(6). 109—111.
7. *Neginskaya M.A. et al.* ATP Synthase C-Subunit-Deficient Mitochondria Have a Small Cyclosporine A-Sensitive Channel, but Lack the Permeability Transition Pore // *Cell Rep*. 2019. 26(1). 11—17.
8. *Carroll J. et al.* Persistence of the permeability transition pore in human mitochondria devoid of an assembled ATP synthase // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019. 116(26). 12816—12821.
9. *Bonora M. et al.* Mitochondrial permeability transition involves dissociation of  $F_1F_0$  ATP synthase dimers and C-ring conformation // *EMBO Rep*. 2017. 18(7). 1077—1089.
10. *He J. et al.* Persistence of the mitochondrial permeability transition in the absence of subunit c of human ATP synthase // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017. 114(13). 3409—3414.
11. *Carrer A. et al.* Defining the molecular mechanisms of the mitochondrial permeability transition through genetic manipulation of F-ATP synthase // *Nat Commun*. 2021. 12. 4835.



## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ И ДЕЗИНТЕГРАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ

*Панаит А.И.*

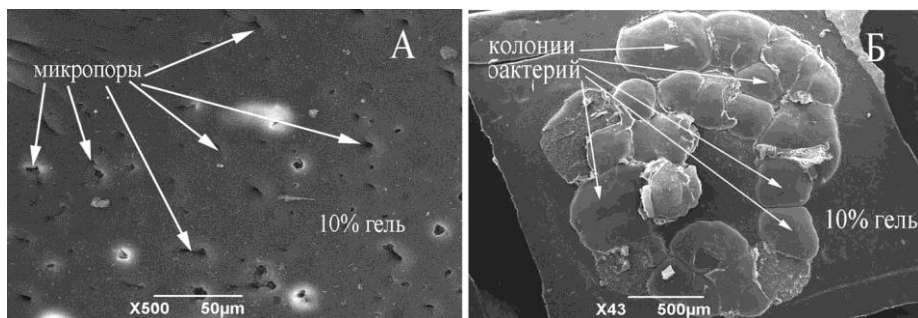
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Во многих отраслях производства образование биоплёнки приводит к значительным потерям ресурсов и снижению эффективности, что заставляет искать способы её удаления. Микробная плёнка образуется на границе твёрдой поверхности и влажной среды в виде многоклеточного сообщества, погружённого в полимерный матрикс. По сравнению с планктонной формой биоплёнка, формируя собственный гомеостаз, обеспечивает микроорганизмам защиту от антибиотиков, а также от механического разрушения внешним потоком жидкости. Повышение устойчивости к антимикробным препаратам требует значительного увеличения их концентрации в дезинфицирующих растворах, что оказывает дополнительную экологическую нагрузку на окружающую среду. Поэтому актуальной является разработка принципиально новых способов удаления биоплёнки, которые были бы одновременно экономичны, эффективны и экологически безопасны. Альтернативу традиционной очистке представляет обработка электрохимически активированным водным раствором (ЭХАР), обладающим широким бактерицидным диапазоном действия.

Цель работы состояла в том, чтобы разработать экспериментальную модель и новый экологически чистый способ её дезинтеграции на основе ЭХАР.

Метастабильные фракции ЭХАР проявляют обеззараживающие свойства при дезинфекции поверхности неорганических материалов. Предполагается, что они также будут эффективны в случае обработки биологической продукции, которая не терпит грубой химической или механической обработки, например, фрукты или ягоды. В качестве тест-объекта использовали плотный 10% агаровый гель на водном растворе, содержащем питательный субстрат и электролиты. Рост биопленки инициировали нанесением на поверхность агарового геля планктонной формы микроорганизмов в виде водной суспензии препарата «Бификол».

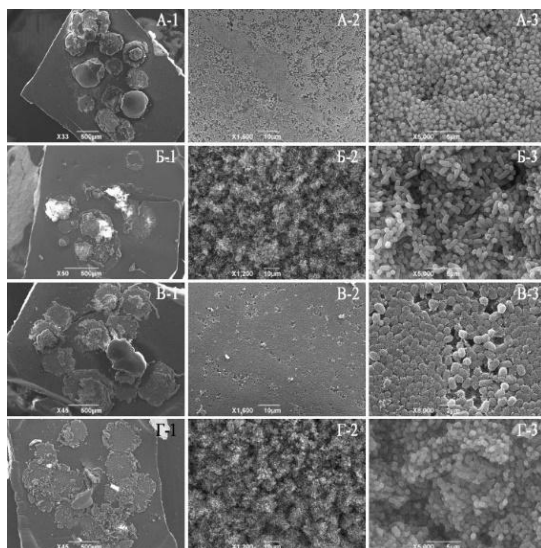
Изменение тонкой структуры образца изучали посредством сканирующей электронной микроскопии. Рисунок 1 демонстрирует морфологические особенности тест-объекта.



**Рис. 1.** Микрофотографии тест-объекта, моделирующего плодоовощную продукцию. (А) поверхность 10% агарового геля, который содержит  $K^+$  (100 мМ) и  $Na^+$  (5 мМ), а также питательный субстрат, (Б) биопленка в виде кластера колоний, сформированных из планктонной формы композиции молочно-кислых бактерий и кишечной палочки

Видно (рис. 1 А), что на фоне относительно ровного рельефа выделяются микропоры — необходимый структурный элемент поверхности моделируемых образцов. Таким образом, подложка из плотного агарового геля с заданными параметрами и бинарная система микроорганизмов позволили имитировать моделируемые условия. В результате получили биопленку в виде отдельного кластера, который включал в себя несколько бактериальных колоний (рис. 1 Б).

В данном исследовании дезинфекцию пленки на поверхности тест-объекта проводили в аэрозоле субмикронных частиц водного раствора (среда «сухой туман»). Для производства сухого тумана был разработан лабораторный стенд на основе ультразвукового генератора аэрозоля. Отметим, что под действием ультразвука ЭХАР стремится восстановиться до состояния исходной воды. Показано, что для замкнутого объема ультразвуковая обработка в течение 15 мин. меняла окислительно-восстановительный потенциал католита с  $-760$  мВ до  $+200$  мВ, а анолита — с  $+800$  мВ до  $+700$  мВ. Чтобы избежать выпадения капель влаги на бактериальную пленку, чашку Петри располагали вниз поверхностью тест-объекта. Сравнительные результаты дезинфекции в среде «сухой туман» приведены на рис. 2.



**Рис. 2.** Микрофотографии бактериальной пленки, сформированной на поверхности тест-объекта (10% агаровый гель), после обработки в среде «сухой туман»: (серия А) 40 мин. — аэрозоль воды, (серия Б) 40 мин. — аэрозоль католита, (серия В) 40 мин. — аэрозоль анолита, (серия Г) 20 мин. — аэрозоль католита и 20 мин. анолита, последовательно

На обзорных фотографиях видно (рис. 2 А-1, Б-1, В-1, Г-1), что основная масса колонии удалялась, но везде оставался донный слой клеток. В случае обработки аэрозолем католита клеточная масса выглядела более разрыхленной (рис. 2 Б-2, Г-2), чем без католита (рис. 2 А-2, В-2). Дегградация межклеточного матрикса хорошо прослеживалась при большом увеличении (рис. 2 Б3, Г3). В гораздо менее выраженной форме эффект присутствовал в среде аэрозоля воды, но оставались следы барьерной пленки (рис. 2 А-2), а также сохранялся поверхностный слой молочно-кислых бактерий (рис. 2 А-3). Ультраструктурный анализ показал сложную многослойную структуру колонии, сформированную бинарной системой микроорганизмов. На нижнем уровне находились клетки *E.coli*, над ними располагались молочно-кислые бактерии, заключенные в матрикс, а от внешней среды колонию отделяет барьерная пленка. Таким образом, факт разрушения бактериальной пленки аэрозолем ЭХАР свидетельствует о профилактическом потенциале данного вида обработки.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 20-16-00019.

## О ВНЕШНЕЙ ОБУСЛОВЛЕННОСТИ СПЕКТРА ОКОЛОЧАСОВЫХ ПЕРИОДОВ

Панчелюга В.А., Панчелюга М.С.

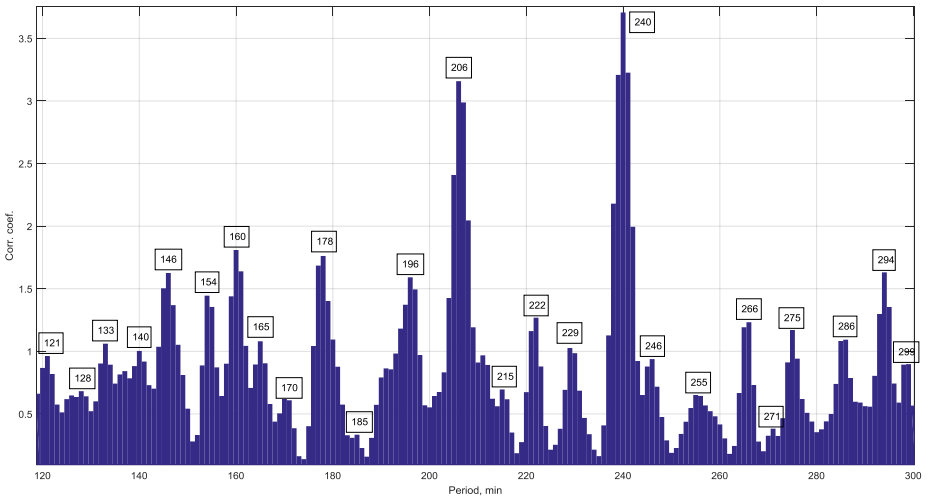
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия  
E-mail: victor.panchelyuga@gmail.com

Околочасовыми ритмами (ОР) принято называть колебания с периодами от десятков минут до нескольких часов. Эти колебания были обнаружены в динамике многих биологических систем: размерах клеточного ядра, интенсивности синтеза белка, активности ферментов, концентрации гормонов и АТФ, потребления кислорода, рН цитоплазмы, в органных и организменных ритмах дыхания, в сердечных сокращениях, в активности мозга, в поведенческих реакциях животных и человека и др. Они обнаружены у бактерий, дрожжей, некоторых других одноклеточных, моллюсков, у млекопитающих. Эти ритмы выявляются как *in vivo* так и *in vitro* [4—9].

Несмотря на более чем полувековые интенсивные исследования, окончательно механизм возникновения ОР установить не удалось. В большинстве работ авторы, в первую очередь, рассматривают ОР только как результат внутренних регуляторных процессов организма или межклеточных взаимодействий. В ходе проводимых нами исследований были получены результаты, которые, на наш взгляд, говорят в пользу внешней природы фактора, являющегося синхронизатором этих ритмов.

Начало упомянутым исследованиям было положено в работе [4], в которой, с использованием локального фрактального анализа методом всех сочетаний (МВС) [5], был найден спектр периоды которого, в свою очередь, были обнаружены в флуктуациях процессов различной природы [4]. Поэтому, данный спектр назван нами «универсальный спектр периодов» (УСП). Одной из особенностей УСП является его «биологическая активность»: он обнаружен при анализе временных рядов флуктуаций параметров различных биологических систем.

В [7] на основе анализа большого массива временных рядов флуктуаций температуры мелких млекопитающих были получены спектры периодов, аналогичные показанному на рис. 1. Сравнение периодов, найденных в флуктуациях температуры млекопитающих с периодами, полученными в ходе МВС-анализа временных рядов флуктуаций скорости альфа-распада показало их хорошее совпадение и на этом основании сделано заключение о том, что в обоих случаях наблюдается один и тот же спектр — УСП.



**Рис. 1.** Спектр периодов полученный на основе рядов флуктуаций температуры мышей

В таблице приведены значения ОР, которые описаны в [3]. Справа от каждого значения ОР даны соответствующие величины УСП-периодов. Первое значение УСП-периода соответствует периодам, найденным в флуктуациях температуры мелких млекопитающих, а второе — значению УСП-периода, найденного в флуктуациях скорости альфа-распада. Как следует из таблицы, наблюдается практически полное соответствие ОР- и УСП-спектров в пределах точности их определения ( $\pm 1$  мин). Очевидно, что в силу отмеченного совпадения, флуктуации температуры млекопитающих, можно рассматривать как одно из интегральных проявлений ОР, наряду с процессами, перечисленными выше.

Таблица

**Значения ОР- и УСП-периодов, мин**

УС			УС			УС			УСП			УС		
Р	П		Р	П		Р	П		Р	П		Р	П	
2	3	2	2		2	5	4	6	5	4	5.5	50	50	51
8	8		3	3		0	1	1	0	0	0	80	80	82
2	0	1.3	4		4.4	5		5.8	0	1		40	40	40
4		5	6	7	6.9	0	0	0.7	00	9	9.8			
7	6	7.5	0		1.3	6	5	5	05	04	06.3			
0	9		2		3	9	8	8.3	20	20	18			

Совпадение периодов в спектрах, представленных в таблице, которые получены с использованием временных рядов флуктуаций в процессах кардинально различной природы: физических (альфа-распад) и биологических (флуктуации температуры млекопитающих, ОР) на наш взгляд, говорит о наличии внешнего синхронизатора этих ритмов. В пользу именно внешнего синхронизатора говорит также явление, заключающееся в значительно более четкой выраженности УСП-спектра в флуктуациях температуры млекопитающих для случая пространственно-разнесенных измерений, когда 1) животные не контактируют между собой и 2) воздействующий на них внешний фон является различным. То есть, в случае, когда устраняются вклады, связанные с «локальной синхронизацией» [7].

Наличие такого внешнего синхронизатора вступает в кажущееся противоречие с «внутренними» механизмами ОР, которые, в некоторых случаях, детально исследованы [1—3]. Но, как известно, необходимым условием синхронизации является автоколебательный характер синхронизируемых систем [8]. На основе имеющихся литературных данных [1—3] источники ОР мы можем рассматривать, как автоколебательные системы, частоты которых близки к частотам УСП, следовательно, такие системы могут быть синхронизованы сколь угодно слабым внешним воздействием [8].

В этом случае возникает вопрос о том, как частоты «ОР-генераторов» оказались близкими к частотам УСП? Исходя из отмеченной в [4] связи УСП со спектром собственных колебаний Земли, которые так или иначе модулируют практически все процессы в литосфере (микрофлуктуации атмосферного давления, флуктуации электрического и магнитного полей и др.) и которые, практически в неизменном виде, присутствовали в ходе всей биологической эволюции, задавая слабый, но очень стабильный частотный фон на котором происходило формирование ныне существующих биосистем. Очевидно, наличие такого фона должно было привести к «эволюционному импринтингу» УСП-частот, что в конечном итоге и привело к отмеченному выше совпадению ОР- и УСП-периодов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Эйдус Л.Х., Литинская Л.Л.* // Биофизика. 2006. 51(1). 108—115.
2. *Бродский В.Я.* // Биохимия. 2014. 79(6). 619—632.
3. *Ultradian rhythms in life processes.* Springer-Verlag, 1992. 419 p.
4. *Панчелюга В.А., Панчелюга М.С.* // Биофизика. 2015. 60(2). 395—410.
5. *Панчелюга В.А., Панчелюга М.С.* // Биофизика. 2013. 58(2). 377—384.
6. *Диатроптов М.Е., Панчелюга В.А. и др.* // Доклады РАН, 2020, 494 (1), 472—476.
7. *Панчелюга В.А. и др.* // Актуальные вопр. биол. физ. и хим. 2021. 6(3). 393—399.
8. *Пиковский А., Розенблюм М., Куртс Ю.* Синхронизация. М.: Техносфера, 2003. 508 с.

# ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ С ПОМОЩЬЮ СОВМЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ БЛОКАДЫ NMDA И ПОЗИТИВНОЙ МОДУЛЯЦИИ МГЛУ4 РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

*Першина Е.В.<sup>1</sup>, Черноморец И.Ю.<sup>1</sup>, Жуйкова Н.С.<sup>1</sup>, Гарджук А.А.<sup>2</sup>,  
Архипов В.И.<sup>1</sup>*

- <sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;  
<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** Исследование механизмов нейродегенерации, а также поиск и разработка новых подходов для нейропротекции и репарации повреждений мозга различной этиологии, актуальная проблема нейрофизиологии и медицины. Глутаматная эксайтотоксичность, возникающая вследствие чрезмерного релиза глутамата и/или сверх активации его рецепторов является одним из компонентов нейродегенерации.

**Целью работы** являлось исследовать влияние совместного применения блокады NMDA рецепторов и активации метаботропных рецепторов глутамата 4 подтипа после запуска нейродегенерации на морфофункциональные изменения в мозге крыс.

**Методы.** Половозрелые самцы крыс линии Вистар ( $m = 200\text{—}220$  г,  $n = 18$ ) были поделены на три подгруппы: «Контроль», «ТМТ» и «ТМТ + мемантин + TCN238» Животным контрольной группы вводили физиологический раствор, крысам подопытных групп вводили хлорид тиметилолово (ТМТ) в дозе 7,5 мг/кг, в/б, что запускает процесс нейродегенерации в гиппокампе. Фармакологическое подавление эксайтотоксичности в группе «ТМТ+мемантин+ TCN238» осуществляли с помощью 2-х инъекций *Memantine hydrochloride* (Tocris #0773) в дозе 10 мг/кг, в/б через 48 и 72 часа после инъекции ТМТ и TCN238 (Tocris #4259), в дозе 2 мг/кг, в/б на 5, 6, 7, 8 сутки после инъекции ТМТ. Через три недели после инъекции ТМТ тестировали поведение крыс с помощью реакции пассивного избегания в АПК «Шелтер», а также проводили морфологические исследования гибели пирамидных нейронов гиппокампа в мозге крыс окраской срезов по Ниссля и оценивали состояние микроглии (IBA1) и астроцитов (GFAP) с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания тонких срезов мозга.

**Результаты.** Морфологические исследования в подгруппе «ТМТ» выявили гибель пирамидных нейронов в поле CA4-CA3 гиппокампа, миграцию микроглии в хилус и к полю CA4 гиппокампа, а также активацию астроцитов в

хилусе и s. 1-м. слое гиппокампа по сравнению с контрольной группой. В подгруппе крыс с подавлением эксайтотоксичности поле СА4 пирамидного слоя гиппокампа было более сохранно, чем в группе «ТМТ», однако также как и в группе «ТМТ» наблюдалась активация астроцитов и микроглия была детектирована помимо СА4 еще в СА1, СА2 полях гиппокампа. Результаты поведенческого тестирования выявили дефекты памяти у животных как «ТМТ», так и «ТМТ+мемантин+ТСN238» групп, по сравнению с контролем, однако время нахождения животных из подгруппы с совместной блокадой НМДА и позитивной модуляции мГлу4 в светлом отсеке было больше, чем у животных в группе «ТМТ».

**Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что после запуска нейродегенерации совместное применение блокады НМДА рецепторов с активацией метаботропных рецепторов глутамата 4 типа: способствует снижению когнитивного дефицита у животных по сравнению с «ТМТ», но и достоверно отличается от контроля, спасает нейроны поля СА3 гиппокампа, приводит к активации микроглии и астроцитов в гиппокампе, роль которых может быть как положительной, так отрицательной, что требует дальнейших исследований в динамике.

Работа поддержана грантом РФФ 21-75-00106.

## **СЕМЕЙСТВО КОМПЛЕКСОВ ГОМЕОДОМЕННЫХ БЕЛКОВ С ДНК: КЛАССИФИКАЦИЯ, АНАЛИЗ, СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ**

*Полозов Р.В.<sup>1</sup>, Грохлина Т.И.<sup>2</sup>, Панченко Л.А.<sup>3</sup>, Иванов В.В.<sup>4</sup>*

- <sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия;
- <sup>2</sup> Институт математических проблем биологии РАН, филиал Института прикладной математики им. М.В. Келдыша, Пушкино, Россия;
- <sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;
- <sup>4</sup> Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

Процесс транскрипции регулируется белками (факторами транскрипции). Факторы транскрипции безошибочно распознают определенные участки ДНК генома и образуют с ними специфические комплексы. Процессы ассоциации и диссоциации факторов транскрипции с ДНК являются основой регуляции транскрипции. Сложная сеть прямых и обратных связей характерна для транскрипции и экспрессии генов. Какой тип клеточных сигналов заставляет факторы транскрипции открывать или закрывать тот или иной ген, и по каким причинам происходит фор-



мирование сигналов. Эти вопросы относятся скорее к организации биологической системы как целого, и, поэтому для изучения этих явлений нужны совсем другие подходы и методы. Мы не будем касаться этих труднейших вопросов, а рассмотрим лишь самый элементарный этап регуляции транскрипции — узнавание фактором транскрипции специфического участка генома и образование с ним специфического комплекса. Факторы транскрипции эукариот собраны эволюцией в семейства, которые регулируют различные процессы функционирования клеток организма. Семейство гомеодоменных белков регулирует процессы дифференцировки и пролиферации клеток. Комплексы этих белков организованы весьма просто — относительно короткий участок ДНК образует достаточно плотную упаковку атомов азотистых оснований (в широком желобе) с атомными группами «узнающей» альфа-спирали гомеодомена белка. Эта упаковка характеризуется вполне определенной ориентацией атомов альфа-спирали и ДНК и образованием специфических атомных контактов между ними. В этой области тесного соприкосновения белка и ДНК, «интерфейса», двойная спираль деформируется: как «внутренняя геометрия» нуклеотидов, так и форма двойной спирали. Мера деформации зависит от нуклеотидной последовательности ДНК в области интерфейса и специфична для каждого комплекса гомеодоменный белок-ДНК. Мы полагаем, что геометрия и размер широкого желоба, типы аминокислот, специфические атом-атомные контакты между узнающей альфа-спиралью и ДНК — углы и расстояния, характеризующие пространственное положение атомных групп, и топологические свойства интерфейса, связность атомных групп в интерфейсе — это основные характеристики биомолекулярного узнавания гомеодоменами ДНК.

На этих допущениях основаны наши дальнейшие рассуждения. Эти характеристики обеспечивают надежность, гибкость узнавания и определяют численные значения аффинности, специфичности комплексов и времен узнавания.

Целью нашей работы является применение методов многомерного статистического анализа пространственных структур интерфейсов комплексов гомеодоменных белков с ДНК: их классификация, исследование взаимосвязей комплексов друг с другом, их эволюция, правила узнавания, построение моделей узнавания.

Для решения задач классификации необходимо составить список надлежащих дескрипторов комплексов и их интерфейсов, провести многомерный статистический анализ данных из этого списка. В качестве дескрипторов выбраны геометрические параметры ДНК, вычисленные (по координатам комплексов, представленных в PDB) с использованием пакета 3DNA, предназначенного для анализа, реконструкции и визуализации трехмерных структур нуклеиновых кислот (OLSON et al.). В данной работе мы упростили задачу выбора дескрипторов. Геометрия гомеодомена не меняется при связывании белка с ДНК, конформация дезоксирибозы

и контакты одной аминокислоты в узком желобе ДНК вносят, конечно, вклад аффинность и специфичность комплекса, но численные значения их величин малы по сравнению с вкладом контактов в широком желобе ДНК. Поэтому, мы используем геометрические параметры, представленные ниже.

1. Параметры, описывающие отклонения положения оснований в паре от идеального их положения- Shear, Stretch, Stagger, Buckle, Propeller, Opening («диккерсоновы параметры»). Здесь Shear и Stretch определяют смещения оснований в плоскости пары, Opening — угол между основаниями в плоскости пары. Три оставшихся параметра характеризуют выход оснований из плоскости. «Идеальным» здесь является положение оснований в абсолютно плоской паре, где все шесть параметров равны.

2. Параметры, описывающие пространственное расположение соседних пар оснований, т.е. положение и ориентацию одной пары относительно другой: сдвиги Shift, Slide и Rise по осям  $Ox$ ,  $Oy$ ,  $Oz$  соответственно и три поворота Tilt, Roll и Twist (параметры твердого тела).

3. Параметры, описывающие регулярность спирали (спиральные параметры), — смещения по осям  $x$ ,  $y$  и  $z$  —  $x$ -displacement,  $y$ -displacement, helical rise соответственно, и повороты вокруг осей спирали — inclination ( $\eta$ ), tip ( $\theta$ ) и helical twist ( $\Omega h$ ). Две последние группы описывают взаимное положение соседних пар оснований в разных системах координат — в системе отсчета, связанной с димером, и локальной системе спирали.

4. Кроме того, еще одна группа параметров — это параметры Shift, Slide и Rise по осям  $Ox$ ,  $Oy$ ,  $Oz$ , соответственно, и три поворота Tilt, Roll и Twist, аналогичные группе 2., с тем отличием, что они характеризуют положение соседних азотистых оснований в одной из цепочек ДНК.

Для анализа этих четырех групп данных мы применяем статистические методы анализа многомерных данных. На первом этапе для выявления влияния качественного фактора, нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК в интерфейсе гомеодомен-ДНК, в каждой из групп рассматриваемых параметров мы использовали однофакторный дисперсионный анализ, методы ANOVA и непараметрические критерии — Крускала—Уоллиса, Брауна—Муда. Например, для «диккерсоновых параметров» результаты анализа позволяют сделать вывод о том, что влияние нуклеотидной последовательности на переменные Stretch, Stagger, Buckle, Propeller, Opening статистически значимо, а на переменную Shear — статистически не значимо. Отметим, что результаты, полученные с помощью однофакторного дисперсионного анализа, подтверждаются и непараметрическими методами. На следующем этапе мы использовали методы классификации многомерных данных: кластерный анализ для поиска другого качественного фактора (искомого класса) и

дискриминантный анализ, позволяющий предсказать принадлежность объекта к этому классу.

Известна «максима»: пока научные наблюдения не подтверждены теорией, верить им нельзя. Пока нет теории биомолекулярного узнавания, приходится предлагать модели, правила и алгоритмы узнавания. В нашей работе мы поступаем именно так. Проведенные нами анализ и интерпретация результатов классификации приведем в кратком резюме: семейство гомеодоменных белков и их комплексов с ДНК имеет детерминированную и псевдослучайную компоненты. Детерминированная компонента соответствует структурным и физико-химическим аспектам проблемы узнавания, а псевдослучайная компонента — эволюционным и информационным аспектам.

Мы предлагаем детерминированную модель формирования комплекса белок-ДНК. Механизм

узнавания в этой модели является общим для всех комплексов гомеодомен-ДНК. Структура двойной спирали в комплексе — двойная спираль в В-форме ДНК, но с другими численными значениями. Кроме того, двойная спираль комплекса является «маркером» для клеточного сигнала о диссоциации комплекса.

## **СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ГИДРОЛИЗ СИНТЕТИЧЕСКОГО МИМЕТИКА ПЕПТИДОГЛИКАНА ЭНДОЛИЗИНАМИ БАКТЕРИОФАГОВ T5, RB43 и RB49**

*Прохоров Д.А.<sup>1</sup>, Азев В.Н.<sup>2</sup>, Микулинская Г.В.<sup>2</sup>, Чулин А.Н.<sup>2</sup>, Молчанов М.В.<sup>1</sup>,  
Уверский В.Н.<sup>3,4</sup>, Кутьищенко В.П.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия;

<sup>2</sup> Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ФИБХ РАН), Пушкино, Россия;

<sup>3</sup> Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН ФИЦ НЦБИ РАН, Пушкино, Россия;

<sup>4</sup> Department of Molecular Medicine and USF Health Byrd Alzheimer's Research Institute, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, FL, USA.

*E-mail: \*dmitry\_pr@rambler.ru*

Эндолизины ряда бактериофагов, в том числе колифагов T5, RB43 и RB49, гидролизуют пептидогликан бактериальной клеточной стенки. Этот сложный биополимер состоит из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, последняя связана амидными связями с пептидными субъединицами, способными образовывать между собой укрепляющие

«мостики». Состав пептидной субъединицы, а также структура пептидных мостиков варьируют, и эти вариации положены в основу классификации пептидогликанов [1]. Согласно ей, в пептидогликанах типа А, свойственного большинству грамположительных и грамотрицательных бактерий, всегда встречается связь L-Ala-D-Glu. Именно она является мишенью эндолизинов целого ряда бактериофагов, в том числе колифагов T5, RB43, RB49 [2, 3].

Из-за сетчатого строения и нерастворимости пептидогликана процессы его связывания и гидролиза ферментами не могут быть изучены спектральными методами. Чтобы преодолеть эти проблемы, мы синтезировали один из простейших водорастворимых миметиков пептидогликана и исследовали процесс его гидролиза *in vitro* рекомбинантными L-аланил-D-глутаматпептидазами бактериофагов T5, RB43, RB49 (EndoT5, EndoRB43, EndoRB49).

Структура выбранного миметика — N-ацетилглюкозаминил- $\beta$ (1-4)-N-ацетилмурамоил-L-аланил- $\gamma$ -D-глутамил-L-аланил-D-аланин (глюкозаминилмурамил-тетрапептид, ГМТП) — не полностью повторяет структуру элементарного звена природного пептидогликана, но имитирует его минимальный фрагмент. Углеводная часть миметика представлена дисахаридом N-ацетилглюкозаминил- $\beta$ (1-4)-N-ацетилмурамоилом, с которым конъюгирован тетрапептид. Положения и конфигурации начального (L-аланил) и конечного (D-аланин) аминокислотных остатков тетрапептида полностью соответствуют природной последовательности. Во втором положении находится D-глутамил. При выборе остатка в третьем положении (L-аланил) учли необходимость придания всей пептидной цепочке большей гидрофобности для лучшего связывания с ферментом.

На первом этапе исследования на основании спектров  $^1\text{H-N-COSY}$ ,  $^1\text{H-N-TOCSY}$ ,  $^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$  и  $^1\text{H-}^{13}\text{C-NMBC}$  было получено полное отнесение протонных и углеродных резонансов синтетического миметика, что позволило интерпретировать как ход реакций его гидролиза пептидазами EndoT5, EndoRB43, EndoRB49, так и характер продуктов реакций в каждом случае.

При добавлении к раствору ГМТП гомогенного рекомбинантного ферментного препарата начинается деградация субстрата путем гидролиза пептидной связи между L-Ala<sub>1</sub> и D-Glu<sub>2</sub>. О разрыве этой связи свидетельствуют характерные изменения в спектрах ЯМР, такие как: (1) появление C-концевого карбоксила, принадлежащего остатку L-Ala<sub>1</sub>, (2) исчезновение сигнала амидного протона D-Glu<sub>2</sub>, (3) исчезновение уникального пространственного окружения  $\beta_{1,2}$ -протонов остатка D-Glu<sub>2</sub>, (4) значительные изменения положений остальных сигналов остатков L-Ala<sub>1</sub> и D-Glu<sub>2</sub>. Кроме того, происходит изменение химического сдвига сигнала  $\alpha$ -аномерного протона  $\alpha$ -N-

ацетилмуравовой кислоты, а также изменение его интегральной интенсивности, что позволяет следить за кинетикой процесса расщепления.

Следует отметить, что добавление неактивного мутантного EndoT5 с точечной заменой каталитического аспартата (EndoT5 D130A) к раствору ГМТП не вызывало гидролиза субстрата, в отличие от природных белков.

Показано, что полученный миметик взаимодействует с исследуемыми ферментами. Для совершения гидролиза молекулы ферментов приближаются к гликопептиду вблизи метильных групп всех трех аланинов. Гидролиз происходит по связи между L-Ala и D-Glu. Искусственный аналог субстрата гидролизуются ферментами с различной скоростью, которая снижается за пределами оптимума pH. EndoT5 продемонстрировал самую низкую скорость гидролиза, тогда как гидролиз EndoRB49 был самым быстрым, а EndoRB43 показал промежуточную эффективность. Ранее установлено, что оптимум pH для всех трех исследованных ферментов широк и лежит в пределах 7,0—9,0 [2, 3]. Интересно отметить, что EndoRB49 активен по отношению к миметику даже при pH 4,3, что чрезвычайно перспективно с точки зрения биотехнологических приложений. Остаточная активность других ортологичных пептидаз — EndoT5 и EndoRB43 — при pH 4,3 слишком мала, чтобы ее можно было обнаружить.

Представленные данные согласуются с гипотезой о том, что EndoRB49 наименее селективен и, следовательно, обладает потенциально более широким спектром бактериолитической активности. Созданный в работе миметик субстрата позволил впервые наблюдать процесс гидролиза спектрально и может быть использован для изучения кинетики гидролиза и связывания субстрата другими пептидогликангидролазами.

Работа выполнялась в рамках государственного задания ИТЭБ РАН. Исследования по данному направлению продолжаются.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Schleifer K.H. and Kandler O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications // *Bacteriol Rev.* 36. 407—477.
2. Mikoulińska G.V., Odínokova I.V., Zimin A.A., Stepnaya O.A. l-alanoyl-d-glutamate peptidase (bacteriophage T5). Chapter 316, p. 1411—1414. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3rd Edition, Elsevier Ltd., edited by Neil Rawlings and Guy Salvesen, 2013. ISBN: 978-0-12-382219-2.
3. Mikoulińska G.V., Chernyshov S.V., Shavrina M.S., Molochkov N.V., Lysanskaya V.Ya., Zimin A.A. Two Novel Thermally Resistant Endolysins Encoded by Pseudo T-Even Bacteriophages RB43 and RB49 // *J Gen Virol.* 2018. 99. 402—415. doi: 10.1099/jgv.0.001014.

# РАЗЛИЧИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К РАДИАЦИОННОМУ ФАКТОРУ

Сирота Н.П.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия  
E-mail: sirota@iteb.ru

Развитие ядерных технологий создает новые возможности их использования в медицинских целях, в частности, в области радиотерапии онкологических заболеваний [1]. В настоящее время оценивается эффективность использования, как протонов, так и ускоренных частиц углерода. Для этого необходимо исследовать относительную биологическую эффективность (ОБЭ) этих радиационных факторов. Классические подходы оценки ОБЭ состоят в изучении выживаемости животных или клеточных культур после радиационного воздействия в идентичных дозах. Клеточные популяции, используемые для оценки реакции на радиационное воздействие, демонстрируют неоднородный ответ в рамках одной и той же популяции. Причины этого до сих пор не установлены однозначно. Естественно возникает вопрос о вкладе внутриклеточных систем репарации ДНК в конечные радиационные эффекты. Мы высказали предположение, что для оценки их влияния на первичную структуру радиационно поврежденной ДНК, надо использовать модель, в которой функционирование репарационных систем ДНК исключено. Наиболее соответствующей таким условиям является оценка поврежденности ДНК, проводимая в нуклеоидах индивидуальных клеток.

Для проверки данного предположения мы провели эксперименты на препаратах, полученных с использованием изолированных сплееноцитов, после их иммобилизации в легкоплавкую агарозу. Эти препараты помещали в лизирующий раствор (2,5 М NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100) на ночь. В процессе инкубации происходит лизис клеточной и ядерной мембран, депротенизация ДНК, блокируются внутриклеточные нуклеазы. При этом ядерная ДНК остается прикрепленной к белкам ядерного матрикса. Полученные таким образом препараты затем можно подвергать радиационному воздействию *in vitro*. После чего их закладывают на хранение согласно технологии, опубликованной нами ранее [2]. По мере необходимости препараты извлекаются, и проводится их анализ методом комета-тест. В процедуре Comet assay, используется 20-минутное воздействие 0,3 М щелочи на нуклеоиды, иммобилизованные в структуру легкоплавкой агарозы. Затем щелочь отмывается дистиллированной водой (3 раза по 5 мин.). Препараты окрашиваются раствором бромистого эти-

дия в фосфатно солевом буфере в течение 60 минут. После чего анализируются под флуоресцентным микроскопом с захватом наблюдаемых полей зрения цифровым фотоаппаратом. На микрофотографиях мы обнаружили, что в популяции изолированных спленоцитов можно наблюдать два типа клеток, различающихся по организации генома у индивидуальных нуклеоидов. Уровень первичных повреждений ДНК, индуцируемый идентичным радиационным воздействием в условиях *in vitro*, оказался различным для двух типов нуклеоидов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Kuznetsova E.A., Sirota N.P., Mitroshina I.Y., Pikalov V.A., Smirnova E.N., Rozanova O.M., Glukhov S.I., Sirota T.V., Zaichkina S.I.* DNA damage in blood leukocytes from mice irradiated with accelerated carbon ions with an energy of 450 MeV/nucleon // *Int J Radiat Biol.* 2020. 96(10):1245—1253. doi: 10.1080/09553002.2020.1807640. Epub 2020 Aug 25. PMID: 32780609.
2. *Kuznetsova E.A., Dyukina A.R., Chernigina I.A., Sirota N.P.* A method of low-temperature storing of agarose slides with lysed cells // *Bull Exp Biol Med.* 2013. 155(6):757-9. doi: 10.1007/s10517-013-2245-7. PMID: 24288759.

### ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ЧЕРЕЗ ПРОНИЦАЕМЫЕ КОНТАКТЫ

*Смолянинов В.В.<sup>1</sup>, Потапова Т.В.<sup>2</sup>, Асланиди К.Б.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

<sup>2</sup> Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

*E-mail:* smolian@mail.ru

Все многоклеточные организмы от водорослей и грибов до планарий и человека представляют собой сложные структуры взаимодействующих клеток. Клетки могут взаимодействовать друг с другом как через окружающую среду, так и непосредственно, организуя электрическую и диффузионную связь через проницаемые контакты. Существуют три основных способа межклеточных взаимодействий посредством биохимических сигналов, биомеханических сил и биоэлектрической коммуникации.

Основными параметрами, характеризующими состояние отдельной клетки, являются: мембранный потенциал, внутриклеточные концентрации неорганических ионов, экспрессия генов, синтез и встраивание вновь синтезированных компонентов. ДНК, РНК, белки или липиды могут связываться с белками, встраи-

ваться в плазматическую мембрану или мембраны клеточных органелл. Популяция клеток, связанных проницаемыми контактами, реагирует на изменения окружающей среды иначе, чем каждая клетка в отдельности.

В онтогенезе и регенерации для достижения крупномасштабных анатомических результатов необходимо координировать поведение отдельных клеток и тканей. Важнейшие закономерности функционирования системы клеток, связанных проницаемыми контактами, получены на основании классических представлений о живой клетке как об открытой неравновесной термодинамической системе, пространственная структура которой поддерживается потоком энергии из внешней среды.

На основании теоретических оценок и анализа экспериментальных результатов, полученные на синезеленных водорослях, мицелиальных грибах и культивируемых клетках млекопитающих, в работе сформулированы основные закономерности взаимодействия невозбудимых клеток через проницаемые межклеточные контакты.

1. Необходимым и достаточным условием передачи энергии через проницаемые контакты в виде ионных потоков является наличие электрического тока между клетками. Мощность, передаваемая от клетки донора к клетке акцептора, пропорциональна электрическому току, текущему через проницаемые контакты.

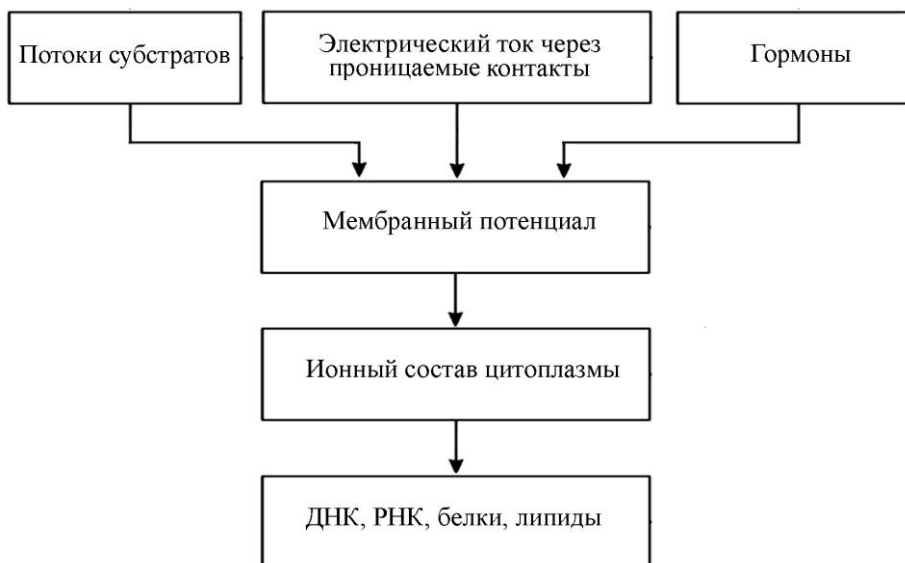
2. Энергетические и электродиффузионные взаимодействия через проницаемые контакты эффективны на расстояниях порядка 1 мм и ограничены величиной пространственной константы эквивалентного электрического кабеля, эффективностью АТФаз, создающих электрический потенциал на плазматической мембране, производством АТФ и потоком субстратов, поступающих в гиперполяризованную клетку.

3. Передача энергии в виде ионных потоков является универсальной функцией всех проницаемых контактов и присуща всем клеточным популяциям.

Таким образом, популяция клеток, связанных проницаемыми контактами, является системой взаимодействующих компартментов. Клетки, могут значительно изменять значения мембранного потенциала в результате изменения ионных потоков через высокопроницаемые контакты. Электродиффузионные взаимодействия посредством ионных потоков через проницаемые контакты внутри компартментов эффективнее, чем взаимодействия между компартментами.

Для системы клеток, связанных проницаемыми контактами, выявлена иерархия управляющих параметров: мембранный потенциал, ионный состав цитоплазмы, экспрессия генов, синтез и встраивание органических молекул.





Сформулированы основные закономерности управления в системе клеток, связанных проницаемыми контактами.

1. Гиперполяризованная клетка управляет мембранным потенциалом деполяризованных соседей и приближает значение их мембранного потенциала к своему уровню.

2. Мембранный потенциал любой клетки управляет ионным составом цитоплазмы.

3. Ионный состав цитоплазмы управляет экспрессией генов, ответственных за процессы пролиферации, дифференцировки или апоптоза.

4. Вновь синтезированные ДНК, РНК, белки или липиды могут изменять мембранный потенциал и ионный состав цитоплазмы.

Направленность управления внутриклеточными процессами определяется тем фактом, что характерные времена экспрессия генов, синтеза и встраивания органических молекул во много раз превосходят характерные времена изменений электрических параметров клетки. Экспрессия генов, синтез и встраивание органических молекул происходят со значительной задержкой по времени после изменений электрических параметров клетки.

## ФРАКТАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ МОЗГА, ИХ ФРАКТАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ И ФРАКТАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

*Тараненко А.М.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия  
E-mail: Taranenko1@rambler.ru

Фрактальная динамика ранее изучалась в физических системах, но также она обнаружена в электроэнцефалограммах (ЭЭГ) головного мозга. Исследователями изучалась фрактальная размерность (ФР) для странного аттрактора, реконструированного по ЭЭГ для мозга и/или его отделов. Было установлено наличие фракталов и мультифракталов, и переходов между ними в норме, на различных стадиях когнитивной и/или оксидативной нагрузки мозга, стадиях 1, 2, 3, 4, и при патологиях, в различных стадиях болезни — для депрессии, психопатии, психозов. С другой стороны, при нейрозаболеваниях установлено изменение общей, и фрактальной (изменение массы ткани при том же объеме) плотности ткани в гиппокампе, миндалине, коре, и др. тканях мозга. В работе показано, что выраженные изменения, **скачки** фрактальной пространственной плотности тканей и временной фрактальности (ФР ЭЭГ) в 3—4-х главных отделах нервной системы, «тройке-четверке» (вегетативной системе, стволе, лимбике, коре), позволяют вскрыть биомедицинский, биофизический, и топологический (N, ФР) **механизм** (1) тревоги и депрессии, посттравматического стрессового расстройства, (2) аутизма, (3) истерического и так называемого ананкастного синдрома, психопатии, (4) шизофрении, и др. психозов. Эту четверку назовем **универсальной линейкой** фрактальных **нейроболезней**. Биоинформационная расшифровка данных для четверки «зоопарка» ФР<sub>-1,-2,-3,-4</sub> электроэнцефалограмм (ЭЭГ) мозга (шок, спячка, нейровоспаление, аутоиммунное поражение мозга), 4-х типовых ступенчатых изменений **плотности ткани** мозга при различных перечисленных выше болезнях, типовых 4-х ступенчатых **скачков** ключевых **гормонов** и нейротрансмиттеров мозга и организма, типовых четырех **процентных соотношений** мощностей  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ритмов в 3-х отделах мозга, привели нас к построению 2—4 генераторной модели мозга (кора и подкорка) [1]. Скачки **размерности** ФР<sub>-1,-2,-3,-4</sub> (при дистрессе) временных **фракталов** в такой модели приводят к «каскаду вниз» уплощения, дегенерации когнитивной и оксидативной работы мозга [1]. А при стрессе (эффekte прекодиционирования, включении им ГИФ фактора, для синтеза собственной СОД, и при стресс-ревитализации тиолового обмена анаэробными упражнениями), применение четверки простых химических лекарств естественного происхождения (3,6,9, полифенолы, мексидол, липин), позволя-

ет управлять нейрорегенеративными процессами  $FR_{+1,+2,+3,+4}$  и излечением всего спектра, линейки болезней мозга. В т.ч. тяжелых, психотических. Клинические предпосылки этих прорывов мы взяли из литературы [1] и ряда наших кейсовых исследований 2007—2021 гг. Нейровоспаление у больных может быть установлено нейроиммунным анализом крови, а фрактальная топология плотности тканей мозга и отделов — методами МРТ, фМРТ, ПЭТ. ФР может быть изучена по ЭЭГ. Проведена инфосхемная реконструкция воздействия методов зрительной антидепривации, когнитивно-поведенческой терапии на депрессию, аутизм, психопатию для гомеостаза серотонин-кортизоловой петли и ее поддержки дофа, окситоцин, глутамат, ацетилхолиновым, липиновым тренингами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Тараненко А.М.* Фрактальные болезни мозга и инфосхемы их коррекции // Естественные и технические науки. 2021. 12(163). 60—64. DOI: 10.25633/ETN.2021.12.26

### **<sup>1</sup>H ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ КАК БЫСТРЫЙ МЕТОД СКРИНИНГА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ**

*Тимченко М.А.<sup>1</sup>, Молчанов М.В.<sup>1</sup>, Слядовский Д.А.<sup>2</sup>, Молчанов В.Г.<sup>3</sup>,  
Согорин Е.А.<sup>2</sup>*

- <sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;
- <sup>2</sup> Институт биологического приборостроения, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия;
- <sup>3</sup> Обнинский институт атомной энергетики — филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

*E-mail: maria\_timchenko@mail.ru*

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) является важнейшим аналитическим методом в химии, физике, биологии и медицине. Одной из перспективных областей применения ЯМР-спектроскопии является изучение ферментативных процессов. ЯМР-спектроскопия дает возможность быстро и без предварительной пробоподготовки оценивать активность различных ферментов в отношении растворимых субстратов и соотношения между образующимися продуктами реакции.

Гепатопанкреас камчатского краба (ГПКК) является ценным источником ферментов, представляющих интерес для пищевой индустрии, косметологии и медицины. С учетом того, что ГПКК представляет собой отход переработки

краба, использование этого сырья для получения ферментных препаратов может служить основой для создания безотходных технологий получения новых ценных продуктов [1].

Целью нашей работы был поиск возможной гиалуронидазной и липолитической активности в гомогенате ГПКК с применением метода  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии.

К настоящему времени гиалуронидазы нашли широкое применение в качестве адъювантов в анестезиологии и в качестве лекарственных препаратов в офтальмологии, пульмонологии, дерматологии и косметологии. Согласно маркетинговым исследованиям (2018), около 65% препаратов на фармацевтическом рынке представляют собой гиалуронидазы животного происхождения, остальные — рекомбинантные формы белка [2]. Гиалуронидазы ракообразных изучены слабо, а сведения о гиалуронидазе камчатского краба отсутствуют. В нашей работе метод ЯМР-спектроскопии использовался для анализа продуктов реакции и изучения кинетики реакции расщепления гиалуроновой кислоты (ГК). Увеличение сигналов протонов ацетильной группы N-ацетил-D-глюкозамина в ГК (в диапазоне 2,08—2,02 м.д.) после ее обработки гомогенатом ГПКК свидетельствует о расщеплении ГК [3]. Более того, появление сигнала протона в области слабого поля (5,865 м.д.), где обычно наблюдается химический сдвиг протона H-4 при двойной связи ненасыщенных олигосахаридов, говорит о том, что гиалуронидаза ГПКК, как и бактериальные лиазы, расщепляет ГК по механизму  $\beta$ -элиминирования с образованием двойной связи в глюкуроновой кислоте на конце образующихся олигосахаридов ГК. Наблюдаемое с помощью ЯМР-спектроскопии расщепление ГК было подтверждено результатами зимографии. Образование двойной связи в продукте реакции расщепления ( $\beta$ -элиминирование) также было подтверждено спектрофотометрически по изменению поглощения реакционной смеси при 232 нм [2].

Липазы ракообразных также практически не изучены. В то же время, липазы широко используются при переработке жиров и масел, в составе моющих и обезжиривающих составов, в пищевой промышленности, в синтезе химикатов и фармацевтических препаратов, в производстве бумаги и косметики. Для большинства коммерческих применений липаз не требуется высокоочищенный фермент [4]. Надо отметить, что наряду с гиалуронидазой, коллагеназой и кератиназой, липаза входит в список наиболее используемых ферментов в эстетической медицине (PBSerum, Испания).

Методом  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии была исследована липолитическая активность гомогената ГПКК в отношении триацетина и каприл/капринового триглицерида. Нами было установлено, что гомогенат проявляет высокую ли-

политическую активность в отношении растворов триацетина в широком диапазоне pH и показывает умеренную активность в отношении эмульсии каприл/капринового триглицерида. В результате реакции происходило превращение триацилглицеринов в 1,2-диацилглицерин, а затем в 2-моноацилглицерин и 1-моноацилглицерин, который преобладал в продуктах реакции. Использование <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии позволило быстро на предварительном этапе установить, обладает ли исследуемый образец искомыми активностями, оценить динамику протекания гидролиза и охарактеризовать образующиеся продукты реакций.

Таким образом, ЯМР-спектроскопия дает возможность проводить скрининг ферментативной активности биологических объектов сложного состава.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Ponomareva T., Timchenko M., Filippov M., Lapaev S., Sogorin E.* Prospects of Red King Crab Hepatopancreas Processing: Fundamental and Applied Biochemistry // Recycling. 2021. 6. 3. <https://doi.org/10.3390/recycling6010003>
2. *Sliadovskii D., Ponomareva T., Molchanov M., Pozdnyakova-Filatova I., Timchenko M., Marchenkov V., Gusev O., Sogorin E.*  $\beta$ -elimination of hyaluronate by red king crab hyaluronidase // Sci Rep. 2021. Nov 19. 11(1):22600. doi: 10.1038/s41598-021-01890-3.
3. *Ponomareva T., Sliadovskii D., Timchenko M., Molchanov M., Timchenko A., Sogorin E.* The effect of hepatopancreas homogenate of the Red king crab on HA-based filler // PeerJ. 2020 Feb 12. 8:e8579. doi: 10.7717/peerj.8579. eCollection 2020.
4. *Timchenko M., Molchanov V., Molchanov M., Timchenko A., Sogorin E.* Investigation of lipolytic activity of the red king crab hepatopancreas homogenate by NMR spectroscopy // PeerJ. 2022. 10:e12742. doi:10.7717/peerj.12742.

### ВЛИЯНИЕ НАГРЕВА И КОНВЕКЦИИ НА ПРОЦЕСС ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

*Хижняк Е.П., Сирота Н.П., Кузнецова Е.А., Хижняк Л.Н., Сирота Т.В.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

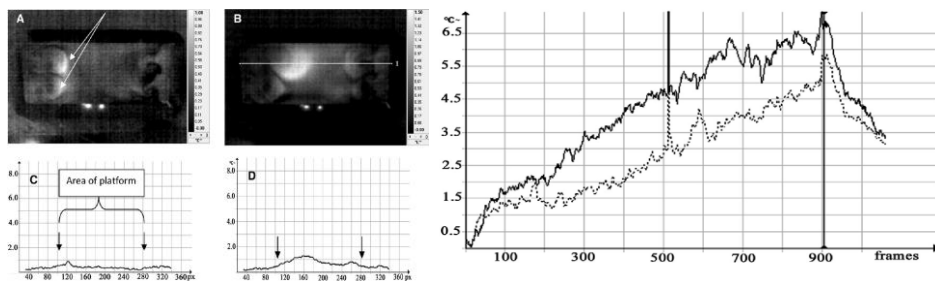
Электрофорез широко используется в целом ряде биологических исследований. Значительная вариабельность результатов исследований при идентичных протоколах экспериментов является одной из проблем данного метода. Неравномерный нагрев электрофоретического раствора и конвекция может быть одной из причин вариабельности результатов как при межлабораторных, так и внутрилабораторных исследованиях. Анализ литературы показывает, что большинство авторов указывают температуру раствора перед началом элек-

трофореза, и лишь в нескольких публикациях указывается температура во время электрофореза, измеренная с помощью термисторов. Измерить температуру в тонком слое электрофоретического раствора с помощью термисторов в процессе электрофореза достаточно сложно, так как в области термистора формируется неоднородность электрического поля и дополнительная теплоёмкость.

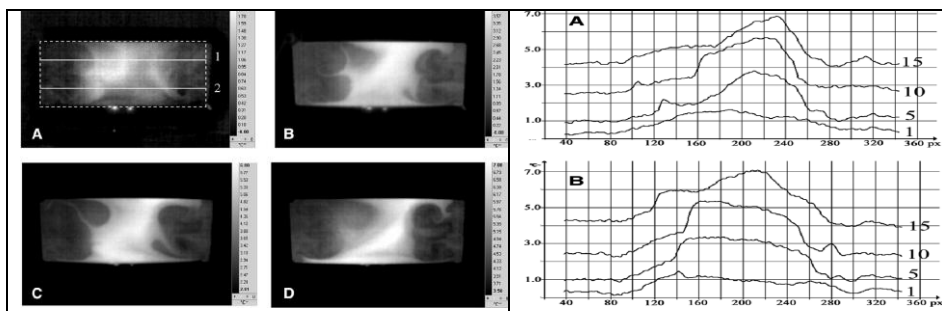
Инфракрасная термография является самым передовым методом бесконтактного измерения пространственного распределения температуры в реальном масштабе времени. Пространственное распределение температуры на поверхности электролитического раствора измеряли с помощью инфракрасной (ИК) камеры типа «JADE UC» (CEDIP, Франция) на спектральный диапазон 8—12 мкм с пространственным разрешением 384×288 и температурной чувствительностью 0,15 °С при 50 кадрах в секунду. ИК камера была откалибрована на температурный диапазон от 5 до 50 °С.

Эксперименты проводились при комнатной температуре с использованием электрофоретической камеры типа СЭ-1/С-1Н (Хеликон, Россия) с внутренним размером 22×7,5 см. Электрофоретическая камера была заполнена 250 мл щелочного раствора А (0,3 моль/л NaOH, 0,001 моль/л ЭДТА, pH > 13). Продолжительность электрофореза 15 минут при напряжении на электродах 27 вольт и токе 350—400 мА. Исследования проводились в условиях, идентичных к реальным условиям электрофореза.

Установлено, что процесс электрофореза сопровождается неравномерным повышением температуры в разных зонах электрофоретической камеры и конвекцией (рис. 1 и 2).



**Рис.1.** Пространственное распределение нагрева через 10 (А) и 30 (Б) секунд после начала электрофореза и соответствующие профили повышения температуры (С) и (D) по линии, указанной 1 в (Б). Стрелки в (А) указывают на расположение вихревых фронтов. Справа — динамика нагрева электрофоретического раствора. Ось X — время при скорости записи 1 кадр в секунду. Сплошная линия соответствует области с максимальным нагревом. Штриховая линия соответствует среднему нагреву, рассчитанному по всей площади раствора электрофоретической камеры



**Рис. 2.** Пространственное распределение нагрева через 1, 5, 10 и 15 минут после начала электрофореза (пунктирная линия указывает границы электрофоретической камеры), и профили повышения температуры вдоль верхней и нижней линии. Числа справа от кривых — время после начала электрофореза

Максимум нагрева на  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$  наблюдался в центральной части камеры при минимальном повышении температуры в других частях камеры около  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Первичный конвекционный вихрь возникает в результате газообразования на электродах, что приводит к развитию температурной неоднородности, простирающейся от электродов до области электрофоретической платформы (рис 1). Через 10 секунд после начала электрофореза максимальный нагрев в области вихревого фронта достигает  $0,88\text{ }^{\circ}\text{C}$  при среднем повышении температуры в растворе  $0,37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (рис. 1, А—D).

Через 30 секунд после начала электрофореза положение переднего фронта вихря достигает экспериментальных образцов на электрофоретической платформе. Максимальное приращение температуры в фронтальной области вихря достигает  $1,27\text{ }^{\circ}\text{C}$  при среднем приросте температуры  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Через 1 минуту после начала электрофореза и до его окончания положение максимума нагрева преобладает в центральной области электрофоретической камеры (рис. 2, А—D), при значительно меньшем нагреве в области конвективных вихрей. Точное положение максимума и конфигурация нагрева постоянно изменяются из-за влияния четырёх конвективных вихрей, формирующихся в области электродов, и конвекции из-за температурного градиента в области максимума нагрева.

После удаления электрофоретического раствора в конце электрофореза температура на поверхности слайдов была выше, чем на поверхности раствора.

### **Выводы.**

1. Неравномерность нагрева электрофоретического раствора и конвекция являются основными причинами, ответственными за вариабельность результатов как при межлабораторных, так и внутрилабораторных исследованиях.

2. Пространственное распределение нагрева зависит от размера и формы электрофоретической камеры.

3. Предсказать пространственное распределение нагрева в электрофоретических камерах других типов при наличии конвекции практически невозможно.

Результаты опубликованы в журнале *Electrophoresis*, 2021. 42. 1153—1157.

## **УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА КРЫС С ИСХОДНО РАЗНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К ДЕФИЦИТУ $O_2$ .**

*Хмиль Н.В., Павлик Л.Л., Успенко Н.И., Шигаева М.И., Агафонов А.В.,  
Миронова Г.Д.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики, РАН, Пущино, Россия  
*E-mail:* mironova40@mail.ru

На крысах, имеющих различную резистентность к дефициту кислорода, изучены ультраструктурные особенности митохондрий сердца, формирующие адаптацию этих животных к гипоксии. Работа проведена на двух фенотипах животных: высокоустойчивых к гипоксии — ВУ и низкоустойчивых — НУ. Ультраструктура митохондрий исследовались на микроскопе JEM 100-B (Япония). Подсчет митохондрий проводили при сканировании негативов стандартного размера, с использованием программы Image J. При исследовании ультраструктуры кардиомиоцита обычно, выделяют три типа митохондрий по их характеру локализации в клетке: межфибриллярные (МФ), субсарколемальные (СС) и околоядерные (пренуклеарные) (ОЯ).

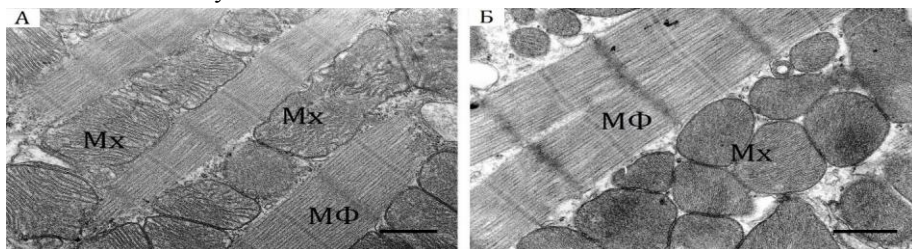
В работе установлено, что НУ и ВУ животные имеют исходные различия в структуре всех трёх типов митохондрии сердца, которые возможно обеспечивают характер резистентности этих животных к гипоксии.

МФ имеют, как правило, удлинённую или овальную форму и располагаются рядами между миофибриллами. СС могут иметь различную форму и находятся под мембранной кардиомиоцита в виде отдельных органелл или небольших их скоплений. ОЯ имеют круглую или овальную форму, как и межфибриллярные, но более мелкого размера и располагаются в норме в виде скоплений на полюсах ядра.

Проведенный анализ показал, что в норме МФ митохондрии обоих изучаемых фенотипов животных расположены четко вдоль рядов миофибрилл, имеют округлую или удлинённую форму и относительно упорядоченно расположенными кристами (рис. 1). Однако следует отметить, что кристы у кон-



трольных НУ животных, несколько менее упорядочены, чем у контрольных ВУ крыс (рис. 1). Установлено также, что МФ митохондрии НУ группы имеют матрикс средней плотности, в то время как в митохондриях ВУ группы матрикс был более электронно-плотным. Кроме того, если у НУ животных МФ митохондрии, как правило, располагаются в один ряд между миофибриллами, то у ВУ животных они часто, локализуются в 2 и более ряда между двумя миофибриллами. Среднее число МФ митохондрий в контроле у ВУ особей было выше, чем их число у НУ животных (таблица). Число мелких митохондрий также было выше у ВУ.



**Рис. 1.** Ультраструктура межфибрилярных митохондрий сердца при нормоксии у неустойчивых (А) и устойчивых (Б) к гипоксии крыс. МФ — миофибриллы, Мх — митохондрии. Var = 0.5 мкм

Таблица

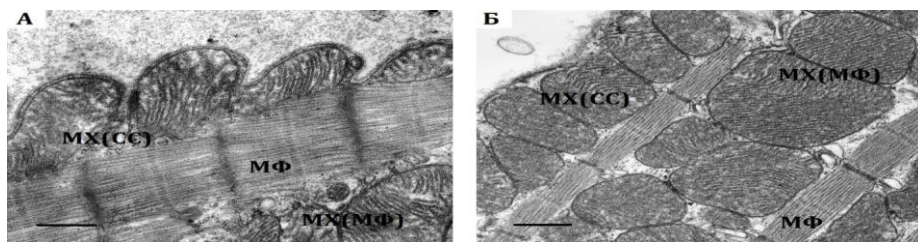
**Морфометрические характеристики трех видов митохондрий в миокарде у низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) крыс в условиях нормоксии**

Тип митохондрий	НУ, (ед/пластину)		ВУ, (ед/пластину)	
	Общ. кол-во мх	Ср.ч. мелких мх	Общ. кол-во мх	Ср.ч. мелких мх
МФ	11.30±2.85	1.41±0.97	16.04±4.65	2.48±1.47
СС	10.94±2.25	1.92±0.86	8.65±3.14	1.36±0.69
ОЯ	18.00±3.31	6.60±1.67	28.80±5.82*	15.92±3.96*

$m \pm SD$ , \* — различия между группами достоверны,  $p < 0.05$ . Число МФ и СС митохондрий считали в ед/пластину (24 мкм<sup>2</sup>) при увеличении микроскопа ( $\times 25000$ ), число ОЯ митохондрий считали на всей площади вокруг ядра при малом увеличении микроскопа ( $\times 5000$ ).

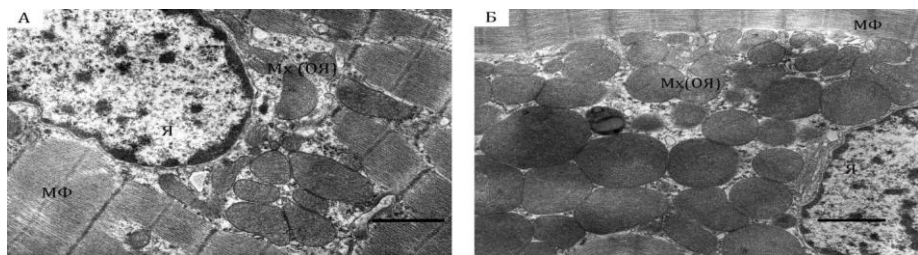
СС митохондрии в обеих группах животных имели присущую для этой субпопуляции округлую или неправильно-округлую форму, матрикс средней электронной плотности и упорядоченно расположенные кристы. Для НУ животных характерным было расположение по одной органелле в инвагинациях сарколеммельной мембраны, что придавало мембране извитой вид (рис. 2, А). Среднее число митохондрий составляло: 8,7 и 11,0 ед/пластину (таблица) для

ВУ и НУ животных соответственно. Доля мелких митохондрий среди учтенных органелл у обоих типов животных составляла в среднем 10—20% от общего количества.



**Рис. 2.** Ультраструктура субсарколеммальных митохондрий сердца при нормоксии у неустойчивых (А) и устойчивых (Б) к гипоксии крыс. Усл. обозначения: МФ — миофибриллы, Мх — митохондрии. Var = 0.5 мкм

ОЯ митохондрии в обеих группах животных при нормоксии имели характерное расположение по полюсам ядра (рис. 3), а сами ядра располагались в середине клетки. Средняя плотность ОЯ органелл, учтенных по всей площади вокруг ядра, ограниченной миофибриллами, была в пределах 18.44 ед/пластину у НУ и 24.67 ед/пластину у ВУ (таблица). При этом среднее число мелких митохондрий было более чем в 2 раза больше у ВУ крыс. Так как малые митохондрии являются более функционально активными, то их большее количество у ВУ животных является признаком их повышенной устойчивости.



**Рис. 3.** Ультраструктура участка миокарда левого желудочка в околядерной зоне при нормоксии у неустойчивых (А) и устойчивых (Б) к гипоксии крыс. Условные обозначения: Я — ядро, МФ — миофибриллы, Мх — митохондрии, Var = 1 мкм

Таким образом, выявлены фенотипические различия в ультраструктуре трех типов митохондрий сердца НУ и ВУ к гипоксии животных. Сниженная плотность матрикса, менее плотная упаковка крист и меньшее общее количество и количество малых митохондрий в МФ и ОЯ типе, также как харак-

тер расположения митохондрий и конфигурации сарколеммы по отношению к ним в субсарколеммальной зоне у НУ животных, по сравнению с ВУ, по всей видимости, определяют сниженную у НУ крыс устойчивость к гипоксии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-015-00029 А.

## **МОДУЛЯЦИЯ УРИДИНОМ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС**

*Хундерякова Н.В.<sup>1</sup>, Медведева В.П.<sup>2</sup>, Мосенцов А.А.<sup>1</sup>, Белослудцева Н.В.<sup>1,2</sup>,  
Хмель Н.В.<sup>1</sup>, Миронова Г.Д.<sup>1,2</sup>*

- <sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;
- <sup>2</sup> Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия

Болезнь Паркинсона (БП) — второе по частоте (после болезни Альцгеймера) нейродегенеративное заболевание позднего возраста, которое встречается во всех популяциях мира и имеет распространенность от 2 до 4% среди лиц старше 65 лет. Известно, что одним из путей развития БП является нарушение энергетического обмена в виде дефицита комплекса I дыхательной цепи митохондрий (NADH-CoQ-редуктазы) в нейронах черной субстанции, что приводит к системному нарушению окислительного фосфорилирования и развитию окислительного стресса в митохондриях других тканей — в тромбоцитах, лимфоцитах, мышцах. Многочисленными исследованиями установлено, что ингибирование этого комплекса ротеноном (Р) вызывает нигростриальную дегенерацию и при этом у животного появляются характерные признаки БП. В связи с этим введение Р используют для моделирования БП. Ранее, работами нашей лаборатории было установлено, что введение животным Уридина (У), предшественника уридиндифосфата — активатора митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала (митоK<sub>АТФ</sub>), эффективно защищает ткани от гипоксического повреждения при окислительном стрессе. [1]. Поэтому в настоящей работе была предпринята попытка использования Уридина для коррекции патологических изменений в тканях крыс, вызванных введением крысам Р.

**Актуальность** поиска средств профилактики и лечения БП определяется высоким социально-экономическим бременем заболевания БП на общество и

отсутствием эффективных средств лечения и профилактики этого грозного заболевания.

**Целью** нашей работы было проведение комплексного исследования: активности ключевого фермента дыхания митохондрий сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и гликолиза в цитозоле лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в лимфоцитах крови, морфометрического анализа лимфоцитов крови, а также уровня продуктов перекисного окисления (МДА) в сыворотке крови на классической модели БП индуцированной Ротеноном (Р). Целью работы была также проверка возможности коррекции этих изменений при использовании Уридина, а также проведение ингибиторного анализа, для доказательства молекулярного механизма действия Уридина

**Материалы и методы.** Для моделирования БП использовались самцы-крысы линии Wistar, весом 280—300 г. Животных разделили на 4 группы: 1) контроль, 2) подкожное введение Р в дозе 1.7 мг/кг веса 3) Р+У, введённый внутривентриально в дозе 30 мг/кг веса, 4) Р + У + 5 — гидроксидеканонат (5-ГД) 5 мг/кг веса, используемый в качестве селективного ингибитора митоK<sub>ATФ</sub> канала. Препараты вводились с периодичностью 2 дня введение /2 дня перерыв, Продолжительность эксперимента — 24 дня. Активность СДГ и ЛДГ определяли цитобиохимическим методом [2] в иммобилизованных на стекле лимфоцитах крови. Морфометрический анализ лимфоцитов проводили с помощью разработанной программы Cell Composer. Количество малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови у крыс определяли с помощью диагностического набора «ГБК-АГАТ». Животные были выведены из эксперимента путём декапитации, с последующим забором крови в утренние часы.

**Результаты.** Введение в организм крыс Р для моделирования БП привело к достоверному увеличению в 2 раза активности СДГ, а также небольшого, но статистически достоверного на 66% увеличения цитозольной активности ЛДГ (см. таблицу). Из таблицы видно что, у больных крыс Уридин снижает гиперактивацию СДГ до близких значений контрольной группы, а блокатор мито K<sub>ATФ</sub> канала — 5 ГД снимает положительный эффект Уридина в митохондриях лимфоцитов.

Результаты измерения радиуса лимфоцитов, без деления их на субпопуляции, отражены в таб. Размах вариативности размеров клеток иммунной системы на фоне индуцированной патологии БП был шире, чем у контрольных животных. Различия между 1-й и 2-й группой 25%, на фоне введения Уридина между 1-й и 3-й группой ширина распределения лимфоцитов по радиусу сокращалась до 20% от контроля.

**Динамика цитоморфологических показателей митохондриальной и цитоплазматической активности ферментов у крыс с БП на фоне лечения Уридином**

<i>Группы крыс</i>	<i>Актив. СДГ (кол-во диформазана у.е.)</i>	<i>Актив. ЛДГ (кол-во диформазана у.е.)</i>	<i>Средний Радиус лимф. <math>\mu\text{m}^2</math> СДГ</i>	<i>Средний Радиус лимф. <math>\mu\text{m}^2</math> ЛДГ</i>
1. Контроль	0,076 ± 0,02	0,12 ± 0,07	0,66 ± 0,05	0,64 ± 0,04
2. Ротенон (1,7) мг/кг веса	0,127 ± 0,02*	0,20 ± 0,02*	0,76 ± 0,05	0,80 ± 0,04*
3.Ротенон(1,7) + Уридин 30 мг/кг веса	0,085 ± 0,01**	0,14 ± 0,07	0,69 ± 0,01	0,77 ± 0,04*
4. Р(1,7) + У(30) + 5ГД (5) мг/кг веса	0,126 ± 0,03*	0,15 ± 0,08	0,73 ± 0,07	0,74 ± 0,04

*Примечание.* В таблице приведены средние значения по группе ±SD, \*P≤0,05, в соответствии с одновозрастной группой контроля, а также приведены средние значения по группе ±SD \*\*P≤0,05 в соответствии с группой Ротенон.

В работе также обнаружено, что концентрация ПОЛ в сыворотке крови почти в 2 раза выше у крыс с БП (значение 7,68 ммоль/л), чем в контроле (4,4 ммоль/л \*P≤0,05). Установлено также, что Уридин снижает ПОЛ у крыс с БП до значения 2,72 ммоль/л, а 5ГД — снижает положительный эффект Уридина до 5,46 ммоль/л.

В результате корреляционного анализа было установлено, что в исследованных группах крыс БП имеется тесная корреляционная связь активности СДГ в лимфоцитах с ПОЛ в сыворотке с высоким коэффициентом корреляции  $r=0,79$ .

Измерение массы тела опытных крыс показало что, в процессе эксперимента крысы с БП теряли вес по сравнению с контролем на 20%, а Уридин его восстанавливал.

**Выводы.** Полученные в ходе проведенного нами цитобиохимического исследования в лимфоцитах крови данные, свидетельствуют о дисфункции митохондрий при экспериментальном БП. Степень изменения цитоморфометрических параметров активности митохондриальных ферментов у исследуемых крыс достоверно коррелирует с уровнем ПОЛ. Ингибиторный анализ показал, что механизм действия Уридина связан с активацией митоK<sub>АТФ</sub>. Положительная динамика цитобиохимических показателей после курса лечения Уридином

подтверждает, показанную нами ранее принципиальную возможность коррекции имеющихся при БП системных нарушений энергетического обмена на основе использования Уридина, как активатора митоK<sub>ATФ</sub> канала [1].

#### ЛИТЕРАТУРА

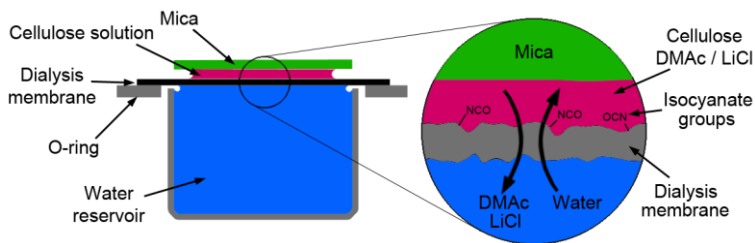
1. Krylova I.B., Bulion V.V., Selina E.N., Mironova G.D., Sapronov N.S. Effect of uridine on energy metabolism, LPO, and antioxidant system in the myocardium under conditions of acute coronary insufficiency // Bull. Exp. Biol. Med. 2012. 153(5):644—646. doi: 10.1007/s10517-012-1787-4.
2. Хундерякова Н.В., Ячкула Т.В., Захарченко М.В., Плясунова С.А., Сухоруков В.С., Баранич Т.И., Федотчева Н.И., Литвинова Е.Г., Шварцбург П.М., Кондрашова М.Н. Высокочувствительный неповреждающий способ выявления состояния митохондрий в организме путем их исследования внутри лимфоцитов крови на мазке. Выявление больших различий при лейкозах и миопатиях у больных детей по сравнению со здоровыми // Медицинский Алфавит. 2017. 20 (317), Современная Лаборатория. Т. 2, С. 27—30. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (20-015-00029-а).

### СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОАНАЛИЗА НА НИЗКОАДГЕЗИВНЫХ ПОВЕРХНОСТЯХ

Шляпников Ю.М., Малахова Е.А., Канев И.Л., Шляпникова Е.А.

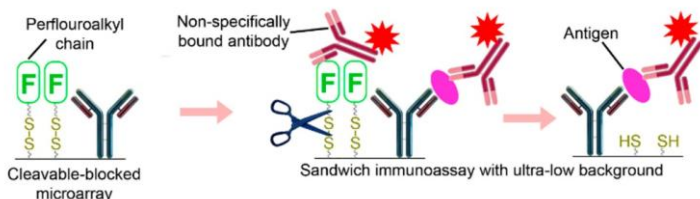
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия  
E-mail: yuri.shlyapnikov@gmail.com

Ранее мы показали, что предварительное электрофоретическое разделение смеси белков в тонком проводящем слое, образованном соприкасающимися целлюлозными мембранами в отсутствие ПААГ, значительно повышает чувствительность иммуноанализа. Однако при использовании коммерческой диализной мембраны подвижность белков во время электрофореза уменьшается и становится плохо воспроизводимой. Было предположено, что основной причиной является наличие неровностей на поверхности, которые по данным АСМ имеют глубину ~100 нм и в которые попадают белковые молекулы. Для получения мембраны с ровной поверхностью на нее высаживали лакирующий слой целлюлозы толщиной ~1 мкм из раствора в DMAc/LiCl (рис.1). Для улучшения адгезии мембрану предварительно обрабатывали диизоцианатным кросс-линкером, чтобы сшить целлюлозные цепи. Наблюдаемая гранулярность слоя после выравнивания составила, по данным АСМ, 5—10 нм, что сравнимо с размером белковых молекул. Показано, что такая обработка значительно улучшает воспроизводимость электрофоретического разделения и в целом повышает чувствительность иммуноблота.



**Рис. 1.** Процедура выравнивания поверхности диализной мембраны

Общей проблемой иммуноанализа на микрочипах является неспецифическое связывание. Для её решения мы использовали обратимую блокировку поверхности микрочипа из регенерированной целлюлозы с помощью синтезированного нами агента, содержащего перфторалкильные цепи и дисульфидный линкер. Стоит отметить, что в силу уникальных свойств перфторалкильных цепей, связанной с высокой полярностью связи C-F, получающаяся гидрофобная поверхность обладает низкой адгезией. Перед процедурой детекции сигнала с помощью магнитных частиц дисульфидные связи химически расщепляются и полимерные цепи удаляются вместе со неспецифически связанными белками, что приводит к экстремально низкому значению фона. При использовании флуоресцентной детекции показано 30-кратное увеличение отношения сигнал/фон по сравнению с обычными эпокси-модифицированными стеклянными слайдами. Комбинация этой методики с детекцией сигнала с помощью магнитных частиц приводит к ультравысокочувствительному иммуноанализу белковых биомаркеров. Так, предел детектирования холерного токсина составляет 1 фМ. Такая высокая чувствительность на несколько порядков превышает чувствительность традиционных методов иммуноанализа, таких как ИФА и Вестерн-блот.



**Рис. 2.** Схема иммуноанализа на микрочипах с обратимой блокировкой поверхности

#### ЛИТЕРАТУРА

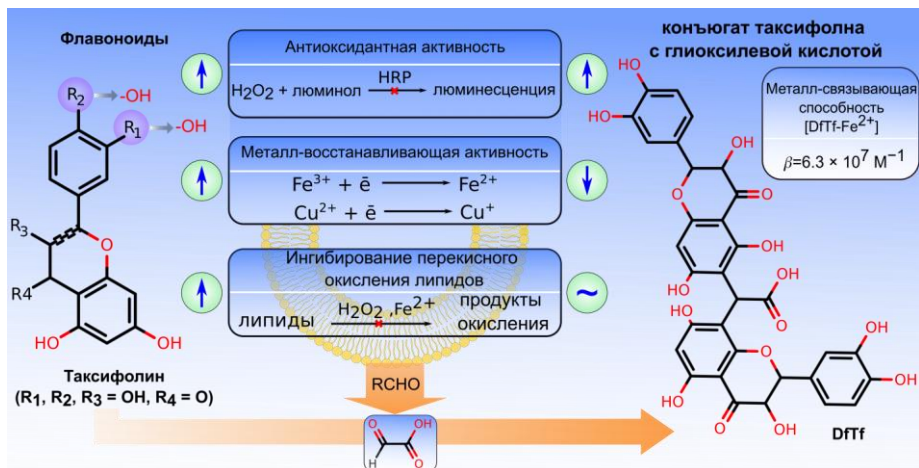
Shlyapnikov Y.M., Malakhova E.A., Shlyapnikova E.A. Improving immunoassay performance with cleavable blocking of microarrays // Anal. Chem. 2021.93(2). 1126—1134.

# СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ РЯДА ФЛАВОНОИДОВ И КОНЬЮГАТА ТАКСИФОЛИНА С ГЛИОКСАЛЕВОЙ КИСЛОТОЙ

Шубина В.С., Козина В.И., Шаталин Ю.В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия  
E-mail: yury.shatalin@yandex.ru

Полифенолы являются одним из наиболее распространенных и многочисленных классов соединений растительного происхождения. Данные соединения участвуют в разнообразных процессах роста и развития растений, также в защите растений от неблагоприятных факторов окружающей среды [1, 2]. Более чем 8000 соединений содержат в своей структуре фенольный фрагмент, и более чем 4000 из них относятся к классу флавоноидов [3]. В природе полифенолы встречаются в виде мономеров, олигомеров и полимеров (проантоцианидины, конденсированные танины). Существуют также свидетельства того, что в процессе хранения и созревания продуктов питания и напитков с высоким содержанием флавоноидов происходит конденсация последних с карбонильными соединениями, такими как ацетальдегид, метилглиоксаль, глиоксалева кислота и фурфурол, в результате которой образуются мономерные аддукты, олигомеры и полимеры.



Наши результаты [4] демонстрируют, что кверцетин, таксифолин, катехин и эриодиктиол, соединения, содержащие катехольную группу, проявляют большую антиоксидантную активность, чем гесперетин и нарингенин. Продукт конденсации таксифолина с глиоксалева кислотой содержит в своей структуре два ка-



техольных фрагмента. При этом, относительная эффективность данного соединения в различных системах отлична. Продукт проявляет наибольшую улавливающую активность по отношению к пероксиду водорода, меньшую металл-восстанавливающую и большую железо-связывающую активности, чем катехол-содержащие флавоноиды (продукт конкурирует за связывание ионов железа с феррозином), активность по ингибированию перекисного окисления липидов сопоставимую с таксифолином. В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что конденсация флавоноидов с токсичными карбонильными соединениями приводит не только к утилизации последних, но и к формированию продуктов, проявляющих высокую антиоксидантную активность, и, возможно, способных улавливать дополнительные молекулы карбонильных соединений.

В свою очередь, свойства исходных флавоноидов и продуктов, как и условия, в которых они проявляют максимальную антиоксидантную активность, могут отличаться. Таким образом, когда протекают данные реакции, изменяется состав и антиоксидантный профиль полифенольной фракции. Кроме того, биодоступность полифенолов и карбонильных соединений, участвующих в данных реакциях, а также компонентов пищи таких как минералы (за счет металл-связывающих свойств продуктов) может быть изменена.

Результаты исследования подробно описаны в публикации журнала *Antioxidants* [4].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Mathesius U.* Flavonoid functions in plants and their interactions with other organisms. *Plants*. 2018. 7. 30.
2. *Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдраимов Б.С., Музафаров Е.Н.* Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. — Пушино : Synchronbook. 2013. 310 с.
3. *Tsao R.* Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols // *Nutrients*. 2010. 2. 1231—1246.
4. *Shubina V.S., Kozina V.I., Shatalin Y.V.* Comparison of Antioxidant Properties of a Conjugate of Taxifolin with Glyoxylic Acid and Selected Flavonoids // *Antioxidants*. 2021. 10. 1262. <https://doi.org/10.3390/antiox10081262>.