

АТФазная активность составляла $5,60 \pm 0,15$ и $5,45 \pm 0,17$ мкмоль $P_i \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$ *in vitro* и *in vivo* соответственно, при контрольной активности $7,85 \pm 1,07$ мкмоль $P_i \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$. В то время как присутствие ивермектина снижало активность до $6,15 \pm 0,25$ и $5,54 \pm 0,4$ мкмоль $P_i \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$ *in vitro* и *in vivo*, соответственно. Десятикратное увеличение концентрации препаратов вызвало снижение активности *in vitro* и *in vivo* на $59,87 \pm 0,55\%$ и $72,06 \pm 0,75\%$ при наличии авермектина и на $48,89 \pm 0,34\%$ и $54,55 \pm 0,50\%$, при наличии ивермектина, соответственно.

ОКИСЛЕННЫЙ ГЛУТАТИОН И ПРЕПАРАТ ГЛУТОКСИМ ИМИТИРУЮТ ЭФФЕКТ ИНСУЛИНА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Бутов С.Н., Рошина Н.Г., Антонов В.Г.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург (Россия).

E-mail: simelnitsky@hotmail.ru

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов трансэпителиального транспорта веществ. Известно, что инсулин стимулирует транспорт Na^+ через мембраны эпителиальных клеток амфибий. Стимулирующее влияние инсулина инициируется связыванием гормона с рецептором, принадлежащим к суперсемейству рецепторов, имеющих собственную тирозинкиназную активность. Ранее нами показано, что регуляторное действие инсулина на транспорт Na^+ в коже лягушки зависит от активности тирозинкиназ и тирозинфосфатаз и осуществляется при участии фосфатидилинозитолкиназ.

С помощью метода фиксации потенциала исследовано влияние тиол-модифицирующих агентов – окисленного глутатиона (GSSG) и его синтетического аналога препарата глутоксим на транспорт Na^+ в коже лягушки *Rana temporaria*. Впервые показано, что добавление GSSG и глутоксима со стороны базолатеральной поверхности кожи лягушки вызывает увеличение транспорта Na^+ , сходное с влиянием инсулина на трансэпителиальный транспорт Na^+ . Обнаружено также, что предварительная обработка кожи лягушки блокатором тирозинкиназ генестейном или структурно различными ингибиторами фосфатидилинозитол-3- и фосфатидилинозитол-4-киназ – вертманнином и LY294002, существенно снижает стимулирующее действие GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки.

Полученные данные позволяют предположить, что стимулирующее действие GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки обусловлено взаимодействием этих агентов с богатыми цистеином доменами рецептора инсулина, что приводит к трансактивации рецептора инсулина и стимуляции транспорта Na^+ .

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ НОСИТЕЛЕЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ПРИМЕРЕ ФОСФОЛИПИД-АНТИОКСИДАНТНОГО НАНОКОМПЛЕКСА, СОДЕРЖАЩЕГО ДИГИДРОКВЕРЦЕТИН

Наумов А.А., Шаталин Ю.В., Поцелуева М.М.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино (Россия).

E-mail: exzikutor@rambler.ru

В последнее время весьма актуально использование в качестве носителей лекарственных средств изолированных микро- и наносистем, таких как липосомы, капсулы, микрогранулы и др. В данной работе разрабатывались подходы к исследованию антиоксидантных и антирадикальных свойств микро- и нано- частиц.

Объектом исследования являлись антиоксидант/фосфолипидные наноконплексы (липосомы), содержащие в своем составе дигидрокверцетин ДГК в концентрации от 0,001 мг/мл до 10 мг/мл. Препараты предоставлены научной компанией "Фламена".

Для определения антирадикальной составляющей активности препаратов использован метод люминолзависимой хемилюминесценции, где в качестве источника супероксиданиона были использованы две различные системы: ферментативная система – ксантин-ксантиоксидаза и неферментативная – феназинметосульфат-НАДН. Данными методами были исследованы антирадикальные свойства препаратов в зависимости от содержания в их составе ДГК. Используемые системы имеют ряд преимуществ над обычно используемой в антиоксидантных исследованиях биохимической модели, основанной на ферментативном разложении перекиси водорода, так как пероксид водорода также может участвовать во взаимодействии с исследуемыми образцами.

В ходе работы была определена оптимальная концентрация липосомальных частиц ($10^{-3}\%$) при которой рассеивание излучения было минимальным. Показано, что образцы, содержащие липосомы, содержащие более 1 мг/мл ДГК, показывают ярко выраженные антирадикальные свойства ~ 0.6 отн.ед. (отношение констант скоростей реакций в присутствии исследуемого образца к контролю). Образцы, содержащие от 0,01 до 0,1 мг/мл ДГК, напротив, демонстрировали прооксидантный эффект.

Был также разработан подход к исследованию антиоксидантной активности липосом по отношению к H_2O_2 основанной на измерении скорости разложения образцами растворов перекиси водорода с люминолзависимым хемилюминесцентным контролем кинетики данного процесса. Было установлено, что ярко выраженный антиоксидантный эффект ~ 0.6 отн.ед. проявляли только препараты, содержащие в своём составе не менее 4 мг/мл ДГК, в то время как остальные – не проявляли активности по отношению к перекиси водорода.

Работа поддержана проектом по заданию Рособразования № 1.4.08.

ИНДУКЦИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

НЕЙРОБЛАСТОМЫ МЫШИ ПОД ВЛИЯНИЕМ

АНТИОКСИДАНТ/ФОСФОЛИПИДНОГО НАНОКОМПЛЕКСА “ФЛАМЕНА”

Мякшцева С.Н.¹, Наумов А.А.², Шаталин Ю.В.², Попелуева М.М.²

¹Институт биофизики клетки РАН, Пушкино (Россия),

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино (Россия).

E-mail: exzikutor@rambler.ru

Изучали влияние антиоксидант/фосфолипидного наноконплекса (“Фламена”) (антиоксидант/фосфолипидный наноконплекс “Фламена” разработан научной компанией “Фламена”), содержащего мембранообразующий липид фосфотидилхолин, флавоноид дигидрокверцетин (ДГК) и аминокислоту глицин, на индукцию морфологической дифференцировки клеток нейробластомы мыши N1E-115.

При исследовании действия наноконплексов (липосом) с концентрацией ДГК 3×10^{-4} – 3×10^{-8} М в среде было обнаружено, что при высоких концентрациях ДГК (3×10^{-4} М и 13×10^{-5} М) происходила гибель клеток на 2-3 сутки культивирования. Снижение концентрации ДГК до 3×10^{-5} – 3×10^{-8} М вызывало торможение клеточного деления на 30-45% и появление клеток с длинными аксоноподобными отростками. Наибольшее количество дифференцированных клеток (до 20-25%) наблюдалось на 3-4 сутки после добавления препарата с концентрацией ДГК 3×10^{-7} – 3×10^{-6} М. В качестве контроля использовали: 1) среду без препаратов и 2) с добавлением препарата с липосомами без ДГК. В контроле 1 наблюдали отсутствие дифференцировки, перерастание культуры и гибель на 4 сутки культивирования. В контроле 2 происходило торможение клеточной пролиферации на 30-35% и появление дифференцированных клеток, число которых составило не более 10-15%. Обновление среды через 4 суток приводило к сохранению жизнеспособности клеток в течение 19 дней в среде с концентрацией липосомной формы ДГК от 1×10^{-7} М до 3×10^{-8} М и с липосомами без ДГК.

Таким образом, антиоксидант/фосфолипидный наноконплекс (“Фламена”) с концентрацией ДГК от 3×10^{-6} М до 3×10^{-8} М способствует дифференцировке и увеличению жизни клеток нейробластомы мыши *in vitro* в 2-4 раза.

Работа поддержана грантом Рособразования, номер НИР 1.4.08.

состояний для белка, обладающего одним тепловым переходом и способного связывать два типа лигандов конкурентным способом, в пространстве параметров "концентрация одного из лигандов" - температура в условиях фиксированной концентрации второго лиганда. Разработанный метод успешно применен для описания металл-связывающих свойств двух гомологичных кальцийсвязывающих белков: коровьего б-лактальбумина и лошадиного лизоцима. Показано, что ионы кальция и магния конкурируют между собой за один и тот же центр связывания б-лактальбумина, тогда как лизоцим обладает, по меньшей мере, одним дополнительным центром связывания катионов. Построена и подтверждена экспериментально фазовая диаграмма б-лактальбумина по кальцию в присутствии физиологической концентрации ионов магния. Таким образом, применение метода фазовых диаграмм позволяет количественно и качественно изучать конкурентное связывание лигандов белками.

РОЛЬ ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ И СИСТЕМЫ СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ В ОТВЕТАХ ОРГАНИЗМА НА ВОЗДЕЙСТВИЕ СВЕРХСЛАБЫХ НЕИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

Хренов М.О.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино (Россия).

E-mail: xrehob2004@mail.ru

Изучали воздействие *in vivo* и *in vitro* низкоинтенсивных неионизирующих излучений (ЭМИ СВЧ и красного лазерного света) на систему защитных белков, а также двух каскадов сигнальной трансдукции – NF-κB и стресс-активируемую киназу SAPK/JNK. Показали, что как однократное, так и пролонгированное воздействие ЭМИ СВЧ и лазерного света на мышеч-самцов линии NMRI стимулировало продукцию цитокинов в перитонеальных макрофагах и в лимфоцитах селезенки, а также вызывало увеличение концентрации цитокинов в сыворотке крови. Кроме того, наблюдали увеличение экспрессии белков теплового шока в лимфоцитах селезенки мышей как при действии ЭМИ СВЧ, так и при облучении лазерным светом. Это дало основание полагать, что в основе стимуляции продукции данных белков лежит экспрессия соответствующих генов, вызванная активацией сигнальных путей клетки. Оценка экспрессии белков сигнального каскада NF-κB (NF-κB, фосфо-NF-κB и регуляторного белка IκB-β), а также SAPK/JNK при облучении изолированных лимфоцитов и животных *in vivo* показала активацию сигнальных каскадов NF-κB и SAPK/JNK при воздействии ЭМИ СВЧ. Облучение красным лазерным светом активировало сигнальный каскад SAPK/JNK, но не вызывало активации белков каскада NF-κB. Более того, при воздействии лазерного света наблюдали ингибирование продукции NF-κB и белка IκB-β.

Полученные данные показывают, что одним из ключевых механизмов воздействия низкоинтенсивных ЭМИ СВЧ на клетки иммунной системы является активация продукции защитных белков и двух исследованных каскадов системы сигнальной трансдукции. Воздействие лазерного света вызывает стимуляцию только одного из сигнальных каскадов, а именно, стресс-активируемой киназы SAPK/JNK. Результаты работы доказывают стрессовый характер воздействия неионизирующих излучений малой интенсивности на живые системы.

ИЗМЕНЕНИЕ КИСЛОТНО-ОСНОВНЫХ СВОЙСТВ ЛИПОСОМ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА В ПРОЦЕССЕ ИХ ОКИСЛЕНИЯ

Шмарев А.С.¹, Наумов А.А.², Поцелуева М.М.², Шаталин Ю.В.²

¹Пензенский государственный педагогический университет, Пенза (Россия),

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино (Россия).

E-mail: it@rambler.ru

Одной из основных проблем, с которой сталкиваются при использовании в качестве наноконтейнеров липосом, является процесс их окисления. Подобный процесс сопровождается

рядом химических реакций с образованием диенов, моно- и дикарбонильных соединений (малоновый диальдегид), а так же образованием карбоксильных групп. Все это приводит к закислению среды как во вне-, так и внутри- липосомальном пространстве. Увеличение количества непредельных группировок приводит к увеличению жесткости мембраны и может приводить к нарушению её целостности. В связи с этим является актуальным исследование процесса окисления липосом и возможность стабилизировать процесс окисления введенного известного антиоксиданта - дигидрохверцетина (ДГК).

В задачу данного исследования входила оценка изменений концентрации $[H^+]$ в липосомальном окружении препарата с различным содержанием ДГК.

В качестве объекта изучения были использованы липосомы полученные на основе яичного лецитина с фиксированным содержанием ДГК от 10^{-3} г/л до 10 г/л.

В ходе исследования было определено, что при концентрации ДГК в липосомах 1 мг/л pH 10 мг/л значение pH снижается с большей скоростью чем в контроле. Это говорит о наличии процесса окисления липидов в присутствии ДГК. Интересно отметить, что в области концентраций ДГК от 30 мг/л до 0,8 г/л отмечается процесс сильного смещения pH в щелочную область, что позволяет предположить наличие равновесия: липид \rightarrow карбонильное соединение \rightarrow конъюгат с ДГК. Подобное равновесие вполне возможно при наличии реакции нуклеофильного присоединения ДГК к карбонильным соединениям, предотвращая тем самым дальнейшее окисление этой группы и закисление среды. Подобный подход изучения кислотности основного равновесия в процессе окисления липосомального препарата можно использовать для характеристики коммерческих препаратов, а липосомы с определенным содержанием ДГК могут быть использованы при изготовлении лекарственных препаратов, для которых является значимым изменение pH в процессе окисления.

Антиоксидант/фосфолипидный наноконкомплекс ("Фламена") разработан научной компанией "Фламена".

Работа поддержана грантом Рособразования, номер НИР 1.4.08.

ОБРАЗОВАНИЕ ДОЛГОЖИВУЩИХ РАДИКАЛОВ БЕЛКА И АМИНОКИСЛОТ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ИХ ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ

Гудков С.В.¹, Штаркман И.Н.¹, Карп О.Э.¹, Гармаш С.А.^{1,2}, Брусков В.И.¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино (Россия),

²Пушкинский государственный университет, Пушкино (Россия).

E-mail: S_makariy@rambler.ru

Недавно методом ЭПР установлено, что при воздействии ионизирующего излучения образуются долгоживущие радикалы белка (ДЖРБ), с временами полужизни 20 и более часов. Показано, что ДЖРБ являются источниками продолжительного протекания окислительного стресса и посредниками в переносе окислительных повреждений на другие биологические молекулы. Для исследования ДЖРБ использован метод измерения собственной хемиллюминесценции белковых растворов, индуцированной рентгеновским излучением, на хемиллюминесцентном приборе Биотокс-7А (Россия) *in vitro*. Время полужизни радикалов белка по измерению хемиллюминесценции овальбумина и бычьего сывороточного альбумина составляло около 5 ч. Показано, что аминокислоты метионин, фенилаланин и треонин так же образуют долгоживущие радикалы. Методом иммуноферментного анализа исследовано образование 8-оксогуанина в ДНК *in vitro* под воздействием облученного в дозе 7 Гр овальбумина. Инкубация облученного в дозе 7 Гр белка в течение 2,5 ч с ДНК приводит к образованию 8-оксогуанина в ДНК, которое составляет около 50% от величины этого повреждения при воздействии рентгеновского облучения на ДНК в той же дозе. Установлено, что ДЖРБ проявляют генотоксические свойства и *in vivo*. Так введение крысам облученного в дозе 100 Гр крысиного сывороточного альбумина приводит к увеличению количества полихроматофильных эритроцитов содержащих микроядра в 2,5 раза. Таким образом, установлено, что ДЖРБ

соответствующий максимуму флуоресценции FITC в растворе. Значение внеклеточного pH стебля проростков тыквы в состоянии покоя составило $5,7 \pm 0,8$ единиц pH.

Высокая скорость получения спектров (1 с) позволяет количественно определять изменения внеклеточного значения pH при действии различных раздражителей.

НАКОПЛЕНИЕ ТБК-АКТИВНЫХ ПРОДУКТОВ В ПРОЦЕССЕ ОКИСЛЕНИЯ ЛИПОСОМ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА

Автонова О.Ю.¹, Наумов А.А.², Поцелуева М.М.², Шаталов Ю.В.²

¹Пушкинский государственный университет, Пушкино (Россия),

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино (Россия).

E-mail: it@rambler.ru

В процессе хранения липосомальных препаратов наблюдается накопление в них карбонильных соединений, которые, как известно, являются ТБК-активными продуктами. Подобные соединения образуются при реакции ненасыщенных групп липидов с кислородом воздуха или пероксидами. В связи с этим актуальным является изучение накопления ТБК-активных продуктов в процессе окисления липосом и способность ингибировать процесс их накопления с помощью антиоксидантов. Задачей данного исследования являлось определение динамики накопления ТБК-активных продуктов в липосомальном препарате с различным содержанием ДГК. В качестве объекта изучения были использованы липосомы полученные на основе яичного лецитина с фиксированным содержанием ДГК от 10^{-3} г/л до 10 г/л (антиоксидант/фосфолипидный наноконкомплекс ("Фламена") разработан научной компанией "Фламена"). Основным методом исследования являлось определение поглощения окрашенных продуктов ТБК-карбонильное соединение при 532 нм (ТБК-малоновый диальдегид (МДА)), 510 нм и 490 нм (ТБК-монокарбонильными соединениями (МКС)). В процессе окисления липосом кислородом воздуха обнаружено, что концентрация МДА и МКС ниже, чем при обработке образца пероксидом водорода, примерно в 1,5-2 раза и в 5 раз соответственно. Данный факт говорит, что под действием кислорода, наблюдается более интенсивное образование МДА, а под действием пероксидов – моноальдегидов. Без дополнительно введения в суспензию липосом H_2O_2 , наблюдается снижение образующихся МКС (альдегидов), а так же наблюдается дозависимый эффект ингибирования окисления липосом в диапазоне концентрации ДГК от 1 до 100 мг/л. Обнаружено, что в присутствии возрастающих концентраций ДГК существенно ингибируется образование МДА на 47; 79; 77 и 86% при концентрациях ДГК 0,01; 0,1; 1 и 10 г/л соответственно. При этом отмечается возрастание накопления МДА при содержании ДГК - 1 мг/л до 70% по сравнению с образцами не содержащими H_2O_2 . Во всех случаях, в присутствии ДГК и пероксида водорода отмечается повышение МКС, что возможно связано с образованием стабильных аддуктов МКС-ДГК. Изменение времени инкубации липосомального препарата в 2 раза приводит к существенным изменениям в составе ТБК-активных продуктов образующихся в составе липосом. Можно отметить, что наличие ДГК в составе липосом ингибирует образование как МДА, так и МКС к 144 часу инкубации (в меньшей степени это сказывается для МДА в отсутствии H_2O_2). Этот процесс прослеживается и при увеличении времени инкубации до 288 часов. Тем не менее, отмечено, что в концентрации 10 мг/мл наблюдается почти 2-х кратное возрастание МДА в присутствии ДГК, ясно демонстрируя наличие лаг-фазы в процессе окисления липосом с содержанием ДГК. Так же необходимо отметить, что присутствие ДГК в липосомах приводит к увеличению %-выхода МКС, что хорошо видно при анализе данных окисления липосом к 288 часам инкубации в отсутствие H_2O_2 .

Работа поддержана грантом по образованию, номер НИР 1.4.08.