

8. Зинченко А. В., Манк В.В., Моисеев В.А., Овчаренко Ф.Д. Исследования низкотемпературных фазовых переходов в водных растворах полиэтиленгликолей. *Докл. АН СССР*, 1978, т. 240, № 4, с. 888-891. [Zinchenko A.V., Munk V.V., Moiseev V.A., Ovcharenko F.D. Studies of low-temperature phase transitions in aqueous solution of polyethylene glycol. *AN SSSR*, 1978, vol. 240, no. 4, pp. 888-891. (In Russ.)]

9. Королев В.П. Гидратация альфа-аланина в водных растворах хлорида натрия и мочевины. *Журнал структурной химии*, 2013, т. 54, № 1, с. 95-98. [Korolev V.P. Hydration of alpha alanine in aqueous solutions of sodium chloride and urea. *Zhurnal strukturnoy khimii*, 2013, vol. 54, no. 1, pp. 95-98. (In Russ.)]

ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА КЛЕТКИ-МИШЕНИ И НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ КРОВИ ЖИВОТНЫХ СЕМЕЙСТВА СОБАЧЬИХ

Олешкевич А.А.

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии –

МВА им. К.И. Скрябина»

ул. Акад. Скрябина, 23, г. Москва, РФ

e-mail: kompsotita@gmail.com

Аннотация. Проведены биофизические, морфологические и биохимические исследования на клетках крови животных семейства собачьих. Для проведения ультразвукового (УЗ) воздействия использовали ультразвуковые терапевтические аппараты с излучателями, работающими на несущей частоте 0.88 МГц: УЗТ-1-01Ф; Ультразвук Т-5, УЗТ-1.02С, модифицированные для работы с внешней модуляцией. Экспозиция УЗ: время от 10 с до 50 с, I_{SATA} – средняя по пространству и времени интенсивность – от 0.05 Вт/см² до 0.7 Вт/см². Среднее количество клеток крови в суспензии при обработке УЗ составляло (6-7)×10⁶ мл⁻¹. Обнаружены деструктивный, цитолитический, нуклеолитический и ряд других эффектов импульсно-модулированного ультразвука, в основном коррелирующих с типом и размерами клеток ткани животных одного вида. Выявлены спектры частот управления, влияющих на состояние клеток *in vitro*. Проверена возможность направленного воздействия на проницаемость, структуру цитоплазматической мембраны (ЦПМ) и на активность некоторых сывороточных ферментов: АлАТ – аланинаминотрансферазы, АсАТ – аспаратаминотрансферазы, КК – креатинкиназы.

Ключевые слова: ультразвук, модуляция, биологические эффекты, клетки крови, ферменты.

EFFECT OF ULTRASOUND ON THE TARGET CELLS & ON THE CANINE'S BLOOD ENZYME ACTIVITY

Oleshkevich A.A.

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology of K.I. Scriabin

Acad. Scriabin str., 23, Moscow, Russia

e-mail: kompsotita@gmail.com

Abstract. Biophysical, morphological and biochemical studies on blood cells of different canines were conducted. For the sonication the ultrasonic therapeutic devices modified to work with external modulation with emitters operating at a carrier frequency of 0.88 MHz: UST-1-01F; Ultrasound T-5-UST 1.02S, were used. The US exposure time ranged from 10 to 50 seconds, I_{SATA} – average over space and time intensity – from 0.05 W/cm² to 0.7 W/cm². The mean number of blood cells in the suspension sonicated was near (6-7) × 10⁶ per 1 ml. Destructive, cytolytic, nucleolytic, and some other effects of continuous and pulse-modulated ultrasound, generally correlating with the type and the size of tissue cells of animal species, were discovered. The frequency spectrum of management affected the cell's condition *in vitro* were identified. It was checked the possibility of the direct simultaneous action on the structure of the cytoplasmic membrane and the serum enzymes activity.

Keywords: ultrasound, modulation, biological effects, blood cells, enzymes.

Ранее проведённые исследования показали возможность фокусированного УЗ воздействия на клетки биологической ткани, что приводит к локальному, направленному разрушению клеток. Другими учёными были проведены исследования по направленному изменению активности сывороточных ферментов с помощью модулированного сверхвысокочастотного электромагнитного излучения [1]. Степень выраженности эффекта была связана с частотой модуляции. Были найдены спектры активных частот, вызывающих изменения активности холинэстеразы, креатинфосфокиназы, лактатдегидрогеназы и некоторых других ферментов сыворотки крови [1, 2]. В экспериментах *in vitro* по влиянию непрерывного и импульсно-модулированного УЗ на форменные элементы крови нами были определены основные направления его действия на клетки больных и здоровых животных разных видов и возраста [3-8]. **Актуальность** проведения дальнейших биофизических и биохимических исследований вызвана необходимостью нахождения эффективного способа неинвазивного узконаправленного воздействия на клетки-мишени и активность ферментов тканей животных. Это позволило бы дифференцированно купировать заболевания различной этиологии на клеточном уровне; регулировать глубину эффекта акустического воздействия; направленно изменять проницаемость или структуру цитоплазматической/ядерной мембраны, тормозить или активировать транспортные и ферментные системы клеток.

Материалы и методы. Воздействовали ультразвуком *in vitro* на подвижную ткань – кровь, где одновременно присутствуют клетки разного размера, возраста и вида. Количество клеток в суспензии при облучении составляло $(6-7) \times 10^6$ мл⁻¹. Для обеспечения постоянной концентрации образцы разбавлялись сывороткой крови того же животного. Были использованы УЗ аппараты с несущей частотой 0.88 МГц: УЗТ-1-01Ф; Ультразвук Т-5 и УЗТ-1.02С, модифицированные для работы с внешней модуляцией. Экспозиция УЗ: время от 10 с до 60 с, $I_{САТА}$ – средняя по пространству и времени интенсивность – от 0.05 Вт/см² до 0.7 Вт/см². Диапазон активных частот модуляции 10-30 Гц с шагом 2 Гц, 50-150 Гц с шагом 10 Гц и 200-900 Гц с шагом 20 Гц, модулятор ГЗ-112 (или любой аналогичный генератор), проводили не менее 10 измерений на точку. Объем облучаемых образцов составлял 1-1.5 мл. Для экспериментов использовали образцы крови, оставшиеся от клинических и биохимических плановых обследований Собачьих в ветеринарных клиниках или зоопарке от волков, лис, куниц и собак разных пород, веса, возраста и пола ($n = 42$). УЗ воздействие проводили по отработанной ранее методике. Мазки крови, окрашивали их по методу ДИФФ-КВИК и просматривали под иммерсией («Микмед-5», объектив 100х/1.25, окуляр 10х/18). Контролем служили интактные клетки тех же животных. Для определения изменения проницаемости ЦПМ использовали тест с трипановым синим [9]. О действии УЗ на клетки ткани судили по количественным и качественным морфологическим изменениям. Активность КК, АлАТ, АсАТ анализировали общепринятыми методами, используя тест-системы «Эколаб» (Россия), средние значения – по Е.Н. Бурмистрову [10]; клетки считали в камере Горяева [11]. Референсный ряд клеточных размеров приведён по Н.А. Любину [12]. Статистическую обработку данных вели в пакете прикладных программ «Statistica 6.0». Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение.

Направленное действие модулированного УЗ на клетки крови представителей семейства собачьих.

1. *Безъядерные клетки размером 1-9 м.* После обработки ткани интенсивностью 0.05-0.7 Вт/см², частотой модуляции 10-30 Гц, а также 70-80 Гц, 200 Гц или 700-800 Гц в течение 15-30 с (см. табл. 1, рис. 1) по данным тестов с трипановым синим менялась проницаемость ЦПМ кровяных пластинок (тромбоцитов). После чего шло образование клеточных ассоциаций. Тромбоциты крови больных животных при облучении модулированным УЗ начинали агрегацию несколько раньше, чем кровяные пластинки здоровых Собачьих. При наличии внутриклеточных инвазий (см. рис. 3.1 *верх*) клетки образовывали группы максимально быстро, хотя внутриклеточные паразиты (бабезии) и не локализованы внутри данного вида клеток. В результате облучения интенсивностью 0.2-0.7 Вт/см², частотой модуляции 10-20 Гц в течение 15.50 с менялась проницаемость ЦПМ и эритроцитов (см. табл. 1, рис. 2). На фоне общего анизоцитоза происходило образование булавовидных утолщений, формирование узоров и геометрических фигур из клеток красной крови (см. рис. 4.2, 4.5), наложение эритроцитов крест-накрест («гантели») ($p < 0.05$). Направленное воздействие в экспериментах вначале изменяло форму эритроцитов, без внешних признаков разрушения или цитолиза, затем регистрировали формирование групп вокруг клеток и цитоцепочек. Возможно, это связано с изменением поверхностной плотности заряда или перераспределением заряда ЦПМ. Регистрировали и появление теней клеток или гемолиз. Впервые изменение формы клеток после 2 мин действия УЗ интенсивности 1.0 Вт/см², появление цитоплазматических отростков, зарегистрировали в культуре клеток HeLa [13]. После увеличения времени обработки до 5 минут на отростках ЦПМ возникали булавовидные утолщения.

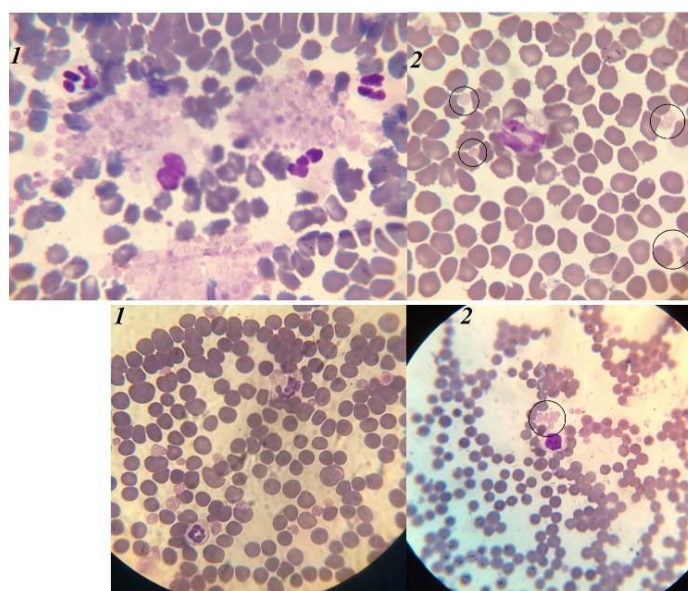


Рисунок 1 – Фотография клеток крови больных (1) и здоровых (2) собак разного возраста после действия УЗ интенсивности 0.7 Вт/см², частота модуляции 200 Гц. (*верх*) Время облучения 15 с, образование клеточных агрегатов с тромбоцитами (1) и агрегация тромбоцитов (2). и время облучения 20 с (*низ*). Тромбоциты разного размера и разной формы единичные и в группе

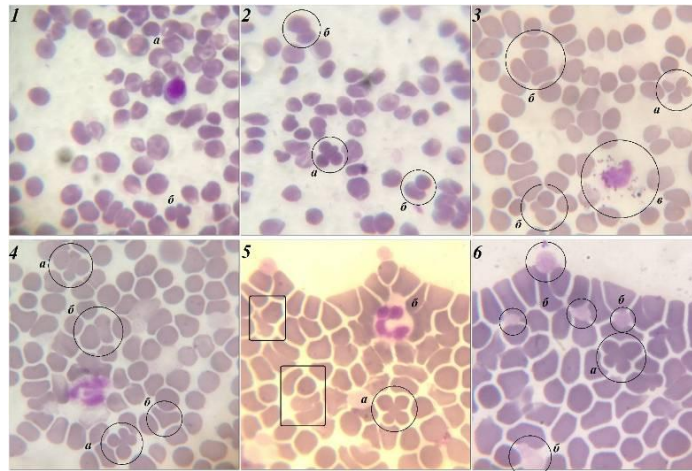


Рисунок 2 – Эритроциты собак после действия УЗ интенсивности 0.4 Вт/см². 1, 2 – Частота модуляции 10 Гц, время обработки 40 с. 3-6 – Частота модуляции 14 Гц, время обработки 50 с. 1 – Анизоцитоз. Образование геометрических фигур (а) и «гантелей» (б). 2-4 – (а) «Гантели», булавовидные утолщения/начало агрегации (б), "рассыпавшаяся" зернистость эозинофила или базофила (в). 5 – (а) «Гантели» и (б) изменённый гранулоцит: базофил, или сегментоядерный нейтрофил, или эозинофил. Обведено прямоугольниками: агрегация клеток. б – (а) «Гантели», (б) значительное увеличение размера тромбоцитов после УЗ воздействия

Таблица 1 – Направленное УЗ воздействие на безъядерные клетки крови животных семейства собачьих

Клетка-мишень	I _{уз} , Вт/см ²	v _{модул} , Гц	t, с	Клеточный ответ (p < 0.05)
тромбоциты, 1-4 μ	0.05	10-30	15	Тромбоциты в группах, других изменений нет.
	0.4	70-80	15-20, 30	Тромбоциты в группах, других изменений нет. Затем лизис тромбоцитов. Проницаемость ЦПМ
	0.7	200, 700-800	15-20	Агрегация /значительное изменение размеров тромбоцитов.
эритроциты, 5-9 μ	0.2-0.7	10-20	15-50	Проницаемость ЦПМ. Образование булавовидных утолщений, формирование узоров и геометрических фигур из клеток, наложение эритроцитов крест-накрест («гантели»)

Таблица 2 – Примеры направленного УЗ воздействия на лейкоциты животных семейства собачьих (p < 0.05)

I _{уз} , Вт/см ²	v _{модул} , Гц	t, с	Клеточная структура (мишень)
0.05	300	15	У 10% лейкоцитов лизис ЦПМ, вакуолизация цитоплазмы. Размер клеток-мишеней – 6.6–19.8 μ
	600	60	В мазке лимфоциты, преобладают мелкие. Фрагменты ядер других лейкоцитов. «Тени» клеток крови (только здесь!), общий розовый фон мазков вместо бесцветного. Гемолиз. Изменена проницаемость ЦПМ всех клеток. Фрагменты ядер. Ядра «вытекают» из всех клеток Клетка-мишень – гранулоциты и клетки, имеющие включения.
0.2	10	45	Деформация ядер, разрыв ЦПМ. Размер клеток-мишеней 6.6-19.8 μ.
0.4	10-20	15-60	Избирательное действие на ядра гранулоцитов. Ядра: вакуолизация, деформация. Размер клеток-мишеней – 7.7-17.6 μ.
	25	50	Вспенивание и/или вакуолизация цитоплазмы. Размер клеток-мишеней — 6.6-19.8 μ
	30 и 300	15	Лизис нейтрофилов. Изменение лимфоцитов и моноцитов. Вспенивание (вакуолизация) цитоплазмы, изменение проницаемости ЦПМ. Размер клеток-мишеней – 7.7-19.8 μ
	50 и 100	15-50	Вакуолизация цитоплазмы гранулоцитов. Разрыхление и взрыв ядер лейкоцитов. Лизис ЦПМ клеток-мишеней размера 6.6–19.8 μ.
0.7	800-900	15-40	Лизис и разрыв ядер, вспенивание цитоплазмы клеток-мишеней размера 6.6-9.8 μ.
	200	15-20	Вакуолизация цитоплазмы клеток-мишеней размера 6.6-19.8 μ.

2. *ядросодержащие клетки размера 6.6-19.8 м.* После обработки образцов крови интенсивностью 0.05-0.7 Вт/см², частотой модуляции 10-30 Гц, а также 50-100 Гц, 200-300 Гц, 600 Гц или 800-900 Гц в течение 15-60 с (см. табл. 2, рис. 3-7) клетки деформировались, менялся объём, а затем происходило «вспенивание» или вакуолизация цитоплазмы, менялась проницаемость или начинала разрушаться ЦПМ лейкоцитов. С увеличением времени воздействия до 35-50 с менялась глубина и степень изменений. Облучение ткани в зависимости от вида животного и его возраста интенсивностью диапазона 0.05-0.4 Вт/см², частотой модуляции из интервала частот 10–50 Гц, а также 300–900 Гц то 10 до 60 секунд позволяло направленно воздействовать на ядра лейкоцитов: изменять их форму или полностью разрушать. Во всех клетках ткани собак происходили одинаковые эффекты: цитолиз, деструкция и агрегация клеток, вспенивание цитоплазмы сначала грануло-, а затем и агранулоцитов, разрыв ЦПМ, деформация и взрыв ядер. Первые изменения мембран и ядер лейкоцитов в зависимости от вида и размера клетки регистрировалось, спустя 10-13 с от начала озвучивания активными частотами, как клеток крови больных, так и здоровых животных. Во многих случаях цитологические изменения столь значительны, что клетки идентифицировать было сложно.

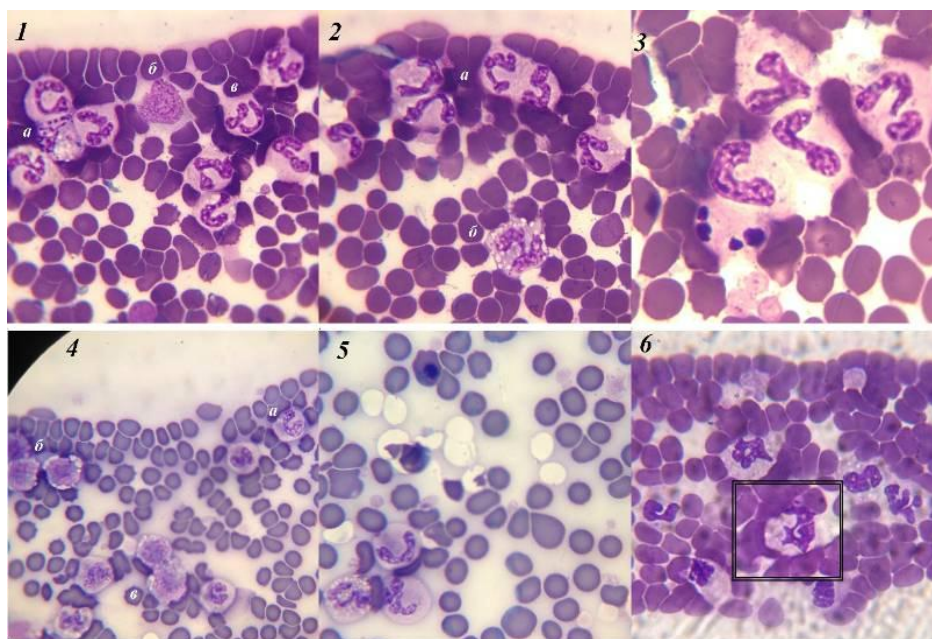


Рисунок 3 – Фотографии лейкоцитов после воздействия УЗ интенсивностью 0.4 Вт/см². 1-5 – Частота модуляции 50 Гц; время обработки 40 с (1-3) и 20 с (4, 5). 6 – Частота модуляции 98 Гц; время обработки 15 с. 1. Вспенивание ядер и цитоплазмы. *а, в* – палочко- и сегментоядерные нейтрофилы; *б* – агранулоцит (лимфоцит или моноцит, непонятно из-за отсутствия границ цитоплазмы). 2. Вероятно, палочкоядерные нейтрофилы, более выражено нарушение структуры и вспенивание цитоплазмы («вакуолизация»). 3. Разрыхление ядер палочкоядерных и/или юных (молодых) нейтрофилов. 4. *а* – палочкоядерный нейтрофил, вспенивание ядра; *б, в* – клетки идентифицировать сложно из-за разрушения ядер и смешения границ с цитоплазмой, точно не лимфоциты. 5. Палочко- и 2 сегментоядерных нейтрофила, у нижнего левого выражено вспенивание цитоплазмы. 6. Клетка в квадрате (врезка с другого мазка) может быть, с одинаковой степенью вероятности, базофилом, эозинофилом и сегментоядерным нейтрофилом; другие клетки – палочко- и сегментоядерные нейтрофилы с вакуолизацией цитоплазмы

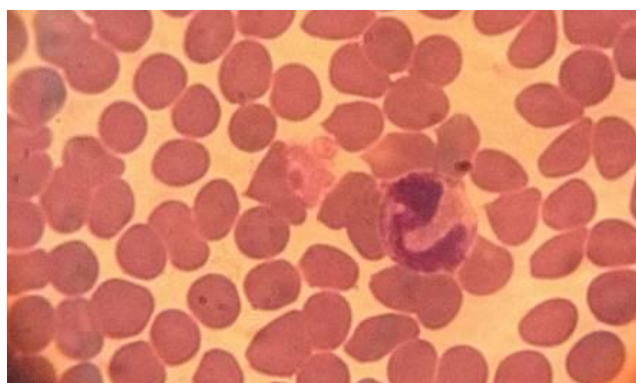


Рисунок 4 – Контроль. Палочкоядерный нейтрофил

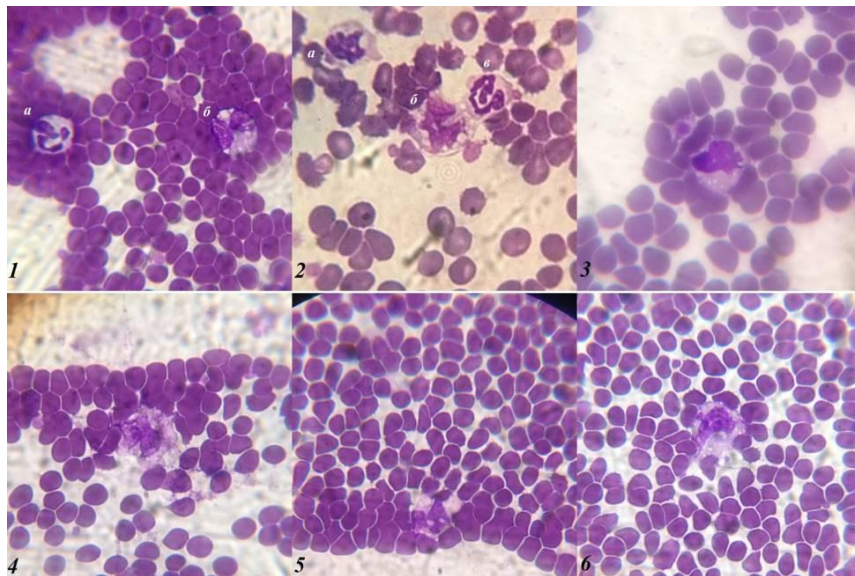


Рисунок 5 – Изменения клеток после действия модулированного УЗ интенсивности 0.4 Вт/см² (1,2,4-6) и интенсивности 0.2 Вт/см² (3). 1. Частота модуляции 30 Гц, время обработки 15 с: (а) – сегментоядерный нейтрофил; (б) – вспенивание и/или вакуолизация цитоплазмы моноцита. 2. Частота модуляции 50 Гц, время обработки 20 с: (а) – клетка идентификации не подлежит; (б) – вспенивание и/или вакуолизация цитоплазмы моноцита; (в) – сегментоядерный нейтрофил. 3. Частота модуляции 10 Гц, время обработки 15 с. Деформация ядра и изменение клеточной формы моноцита, начало вспенивания цитоплазмы. 4-6 – Частота модуляции 300 Гц, время обработки 13 с. Сильная деформация ядер и вакуолизация цитоплазмы моноцитов. Клеточная форма и размер изменены

Действие модулированного УЗ на активность ферментов крови представителей семейства собачьих.

Ферментативную активность определяли после УЗ обработки как сыворотки, так и плазмы крови. Это позволило бы приблизиться к определению основных механизмов действия на клетки ткани спектра активных частот модуляции. Исследования показали, что под действием определённых частот возможно направленно изменить ферментативную активность. Однако не было установлено влияния на активность АлАТ, АсАТ и КК ($p < 0,05$) после облучения интенсивностью 0,2 Вт/см² модуляционной частотой 20 Гц, а также интенсивностью 0.4 Вт/см² частотами 30 Гц, 50 Гц, 400 Гц и 600 Гц. Изменение частоты модуляции до 40 Гц в 1.5 раза увеличивало активность КК в сыворотке и в плазме крови, не влияя на другие ферменты, а до 900 Гц – в 3 раза увеличивало активность АлАТ и АсАТ. Другой активный режим воздействия на клетки крови (интенсивность 0.05 Вт/см², частота 800 Гц) в 8-10 раз уменьшал активность КК, вновь не влияя на активность ферментов АлАТ и АсАТ. Облучение интенсивностью 0.7 Вт/см² частотами 10-20 Гц изменяло активность всех ферментов в 1.2-1.8 раз, увеличивая КК и уменьшая активность остальных ($p > 0,05$). Возможность изменения КК активности после облучения была также отмечена в обзоре Л. Джонса [3]. Ряд исследователей установили [16, 17] влияние модулированного УЗ на ферментативную активность. Возможно, происходило прямое воздействие частотой на активный сайт фермента. В любом случае, гипотеза требует детального изучения.

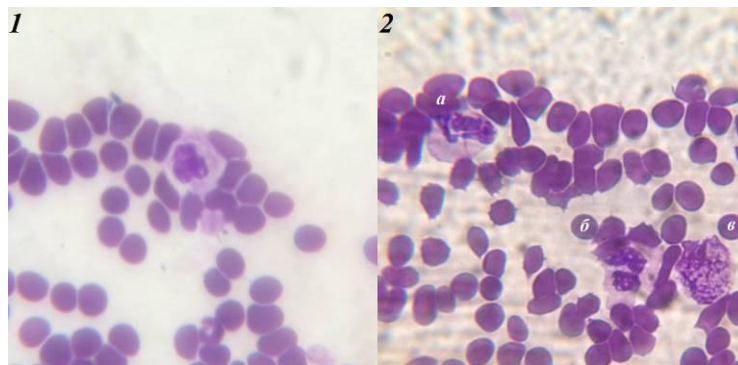


Рисунок 6 – Изменения грануло- и агранулоцитов после действия модулированного УЗ. 1. Интенсивность 0,05 Вт/см², частота модуляции 800 Гц, время обработки 20 с: по цвету зернистости можно судить о том, что это базофил, ядро деформировано. 2. (а) — клетка идентификации не подлежит; (б) – моноцит с измененным ядром, (в) – вероятно, базофил – цвет зернистости подтверждает, но размер клетки слишком большой относительно соседнего моноцита, что может быть связано с нарушением целостности ЦПМ.

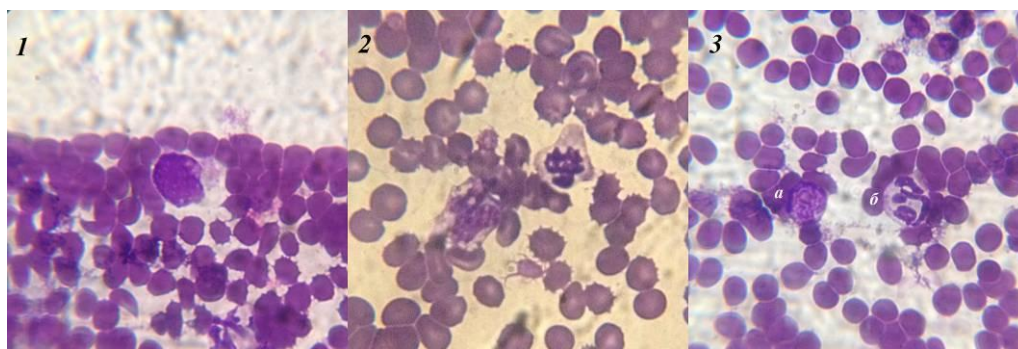


Рисунок 7 – Изменения агранулоцитов после действия модулированного УЗ. 1. Интенсивность 0,4 Вт/см², частота модуляции 300 Гц, время обработки 13 с. В центре большой лимфоцит с «растекшимся» ядром.

2. Интенсивность 0,4 Вт/см², частота модуляции 50 Гц, время обработки 20 с – клетки тяжело идентифицировать из-за значительных изменений в цитоплазме и ядре. 3. Интенсивность 0,4 Вт/см², частота модуляции 300 Гц, время обработки 13 с. (а) – клетка идентификации не подлежит, (б) – сегментоядерный нейтрофил (гранулоцит)

Заключение. Показана возможность применения ультразвуковых волн для направленного неинвазивного воздействия на функциональное состояние клеток тканей животной этиологии. Отработаны режимы выборочного изменения состояния клеточных органелл и клеток крови животных семейства собачьих с целью управления процессами жизнедеятельности и избирательного подавления или активации их функций.

Автор приносит искреннюю благодарность ветеринарным врачам-выпускникам факультета Ветеринарной медицины МГАВМиБ 1999-2014 годов выпуска за предоставление необходимого количества образцов крови разных видов животных для научных экспериментов.

Список литературы / References:

1. Пашовкина М. С., Пашовкин Т. Н. Изменение относительной активности холинэстеразы при действии модулированного сверхвысокочастотного электромагнитного излучения в опытах *in vitro*. *Радиоационная биология. Радиоэкология*, 2011, т. 51, № 3, с. 1-5. [Pashovkina M.S., Pashovkin T.N. The relative activity of cholinesterase modulated by the action of microwave electromagnetic radiation in the experiments *in vitro*. *Radiation Biology. Radioecology*, 2011, vol. 51, no. 3, pp. 1-5. (In Russ.)]
2. Johns L.D. Non-thermal Effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *Journal of athletic training*, 2002, vol. 37, no. 3, pp. 293-299.
3. Олешкевич А.А. Действие непрерывного и модулированного ультразвука на клетки крови животных *in vitro*. V Съезд биофизиков России. Материалы докладов: в 2 т. Ростов-на-Дону: ЮФУ, 2015, т. 2, с. 107. [Oleshkevich A.A. The action of continuous and modulated ultrasound on the blood cells of animals *in vitro*. *Proceedings of the V Congress of Russian biophysicists: in 2 vol.* Rostov-na-Donu, 2015, vol. 2, 107 p. (In Russ.)]
4. Олешкевич А.А., Пашовкин Т.Н. Возможность изменения лейкограмм животных при действии непрерывного ультразвука терапевтического диапазона интенсивностей. *Аграрная Россия*, 2015, т. 6, с. 13-17 [Oleshkevich A.A., Pashovkin T.N. Ability to change animals' leukogram under the influence of continuous therapeutic ultrasound intensities range. *Agrarnaia Rossiia*, 2015, vol. 6, pp. 13-17 (In Russ.)]
5. Oleshkevich A.A. Studies of frequency-dependent changes under modulated ultrasound exposure on cells in suspension. *International Journal of BioMedicine*, 2015, vol. 4, no. 1, pp. 30-34.
6. Олешкевич А.А., Пашовкин Т.Н. Количественный анализ действия модулированного ультразвука на некоторые клетки тканей животных. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*, 2014, т. 5, с. 27-33. [Oleshkevich A.A., Pashovkin T.N. Quantitative analysis of the action of the modulated ultrasound on some cells of animal tissues. *Veterinariia, zootekhniiia i biotekhnologiia*, 2014, vol. 5, pp. 27-33. (In Russ.)]
7. Олешкевич А.А., Василевич Ф.И. Направленное действие модулированного ультразвука на клетки крови собак при смешанной инвазии. *РВЖ МДЖ*, 2015, т. 5, с. 19-22. [Oleshkevich A.A., Vasilevich F.I. The direction of action of the modulated ultrasound on the blood cells of dogs with mixed invasions. *Rossii'skii` veterinarny`i` zhurnal. Melkie domashnie i dikiie zhivotny`e*, 2015, vol. 5, pp. 19-22 (In Russ.)]
8. Олешкевич А.А., Кутликова И.В. Влияние ультразвука на лимфоциты и сегментоядерные нейтрофилы. *Научное обозрение*, 2015, т. 13, с. 145-150. [Oleshkevich A.A., Kutlikova I.V. Effect of ultrasound on segmented neutrophils and lymphocytes. *Nauchnoe obozrenie*, 2015, vol. 13, pp. 145-150. (In Russ.)]
9. Скибо Ю.В., Абрамова З.И. Методы исследования программируемой клеточной гибели. Учебно-методическое пособие по курсу «Теория апоптоза». Казань, 2011, 61 с. [Skibo U.V., Abramova Z.I. *Methods of study of programmed cell death: «Theory of apoptosis»*. Kazan`, 2011, 61 p. (In Russ.)]
10. Бурмистров Е.Н. *Шанс Био: лабораторная диагностика*. М.: Капиталпринт, 2006, 154 с. [Burmistrov E.N. *Chance Bio: laboratory diagnostics*. М.: Kapitalprint 2006, 154 s. (In Russ.)]
11. Кудрявцев А.А. *Клиническая гематология животных*. М.: Колос, 1974, 399 с. [Kudriavtcev A.A. *Clinical hematology of animals*. М.: Kolos, 1974, 399 p. (In Russ.)]

12. Любин Н.А., Конова Л.Б. *Методические рекомендации к определению и выведению гемограммы у животных*. Ульяновск, 2005, 112 с. [Lubin N.A., Konova L.B. *Guidelines for the identification and isolation of hemogram in animals*. Ulianovsk, 2005, 112 p. (In Russ.)]

13. Watmough D.J., Dendy P.P., Eastwood L.M., Gregory D.W., Gordon C.A., Whestly D.N. The biophysical effects of therapeutic ultrasound on HeLa cells. *Ultrasound in Med. & Biol.*, 1977, vol. 3, pp. 205-219.

14. Пашовкина М.С., Акоев И.Г., Пашовкин Т.Н. Изменение активности некоторых ферментов животных и человека при воздействии модулированных микроволн и феномены выявления нелинейных эффектов. *Биологические эффекты слабых электромагнитных излучений*. Пушино, 2002, с. 26-37. [Pashovkina M.S., Akoev I.G., Pashovkin T.N. Changes in the activity of some enzymes in animals and humans under modulated microwave exposure and phenomena of non-linear effects' revealing. *The biological effects of weak electromagnetic radiation*. Pushchino, 2002, pp. 26-37 (In Russ.)]

15. Пашовкина М.С., Акоев И.Г. Изменение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови морских свинок *in vivo* при действии амплитудно-модулированного сверхвысокочастотного электромагнитного поля (2375 МГц). *Биофизика*, 2000, т. 45, № 1, с. 130-136. [Pashovkina M.S., Akoev I.G. Changes in the activity of alkaline phosphatase in guinea pig blood serum *in vivo* by the action of an amplitude modulated microwave EMF (2375 MHz). *Biophysics*, 2000, vol. 45, no. 1, pp. 130-136. (In Russ.)]

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОСТОЯНИЯ В СВОРАЧИВАНИИ ПОРООБРАЗУЮЩЕГО БЕЛКА OmpF *Yersinia pseudotuberculosis* И ИХ СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сидорин Е.В., Хоменко В.А., Ким Н.Ю., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф.
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ
e-mail: sev1972@mail.ru

Аннотация. Порин OmpF *Yersinia pseudotuberculosis* является трансмембранным белком, который имеет антипараллельную β -структуру, упакованную в виде β -цилиндра. В этой работе были изучены конформационные превращения порина при его переходе из полностью развернутого в подобное нативному состоянию в водных средах. За сворачиванием белка следили с помощью светорассеяния, высокоэффективной гель-проникающей хроматографии и оптической спектроскопии. Анализ результатов гель-проникающей хроматографии показал, что сразу после удаления основной части денатуранта образуются частично свернутые формы порина, с преобладанием интермедиатов сворачивания одного типа. Эти интермедиаты более компактны, чем полностью развернутый белок, и агрегируют с образованием растворимых мультимеров. Добавление шаперона Skp в раствор развернутого порина препятствует агрегации интермедиатов. По данным КД- и флуоресцентной спектроскопии интермедиаты сворачивания OmpF имеют выраженную вторичную структуру и достаточно компактную, но не жестко упакованную третичную структуру. По структуре они подобны расплавленной глобуле. Было оценено влияние макромолекулярного уплотнения на сворачивание порина. Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов сворачивания и агрегации мембранных белков *in vivo* и способствуют разработке методов эффективной экспрессии рекомбинантных мембранных белков в виде «неклассических» телец включения.

Ключевые слова: рекомбинантный порин OmpF, *Yersinia pseudotuberculosis*, структура денатурированных белков, агрегация белков, сворачивание белков.

INTERMEDIATES STATES IN *Yersinia pseudotuberculosis* PORIN FOLDING AND THEIR STRUCTURAL CHARACTERISTICS

Sidorin E.V., Khomenko V.A., Kim N.Yu., Novikova O.D., Solov'eva T.F.
G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of the RAS
100 Let Vladivostoku av., 159, Vladivostok, 690022, Russia
e-mail: sev1972@mail.ru

Abstract. *Yersinia pseudotuberculosis* porin OmpF is a transmembrane protein that has an antiparallel β -structure, packed as a β -barrel. In this study conformational transformations of the porin were studied during its transition from a fully unfolded to a native-like state in aqueous media. The porin folding was monitored by light scattering, size-exclusion chromatography (SEC), and optical spectroscopy. SEC analysis showed, that immediately after removal of the main part of the denaturant the partially folded forms of the porin, with a predominance of one type folding intermediates are formed. These intermediates are more compact than the completely unfolded protein and they aggregate to form the soluble multimers. The chaperone Skp addition to unfolded porin solution prevents the aggregation of folding intermediates. According to circular dichroism and fluorescence spectra, OmpF porin folding intermediates have a substantial secondary structure and sufficiently compact, but not tightly packed tertiary structure. These folding intermediates structurally resemble a molten globule. It was estimated macromolecular crowding effect on folding of the porin. These results contribute to the understanding of the mechanisms of the membrane proteins folding and aggregation *in vivo* and promote the development of methods for the efficient expression of the recombinant proteins in the form of "non-classical" inclusion bodies.

Key words: recombinant porin OmpF, *Yersinia pseudotuberculosis*, structure of denaturated proteins, aggregation of proteins, protein folding.