

На правах рукописи

Погонялова Марина Юрьевна

**МЕТОД И УСТРОЙСТВО ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО
КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА**

Направление 12.04.04 – Биотехнические системы и технологии
Направленность «Фотоника и электроника в медико-биологической практике»

АВТОРЕФЕРАТ

Магистерской выпускной квалификационной работы

Орел, 2025

Работа выполнена на кафедре приборостроения, метрологии и сертификации
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»

Научный руководитель: доктор биологических наук,
заведующий лабораторией клеточной
физиологии и патологии научно-
технологического центра биомедицинской
фотоники, профессор кафедры
приборостроения, метрологии и
сертификации
Абрамов Андрей Юрьевич

Официальный рецензент: кандидат технических наук, доцент
научно-образовательной лаборатории
«Техническое зрение»
Университета ИТМО
Маргарянц Никита Борисович

Защита состоится 27 июня 2025 года в 10⁰⁰ часов на заседании Государственной
экзаменационной комиссии по адресу: 302020, РФ, г. Орел, Наугорское шоссе, 29.

С выпускной квалификационной работой можно ознакомиться на кафедре
приборостроения, метрологии и сертификации ФГБОУ ВО «Орловский
государственный университет имени И.С. Тургенева»

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Внутриклеточный кальций (Ca^{2+}) представляет собой один из ключевых вторичных мессенджеров, участвующих в регуляции широкого спектра физиологических процессов клетки. Концентрация ионов кальция в цитозоле строго контролируется благодаря сложной системе транспортёров, каналов и внутриклеточных депо, таких как эндоплазматический ретикулум (ЭПР) и митохондрии. Нарушение внутриклеточного кальциевого гомеостаза может приводить к различным заболеваниям: нейродегенеративные заболевания, диабет, а также сосудистые заболевания.

Тонус кровеносных сосудов является ключевым физиологическим параметром, определяющим уровень артериального давления, регионарный кровоток и адаптационные реакции организма в ответ на различные внешние и внутренние воздействия. Он регулируется комплексом нейрогуморальных механизмов, эндотелиальной функцией и уровнем внутриклеточного Ca^{2+} в гладкомышечных клетках сосудов. Ионы кальция играют центральную роль в процессе сокращения гладкой мускулатуры и, следовательно, в контроле просвета сосуда.

Современные исследования демонстрируют, что помимо классических регуляторных систем важная роль в регуляции сосудистого тонуса принадлежит активным формам кислорода (АФК). Особый интерес в этом аспекте представляет синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) – это метастабильное возбуждённое состояние молекулярного кислорода, обладающее высокой реакционной способностью. Воздействие $^1\text{O}_2$ на сосудистое русло характеризуется разнонаправленным действием: в зависимости от концентрации, локализации и продолжительности воздействия он может вызывать как вазодилатацию, так и вазоконстрикцию.

В последние годы значительно возрос интерес к возможностям целенаправленного использования $^1\text{O}_2$, получаемого методом прямой оптической генерации с использованием лазерного излучения в ближнем инфракрасном диапазоне. Наиболее часто для этих целей применяется длина волны 1267 нм, которая эффективно индуцирует образование $^1\text{O}_2$. Лазер-индуцированный $^1\text{O}_2$ уже нашёл применение как на клеточном уровне, так и в экспериментах на животных моделях.

Цели и задачи исследования. Целью исследования является разработка метода и устройства для регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза, что позволит улучшить понимание механизмов, регулирующих уровень кальция в клетках, а также создать эффективные инструменты для коррекции нарушений, связанных с дисбалансом кальция.

Задачи исследования:

1) обзор методов регуляции просвета кровеносных сосудов и анализ научно-технической литературы с целью выявления существующих

технических решений в области регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза;

2) обоснование принципа регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза, основанного на прямой оптической генерации синглетного кислорода на длине волны 1267 нм;

3) разработка метода регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза;

4) обоснование принципа построения устройства регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза на основе разработанного метода;

5) разработка конструкции корпуса электронного блока устройства регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза;

6) составление документации для осуществления постпродажного технического обслуживания разрабатываемого устройства;

7) проведение предварительных исследований с применением экспериментального макета разработанного устройства, *in vitro* на нейрон-глиальной культуре и *in vivo* на кровеносных сосудах мозга мыши.

Объектом исследования является нейрон-глиальная культура, а также кровеносные сосуды мозга мыши.

Предметом исследования являются метод и устройство, основанные на применении лазерного излучения с длиной волны 1267 нм, на которой происходит генерация синглетного кислорода, для регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза.

Методы исследования. При выполнении исследований применялись аналитические и экспериментальные методы, методы синтеза и математической статистики.

Научная новизна заключается в том, что при решении поставленных задач исследования предложены:

1) механизм влияния синглетного кислорода, генерируемый с помощью лазера с длиной волны 1267 нм, на кальциевый гомеостаз в клетках мозга, а также раскрыта его физиологическая функция, заключающаяся в изменении просвета кровеносных сосудов в мозге;

2) мощность и время облучения, подтверждающие возможность регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза, но при этом не приводящие к клеточной гибели после облучения;

3) метод регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза, отличающийся применением прямой оптической генерации синглетного кислорода на длине волны 1267 нм.

Практическая значимость работы заключается в том, что

1) предложен метод регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза для коррекции нарушений, связанных с дисбалансом кальция, а также с нарушением в работе кровеносных сосудов мозга;

2) продемонстрирована эффективность применения устройства для регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза на нейрон-глиальной культуре, а также на кровеносных сосудах мозга мыши.

Личный вклад автора заключается в проведении обзора текущего состояния вопросов регуляции просвета кровеносных сосудов, а также регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза, формулировке требований к разрабатываемому методу и устройству для регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза, планировании и проведении экспериментальных исследований, анализе полученных данных и оформлении результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1) метод регуляции кальциевого гомеостаза в клетках мозга, основанный на облучении биообъектов лазером с длиной волны 1267 нм, мощностью излучения 50 мВт и дозами облучения 180-300 Дж/см², позволяет регулировать концентрацию кальция в цитозоле клетки путем воздействия синглетного кислорода на пуринергическую систему;

2) предложенный принцип построения устройства обеспечивает возможность регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза, а также может быть использован для регуляции просвета кровеносных сосудов;

3) предложенная методика КТС обеспечивает контроль метрологических характеристик устройства, что гарантирует его безопасное использование при соблюдении правил руководства по эксплуатации.

Апробация результатов. Основные результаты работы доложены и обсуждены на научно-практических конференциях:

1) Всероссийская с международным участием конференция по нейробиологии и биофотонике «НейроБайкал 2024» (Россия, д. Большие Коты, Иркутская область, 22-27 июля 2024);

2) Студенческая научно-техническая конференция «Неделя науки-2025» (Российская Федерация, г. Орёл, ОГУ им. И.С. Тургенева, 18 апреля 2025 г.);

3) Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Россия, г. Пущино, Институт биофизики клетки Российской академии наук, 19-23 мая 2025).

Публикации. По теме магистерской выпускной квалификационной работы опубликованы 3 статьи, в том числе 1 в ведущем рецензируемом научном издании, входящем в базу данных Scopus.

Структура и объем работы. Выпускная квалификационная работа изложена на **162** страницах машинописного текста, включая приложения, иллюстрируется **29** рисунками, **18** таблицами, состоит из введения, **3** глав, основных выводов и результатов, списка использованных источников, включающего **84** наименований и **9** приложений.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

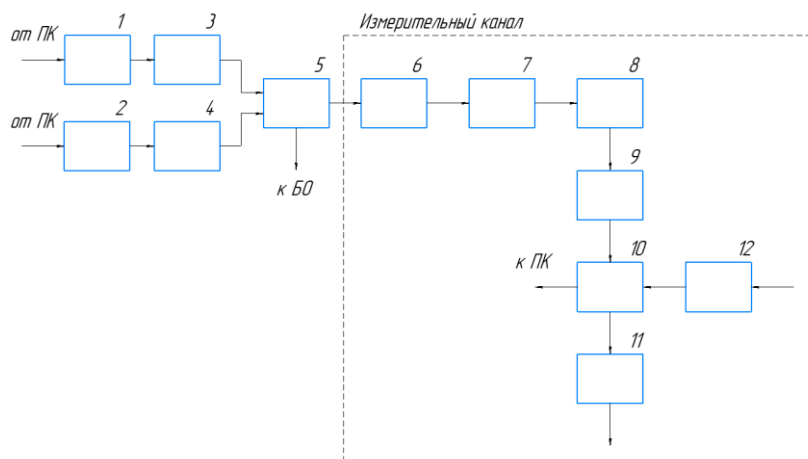
Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи исследования, описаны объект и предмет исследования, а также научная новизна работы.

В первой главе представлено медико-биологическое обоснование разработки устройства, а также приводится обзор используемых методов регуляции просвета кровеносных сосудов. Разработаны медико-технические требования. На основании медико-технических требований предложена структурная схема устройства (рисунок 1), включающая канал измерения температуры биообъекта при облучении его лазером.

Для осуществления питания лазерных источников (3-4), и изменения режимов их работы применяются специализированные драйверы с блоком питания (1-2). Доставка лазерного излучения от источников к объекту исследования осуществляется с применением волоконно-оптического кабеля (5). Реализация измерительного канала основана на использовании термистора (6), для преобразования сигнала с первичного измерительного преобразователя используется преобразователь сопротивления в напряжение (7). Усиление сигнала происходит за счет использования дифференциального включения операционного усилителя (8). Для оцифровки аналогового сигнала используется АЦП (9). Обработка цифрового сигнала осуществляется с помощью микроконтроллера (10). Полученная информация об измерении температуры передается оператору на дисплей (11). Контроль устройства осуществляется через блок управления (12).

Разработана схема электрическая принципиальная устройства, описан принцип его работы и составлено математическое описание. Произведен выбор и расчет элементов разрабатываемой части электронного блока устройства, проведен анализ точности и надежности.

Также проведена разработка конструкции корпуса управляющего блока устройства, заключающаяся в моделировании конструкции.



1 – драйвер лазерного источника с длиной волны 1160 нм; 2 – драйвер лазерного источника с длиной волны 1267 нм; 3 – лазерный источник на длине волны 1160 нм; 4 – лазерный источник на длине волны 1267 нм; 5 – волоконно-оптический кабель; 6 – термистор; 7 – преобразователь сопротивления в напряжение; 8 – операционный усилитель; 9 – АЦП; 10 – микроконтроллер; 11 – дисплей; 12 – блок управления.

Рисунок 1 – Схема структурная устройства для регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза

Во второй главе представлено метрологическое обеспечение и постпродажное обслуживание. Устройство относится к средствам измерений, предназначенным для применения в сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений, в отношении которых проводятся испытания в целях утверждения типа средств измерений. Составлен технологический регламент для постпродажного обслуживания разработанного устройства, в котором представлены проводимые работы и технические требования к ним.

В соответствии с государственной поверочной схемой выбрана локальная поверочная схема (рисунок 2)

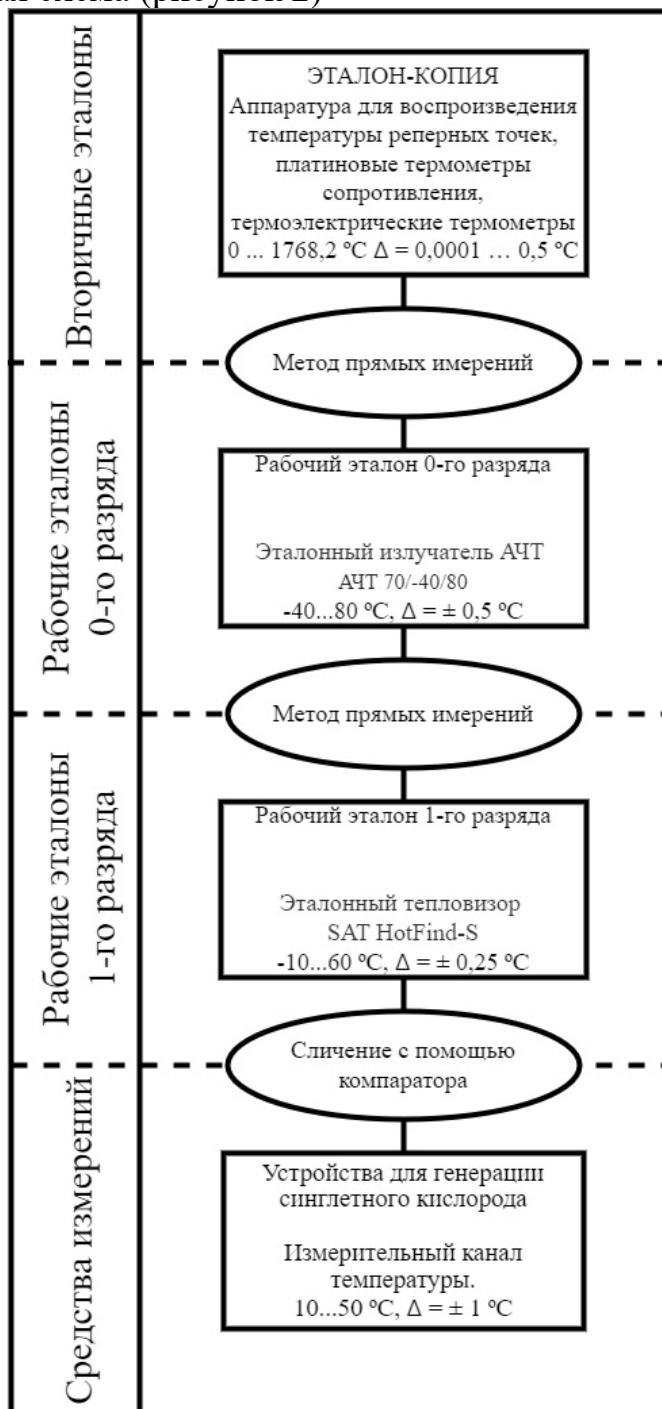


Рисунок 3 – Локальная поверочная схема

Составлена методика контроля технического состояния (КТС) разрабатываемого устройства. Также проведено описание метрологических характеристик, определяемых при КТС разрабатываемого устройства, произведен выбор технических средств и определены условия КТС, составлено описание процедуры проведения КТС разрабатываемого устройства.

В третьей главе описываются результаты *in vitro* и *in vivo* исследований проведенные на первичной нейрон-глиальной культуре, полученной от новорожденных крысят линии Wistar, а также на кровеносных сосудах головного мозга мышей линии CD-1. Научно-исследовательский раздел выполнялся при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2025-011

Исследования проводились с помощью установки, разработанной в НТЦ биомедицинской фотоники Орловского государственного университета им. И. С. Тургенева. Для реализации процесса фотоиндуцированной генерации синглетного кислорода использовалось специализированное лазерное оборудование. Основным источником излучения служил лазерный диод LD-1267-PM-500, работающий на длине волны 1267 нм. Выбор данной длины волны обусловлен её совпадением с областью поглощения молекулярного кислорода, что способствует его эффективной фотоактивации и образованию $^1O^2$. В качестве контрольного источника применялся второй лазерный диод LD-1160-PM-500, излучающий на длине волны 1160 нм, находящейся вне полосы поглощения кислородом, что позволяло исключить его влияние на процесс генерации $^1O^2$.

Все последующие эксперименты *in vitro* проводили на первичной нейрон-глиальной культуре коры головного мозга, по стандартной методике. Измерения флуоресценции зонда SOSG проводились с помощью конфокального микроскопа LSM 900. При взаимодействии SOSG с $^1O^2$ происходит окисление зонда с образованием эндопероксида (SOSG-EP), что сопровождается интенсивным флуоресцентным сигналом в зелёной области спектра.

Визуализация показала постепенное нарастание флуоресцентного сигнала в цитоплазме клеток в зависимости от времени и интенсивности лазерного воздействия (рисунок 3), что свидетельствует о накоплении синглетного кислорода внутри клеток под действием лазерного излучения на длине волны 1267 нм.

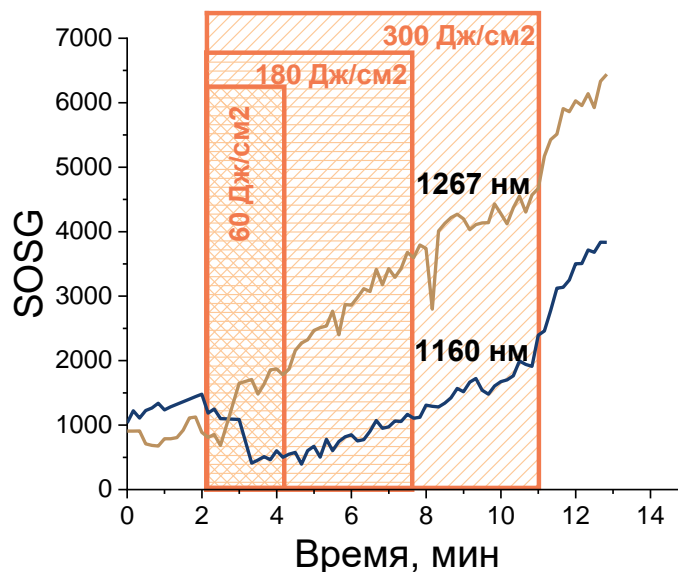


Рисунок 3 – Изменение интенсивности флуоресценции SOSG при воздействии лазера 1267 нм и 1160 нм

Для того чтобы оценить температуру нагрева лазерного пятна, как потенциально значимого влияния на жизнеспособность клеток при воздействии $1O^2$, на предварительном этапе были проведены исследования температурного режима с использованием инфракрасного термографа «ИРТИС-2000 МЕ».

Эксперимент состоял из нескольких этапов. На первом этапе исследовалось изменение температуры на поверхности стекла измерительной ячейки, применяемой при работе с клеточными культурами, под действием лазерного излучения с длиной волны 1267 нм. В качестве модельной жидкости использовалась дистиллированная вода объёмом 500 мкл. Термограф устанавливался двумя способами: над и под измерительной ячейкой, с фокусировкой на покровное стекло. Такое расположение позволяло оценить не только нагрев поверхности, но и тепловые потери, связанные с поглощением излучения водной средой.

Анализ полученных данных показал, что при расположении термографа под ячейкой регистрируется меньший прирост температуры на поверхности покровного стекла (рисунки 4 А и Б). Это явление можно объяснить высоким коэффициентом поглощения излучения на длине волны 1267 нм водой, что приводит к снижению энергии, достигающей нижней поверхности стекла. Также установлено, что увеличение мощности лазера прямо пропорционально росту температуры, тогда как удлинение времени воздействия не оказывает существенного влияния на степень нагрева.

Поскольку изучение жизнеспособности клеток при внешнем воздействии требует длительного времени и поддержания стабильных условий культивирования, на следующем этапе исследований было решено заменить стандартную ячейку на чашку Петри с питательной средой. Анализ

показал, что мощность 50 мВт вызывает повышение температуры не более чем на 2 °С, что считается безопасным для клеточных культур (рисунки 4 В и Г). Также было установлено, что увеличение времени воздействия приводит к плавному и контролируемому росту температуры без критических скачков. Поэтому для дальнейших экспериментов использовали мощность 50 мВт, регулируя дозу лазерного воздействия за счёт времени облучения.

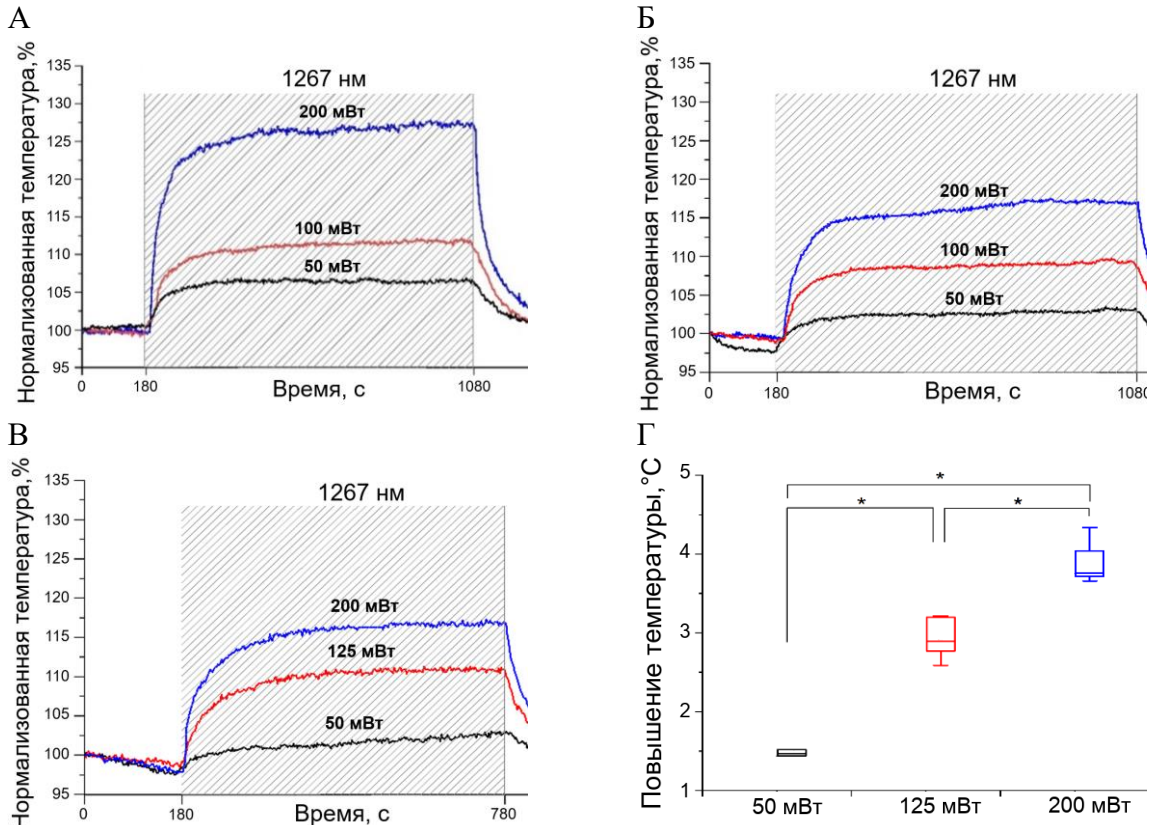


Рисунок 4 – Репрезентативные кривые изменения нормированных значений температуры на поверхности покровного стекла в месте падения лазерного пучка при различных значениях мощности лазерного излучения 1267 нм при расположении термографа: А. выше и Б. ниже измерительной ячейки. В. изменения нормированных значений температуры на поверхности покровного стекла в месте падения лазерного пучка в чашке Петри с питательной средой при различных значениях мощности лазерного излучения 1267 нм; Г. приросты температуры в °С в месте падения лазерного пучка на нижней части чашки Петри

Следующим этапом были проведены эксперименты непосредственно по измерению концентрации кальция в цитозоле, они проводились на широкопольном флуоресцентном микроскопе на базе Olympus IX73P1F и установке возбуждения и регистрации флуоресценции Cairn

Исследования влияния лазерного облучения на кальциевый гомеостаз показали, что во время облучения лазером в клетках возникает кальциевый сигнал. При этом амплитуда стимулированного кальциевого ответа снижается как в нейронах, так и в астроцитах. (рисунок 5).

А

Б

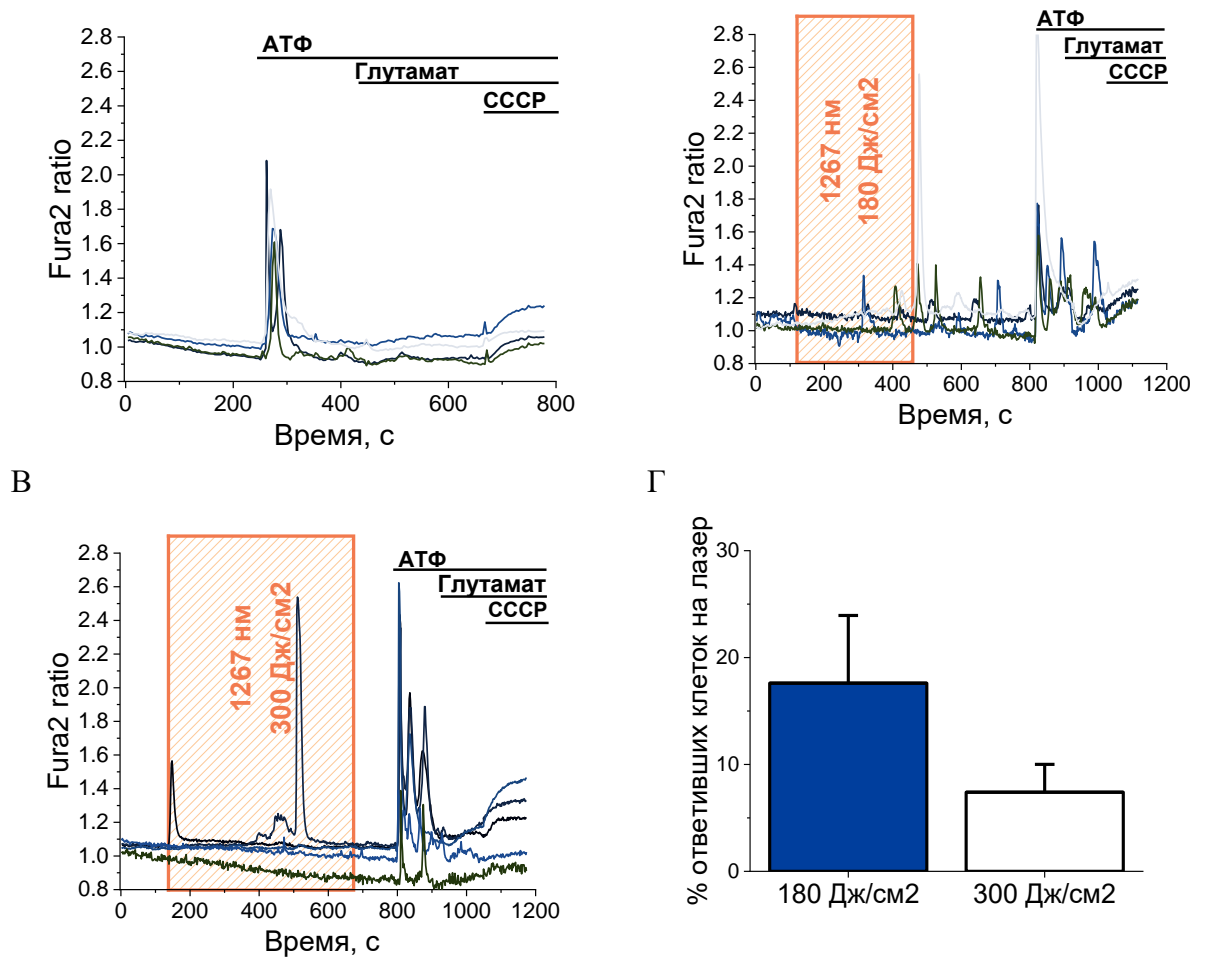


Рисунок 5 – Репрезентативные кривые, отражающие изменения кальциевого сигнала в нейрон-глиальной культуре: А. Контроль, Б. Доза облучения 180 Дж/см², В. Доза облучения 300 Дж/см², Г. Уровень ответивших клеток на лазер. Среднее ± SE

Уменьшение амплитуды кальциевого ответа может свидетельствовать о различных механизмах воздействия лазерного излучения на сигнальные пути клеток.

Дальнейшие исследования были направлены на выявление физиологической значимости зарегистрированных кальциевых сигналов, возникающих в ответ на лазерное воздействие на длине волны 1267 нм. Основной задачей стало определение наличия или отсутствия цитотоксического эффекта при различных дозах излучения, а также оценка потенциального влияния фотостимуляции на жизнеспособность клеток нейрон-глиальной культуры.

Измерение количества некротических клеток проводилось с использованием Hoechst 33342 и Propidium Iodide. Гибель клеток измеряли через 24 ч после обработки клеток лазером. Анализ данных показал, что при применении доз лазерного излучения 180 Дж/см² и 300 Дж/см², которые ранее демонстрировали выраженные изменения в кальциевой сигнализации, не

наблюдалось достоверного повышения уровня некротической гибели клеток. Это позволяет сделать вывод о том, что вызванные лазером кальциевые сигналы не сопровождаются повреждением клеток и могут рассматриваться как физиологически допустимые реакции клеток на облучение.

Однако при использовании значительно более высокой дозы – 450 Дж/см² – было зафиксировано увеличение доли некротических клеток (рисунок 6). Несмотря на то, что данный рост не достиг уровня статистической значимости, он может указывать на начальные проявления термического влияния лазера на клеточные структуры. Таким образом, зарегистрированные ранее кальциевые сигналы, индуцированные лазерным излучением на длине волны 1267 нм, происходили в условиях жизнеспособности клеток. Эти результаты подтверждают возможность использования данных режимов лазерного воздействия для облучения не только клеток, но и тканей.

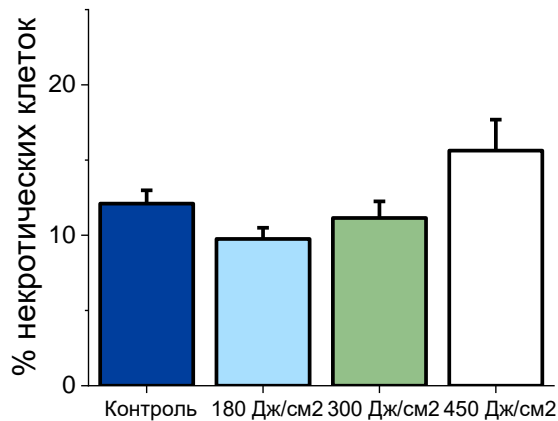


Рисунок 6 – Результаты статистического анализа процентного содержания некротических клеток в контрольных и облученных лазером клетках

Более того, выявленные в ходе исследования изменения кальциевого гомеостаза под действием лазерного излучения на длине волны 1267 нм могут иметь не только внутриклеточные, но и системные физиологические реакции. Одним из потенциально значимых эффектов стало влияние ${}^1\text{O}^2$ на функциональное состояние кровеносных сосудов.

Эксперименты *in vivo* показали, что при воздействии лазера с длиной волны 1267 нм на теменную область коры головного мозга мыши при двух использованных дозах (180 Дж/см² и 300 Дж/см²) наблюдалась выраженная тенденция к увеличению просвета кровеносных сосудов как непосредственно во время облучения, так и в течение некоторого времени после его окончания. Аналогичные эксперименты с контрольным лазером на длине волны 1160 нм, который не индуцировал образование синглетного кислорода и не вызывал выраженных кальциевых реакций (рисунок 7), не продемонстрировали никаких изменений в диаметре сосудов, что подтверждает участие ${}^1\text{O}^2$ в данном процессе.

Для того, чтобы подтвердить участие кальциевой сигнализации в процессе изменения кровеносных сосудов были проведены эксперименты с применением сурамина – ингибитора пуринорецепторов. При введении сурамина изменения в просвете сосудов, ранее регистрируемые при облучении, полностью отсутствовали.

А

Б

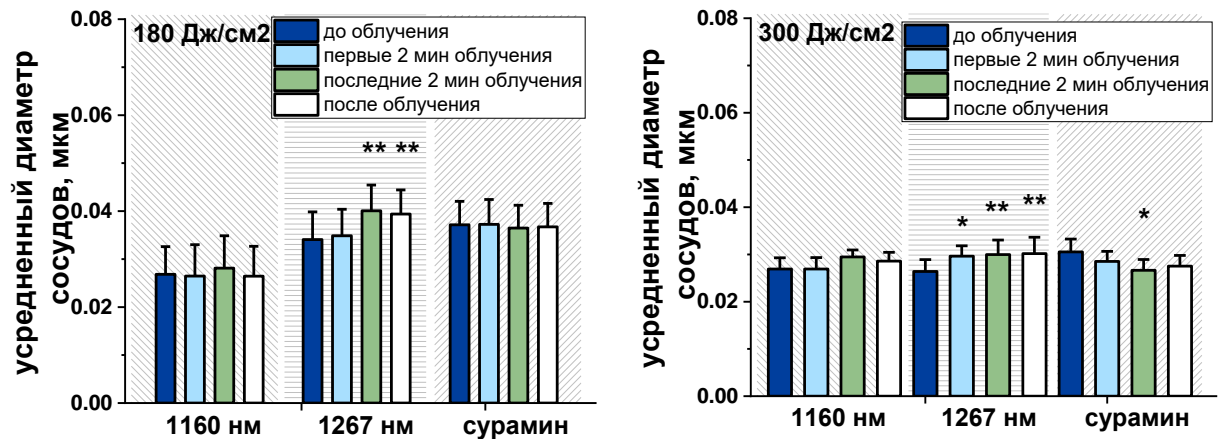


Рисунок 7 – Результаты статистического анализа диаметров кровеносных сосудов в мозге: А. Доза 180 Дж/см², Б. Доза 300 Дж/см²

Предварительная подготовка заключается во включении и настройке устройства, установка устройства над объектом под углом 90 °С. На следующем этапе проводилось измерение базовых значений, около 2 мин. В зависимости от биообъекта данный этап проводился, в случае экспериментов *in vitro* на широкопольном флуоресцентном микроскопе на базе Olympus IX73P1F и установке возбуждения и регистрации флуоресценции Cairn, а в случае *in vivo* исследований канал визуализации изменений в церебральном кровотоке был реализован с использованием источников некогерентного (525 нм) света для зондирования биологической ткани. После записи базовых параметров проводилось облучение биообъектов лазером 1267 нм, мощностью 50 мВт и различным временем воздействия 5,5 мин (доза 180 Дж/см²) и 9 мин (доза 300 Дж/см²).

На рисунке 8 приведена схема алгоритма метода регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза.

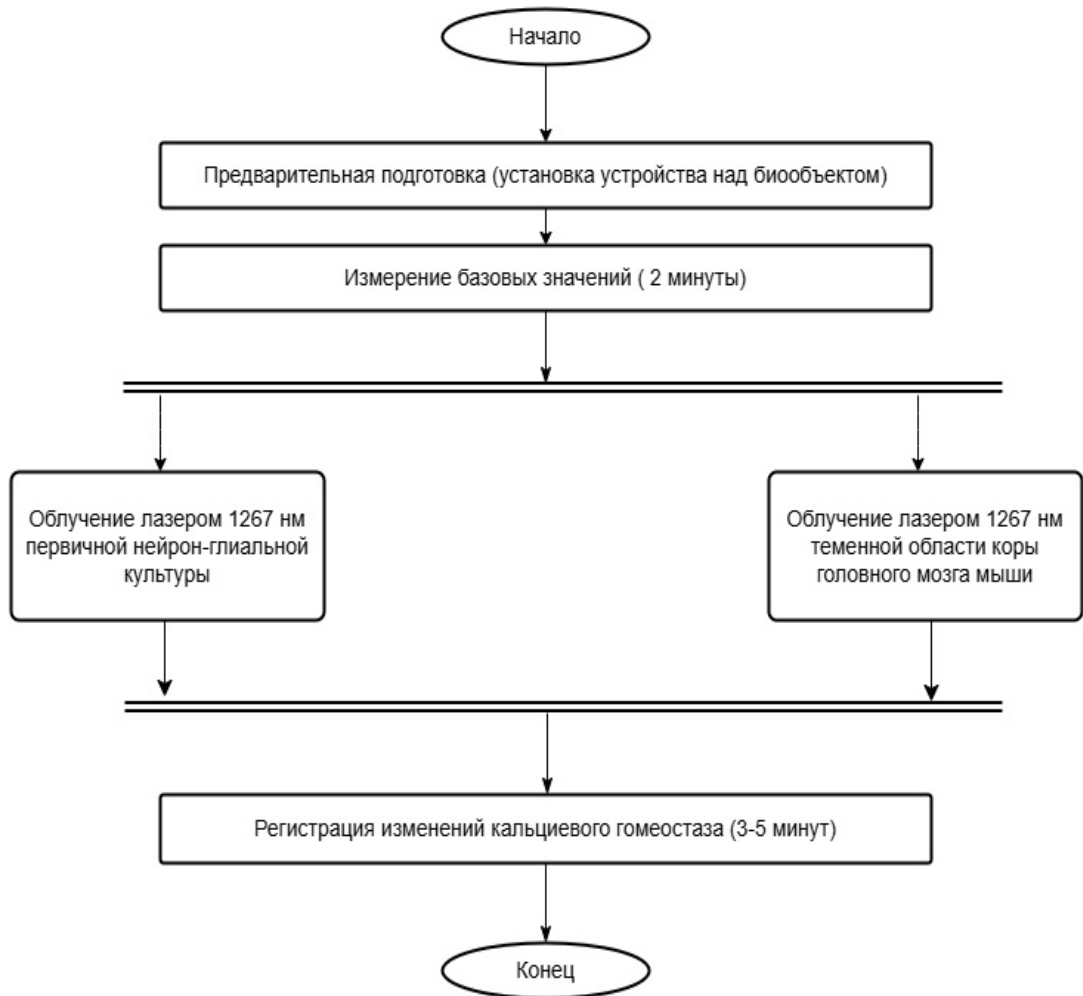


Рисунок 8 – Алгоритм метода регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза

Такие же настройки мощности и времени были использованы в контрольных экспериментах с лазером 1160 нм. После облучения проводилась регистрация изменений кальциевого гомеостаза в случае облучения длиной волны 1267 нм и регистрация отсутствия изменений в случае длины волны 1160 нм, съемка биообъектов после завершения облучения длилась 3-5 мин для фиксации всех изменений.

В заключении сформулированы основные выводы по результатам работы.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1) анализ актуальности и общего состояния проблемы регуляции просвета кровеносных сосудов в головном мозге при различных заболеваниях позволил выявить недостатки применяемых в настоящее время физических методов и показал перспективность применение прямой оптической

генерации синглетного кислорода для регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза и тем самым для регуляции тонуса сосудов;

2) предложенный принцип регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза, основанный на применении метода прямой оптической генерации синглетного кислорода на длине волны 1267 нм, получил теоретическое и экспериментальное обоснование и признан перспективным с позиций выявленных изменений в кальциевом гомеостазе, как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*;

3) разработан метод регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза;

4) предложен принцип построения устройства регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза на основе разработанного метода;

5) разработана оригинальная конструкция корпуса электронного блока разрабатываемого устройства;

б) составлена документация для осуществления постпродажного технического обслуживания разрабатываемого устройства;

7) проведенные предварительные исследования показали, что лазерное воздействие на длине волны 1267 нм, при определенных параметрах воздействия (мощностью излучения 50 мВт и дозами облучения 180-300 Дж/см²), может оказывать влияние на кальциевый гомеостаз, не только на клеточном уровне, но и на уровне целого организма, регулируя просвет кровеносных сосудов.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Vinokurov, A.Y., Bazhenov, P.A., **Pogonyalova, M.Y.**, Seryogina, E.S., Vetrova, E.A., Andreeva, L., Abramov, A.Y., Angelova, P.R., Enhancement of Energy Metabolism in Skeletal Myocytes Protects Against Age-Related Sarcopenia, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2025. - Т. 29. - №9 - С. e70588

2. **Погонялова М.Ю.**, Винокуров А.Ю., Абрамов А.Ю. Синглетный кислород вызывает кальциевый сигнал в клетках *in vitro* // *НейроБайкал 2024: Сборник тезисов докладов Всероссийской конференции с международным участием по нейробиологии и биофотонике «НейроБайкал 2024»*, пос. Большие Коты, оз. Байкал, 22-27 июля 2024 года / Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, ОГУ имени И.С. Тургенева ; редкол. : А.Ю. Абрамов [и др.]. – г. Орёл : ОГУ имени И.С. Тургенева, 2024. – С. 34.

3. **Погонялова М.Ю.**, Ератова Л.В., Винокуров А.Ю., Абрамов А.Ю., IP3-зависимое высвобождение кальция из эндоплазматического ретикула в астроцитах под воздействием синглетного кислорода // *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация (19-23 мая 2025 г.)*. Сборник статей. – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2025. - С. 176-181.