

ПОДСЕКЦИЯ «БИОФИЗИКА, БИОТЕХНОЛОГИЯ И НАНОБИОТЕХНОЛОГИЯ»

Выявление мутаций в тканевой и циркулирующей митохондриальной ДНК после радиационного воздействия

Абдуллаев С.А. (Пушино, abdullaev.iteb@rambler.ru)

Определяли мутации в митохондриальной ДНК (мтДНК) тканей головного мозга и селезенки, а также в циркулирующей мтДНК плазмы крови мышей, подвергнутых радиационному воздействию. Анализы проводили через 8, 14, 28 дней после рентгеновского облучения всего их тела в дозе 5 Гр. Количество мутаций оценивали по результатам расщепления CEL I эндонуклеазой (специфически разрезающей ДНК по участкам с неспаренными основаниями) гетеродуплексов, полученных гибридизацией продуктов ПЦР мтДНК (фрагменты гена ND3 и двух участков D-loop разного размера) из тканей облученных и контрольных мышей. Анализ мутаций этим методом включает 4 стадии: (1) PCR-амплификация участка ДНК от облученных (О) и контрольных (К) мышей; (2) получение гетеродуплексов гибридизацией продуктов PCR О-ДНК и К-ДНК; (3) обработка гетеродуплексов CEL I нуклеазой; и (4) электрофоретический анализ продуктов расщепления CEL I нуклеазой. Результаты показывают, что в тканях мозга и селезенки наибольший уровень мутантных копий мтДНК (по двум участкам D-loop и гену ND3) наблюдается на 8 день после облучения. Анализы мутаций в мтДНК тканей мышей, в последующие дни после облучения, показали постепенное снижение их уровня к 28 дню. Снижение количества участков, разрезаемых CEL I нуклеазой, в мтДНК, полученной из селезенки, значительно более резкое по сравнению с мтДНК, полученной из головного мозга. К тому же, по сравнению с тканями контрольных мышей в течение с 8 по 28 дней после облучения на 30-40% снижается и общее количество копий мтДНК. К этим 8, 14 и 28 дням пострадиационного периода доля мутантных копий в циркулирующей мтДНК (по участку D-loop и гену ND3) плазмы крови в два раза выше, чем таковой в мтДНК тканей. Максимально высокий процент мутантных копий циркулирующей мтДНК плазмы и повышение ее общего содержания регистрируется на 14 день после облучения. Результаты исследования позволяют полагать, что из тканей облученных животных в пострадиационный период элиминируются мутантные копии мтДНК. Фрагменты крупного размера мутантной и нормальной (дикой) мтДНК переходят в кровоток облученных животных. Наблюдаемое увеличение количества циркулирующей мтДНК и ее мутантных форм в плазме крови облученных животных может указывать на степень их радиационного поражения. Полученные результаты позволяют также предполагать, что повышенное содержание мутантных копий мтДНК в плазме крови могут служить чувствительным маркером для оценки радиационного поражения и иных генотоксических воздействиях на организм.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и гранта РФФИ (№ 08-04-00163). Автор выражает благодарность к.б.н. Н.А. Гуляевой и В.Н. Антиповой за помощь в проделанной работе и подготовке тезисов.

Идентификация хромофоров зрительных пигментов ракообразных при микроспектрофотометрических измерениях

Абу Хамидах А.Е., Демчук Ю.В. (Москва, amnushka@gmail.com)

Микроспектрофотометрия свежевыделенных фоторецепторных клеток является наиболее нативным методом исследования зрительных пигментов. Одной из задач спектрофотометрии зрительных клеток является идентификация вида хромофора зрительного пигмента: витамин А1 (ретиаль), либо витамин А2 (3-дегидроретиаль).

A1-зрительные пигменты имеют более коротковолновые максимумы поглощения, чем A2-зрительные пигменты, что позволяет многим животным адаптировать спектральную чувствительность к изменению характера освещения. В этой связи идентификация вида хромофора является актуальной задачей в зрительно-экологических исследованиях. В исследованиях на позвоночных животных для идентификации вида хромофора широко используется простой и оперативный метод сравнения спектров поглощения зрительных клеток с шаблонами A1- или A2-содержащих зрительных пигментов. Соответствия этих шаблонов формам спектров A1-A2 зрительных пигментов позвоночных выверены многочисленными биохимическими исследованиями. Известны попытки применения шаблонов зрительных пигментов позвоночных для анализа спектров поглощения зрительных пигментов беспозвоночных животных. Однако правомерность такого подхода требует систематической проверки на достаточно представительной выборке разных видов беспозвоночных животных. Поэтому одной из задач настоящей работы было оценить пригодность A1-A2- шаблонов зрительных пигментов позвоночных для анализа спектров поглощения рабдомов ракообразных. Работа направлена на разработку методических подходов для идентификации природы хромофора (A1/A2) зрительных пигментов ракообразных при микроспектрофотометрическом исследовании зрительных клеток. Объектом исследования служили одиночные изолированные рабдомы креветок *Leander modestus*, Decapoda. Показано, что максимум поглощения темнового родопсина *L. modestus* приходится на 533 нм, а максимум обесцвеченного пигмента – метародопсина на 495 нм. Согласно измерениям с гидроксиламином, оксим-форма витамина А зрительного пигмента *L. modestus* имеет максимум 367 нм, соответствующий витамину A1, но не витамину A2. Найдено, что спектры как темнового зрительного пигмента P533, так и обесцвеченного – M495 соответствуют по форме спектральным шаблонам A1-зрительных пигментов позвоночных животных.

Разработка эффективной системы получения и очистки рекомбинантного белка р66^{Shc} человека

Андреевская М.Ю., Черткова Р.В., Долгих Д.А. (Москва, ritandr@gmail.com)

Адаптерные белки семейства Shc, одним из представителей которого является р66^{Shc}, вовлечены в передачу сигнала от тирозинкиназных рецепторов внутрь клетки. При этом они регулируют активность факторов, ответственных за запуск Ras и MAP-киназного каскада, что выражается в изменении пролиферативной активности клетки. В частности, белок р66^{Shc} ингибирует последнюю. В отличие от других представителей семейства, р66^{Shc} имеет еще одну функцию: способность индуцировать митохондриальный апоптоз (р53-зависимый), вызванный окислительным стрессом, непосредственно участвуя в генерации АФК в клетке. Поэтому представляется интересным исследование роли белка р66^{Shc} в процессах старения, канцерогенеза и влияния его на продолжительность жизни как отдельных клеток, так и индивидуальных организмов. Для дальнейших более детальных исследований функций белка р66^{Shc} представляется актуальной разработка системы экспрессии и очистки белка р66^{Shc} для получения его в препаративных количествах. Ранее нами была получена экспрессионная конструкция на основе плазмидного вектора рЕТ-32а, в которой ген человеческого р66^{Shc} в слиянии с геном тиреодоксина (TRX) находился под контролем промотера фага T7, индуцируемого ИПТГ. Для последующей очистки и расщепления слитного белка TRX-р66^{Shc} в конструкции непосредственно перед 5'-концом гена р66^{Shc} имелись две последовательности, кодирующие 6 остатков His и сайт расщепления легкой цепи энтеропептидазы человека (L-NEP) соответственно. Была проведена оптимизация условий гибридной экспрессии в данной конструкции. В настоящей работе осуществлены наработка TRX-р66^{Shc} и очистка его с помощью металл-хелатной хроматографии на сорбенте Ni-NTA-агароза (Qiagen, США), подобраны условия

расщепления слитного белка протеазой L-NEP. Однако в ходе электрофоретического анализа продуктов расщепления не было обнаружено белка с молекулярным весом, рассчитанным для $p66^{Shc}$ (62 кДа). В то же время среди них присутствовали продукты с кажущимся молекулярным весом в 30 и 40 кДа. Анализ их *N*-концевых последовательностей позволил установить наличие в аминокислотной последовательности $p66^{Shc}$ неспецифического сайта (DR), по которому также осуществляется расщепление L-NEP, что приводит к невозможности получения нативного целевого белка. В связи с этим ген $p66^{Shc}$ был переклонирован в новую экспрессионную конструкцию, аналогичную предыдущей, но содержащую последовательность, которая кодирует сайт расщепления протеазой «фактор Ха» вместо L-NEP. Эту систему экспрессии гибридного белка оптимизировали по трем параметрам: а) температура инкубации клеточной культуры; б) время инкубации; в) концентрация индуктора экспрессии ИПТГ. Затем была предложена предварительная схема очистки TRX- $p66^{Shc}$, включающая в себя комбинацию металл-хелатной (Ni-NTA-агароза) и анионообменной хроматографии (Macro Prep High Q, Bio-Rad, США); подобраны условия расщепления слитного белка «фактором Ха» и очистки целевого $p66^{Shc}$ на Ni-NTA-агарозе.

Компьютерное моделирование процессов диффузии в гидратированных фосфолипидных бислоиных структурах

Антонов М.Ю. (Москва, mikhail@moldyn.org)

Одним из важнейших свойств биологических мембран является свойство полупроницаемости. Выполнение мембраной барьерной и транспортной функций во многом зависит от ее физико-химических и кинетических параметров, определяемых липидным и белковым составом. Использование экспериментальных методов исследования проницаемости мембранных структур позволяет определять кинетические параметры прохождения малых молекул через гидратированные липидные бислои, однако эти методы не могут предоставить детальную информацию о динамике проникновения молекул через липидный бислой. Поэтому использование метода молекулярной динамики для исследования проницаемости биомембран представляет с этой точки зрения несомненный интерес. Поскольку процесс диффузии через липидные бислои происходит относительно медленно, на временах доступных МД изучать спонтанную диффузию не целесообразно. Поэтому был применен метод неравновесной управляемой молекулярной динамики, который позволяет за разумные времена численного эксперимента дать количественную оценку параметрам, характеризующим физические механизмы диффузии в микрогетерогенных структурах. Было проведено сравнительное изучение проницаемости трех модельных фосфолипидных бислоиных структур различного состава для ряда представляющих интерес с биологической точки зрения типов низкомолекулярных соединений. В качестве исследуемых мембран, использовались системы, состоящие из липидов в различных пропорциях: 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин, 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин, 1,3-(1-стеароил-2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидил)-глицерин (кардиолипин). В неравновесном эксперименте к пробным молекулам прикладывалась дополнительная постоянная сила F_{ext} , действующая в направлении нормали к поверхности мембраны. Исходя из полученных данных, производилась оценка усредненного локального коэффициента трения, который далее пересчитывался в терминах эффективной микровязкости среды или коэффициента диффузии, используя соотношение Стокса-Эйнштейна. Изучение неоднородности микровязкости по отношению к уровню нормали бислоя показало, что локальная микровязкость значительно различается в разных частях бислоя. При этом область липидных голов оказывается наиболее вязкой и чувствительной к химической природе пробных молекул.

Вязкость в гидрофобной сердцевине бислоя при этом значительно меньше, при этом она менее чувствительна к химической природе проникающих молекул. Вычисляемые таким способом кинетические параметры проникновения молекул через липидные бислои позволяют с достаточно хорошей точностью изучать проницаемость мембран различного липидного состава для лигандов различной химической природы и проводить сравнительное изучение на микроуровне эффективных вязкостных характеристик различных мембранных структур и диффузионных свойств малых молекул, что труднодоступно в обычных экспериментах. Данные исследования представляют интерес для изучения свойств и функционирования биологических мембран. Работа поддержана РФФИ (07-04-01169, 06-04-08136), Роснаукой, Рособразованием и US CRDF. Научный руководитель работы – профессор, д.ф.-м.н. К.В. Шайтан.

Фотоокисление БХл850 синим светом не вызывает разрушения структуры антенных комплексов из *Allochrochromatium minutissimum* с разным содержанием каротиноидов
Ашихмин А.А., Большаков М.А. (Пушино, lfbv22@rambler.ru; Орёл, alex-asch@rambler.ru)

Исследовали влияние фотоокисления молекул БХл с полосой поглощения при 850 нм (БХл850) комплекса LH2 в мембранах *Allochrochromatium minutissimum* под действием синего света, поглощаемого каротиноидами, на структуру этого комплекса. Были изучены четыре образца с разным содержанием (от 100 до 3-5%) и составом каротиноидов, которые получены ингибированием синтеза каротиноидов дифениламином при выращивании бактерий. Образец №1 – это контроль (содержание каротиноидов 100%). Основными каротиноидами в нем являются родопин, дидегидрородопин и спириллоксантин. В образце №2 (67% каротиноидов от контроля) основные каротиноиды – ОН-нейроспорин и дедигидрородопин. Образец №3 содержит около 40% каротиноидов по сравнению с контролем (основные – ОН-нейроспорин и Z-каротин). Смещение биосинтеза каротиноидов в образцах №2 и №3 до нейроспорина приводит к тому, что полосы поглощения в каротиноидной области более структурированы и смещены в синюю область с 485 нм (контроль) до 451 нм. В образце №4 содержится > 3-5% каротиноидов от контроля. Основные каротиноиды – это Z-каротин и фитоин. После облучения синим светом в спектре поглощения контрольных мембран (образец №1) наблюдается быстрое уменьшение полосы БХл850 комплекса LH2 и появляется полоса при 698 нм, которая соответствует продукту окисления БХл. Одновременно в этом образце происходит уменьшение полосы Qx-перехода БХл при 591 нм и перераспределение полос поглощения каротиноидов (уменьшение полос при 485 и 520 нм и увеличение при 459 нм). Однако разностный спектр поглощения образца №1 свидетельствует, что изменения в каротиноидной области связаны в основном с изменениями поглощения полосы Core БХл. Разностные спектры поглощения (“облученный образец минус контроль”) всех исследованных образцов показывают, что независимо от содержания и состава каротиноидов, изменения в них достаточно похожи. Во всех образцах наблюдается выцветание длинноволновых полос поглощения комплексов LH1 и LH2. Однако оно уменьшается при снижении содержания каротиноидов. В образцах №1-3 этот процесс сопровождается появлением окисленного продукта, содержание которого резко снижено в образце №4. По данным электрофореза в полиакриламидном геле весь окисленный БХл сохраняется в структуре комплекса LH2. После окисления основной части молекул БХл850 каротиноидный состав в комплексах LH2 не изменялся. Продукт фотоокисления БХл идентифицирован по спектру поглощения и данным ВЭЖХ. Установлено, что при окислении БХл происходит образование двойной связи в кольце «В» в позиции 7-8. Таким образом, окисление происходит в той части молекулы БХл, которая существенна для его спектральных

характеристик, так как изменяется система сопряженных двойных связей. (РФФИ 09-00522).

Распределение потоков электронов в дыхательной и фотосинтетической цепи в клетке *Synechocystis* sp.

Бабакова Т.С. (Москва, armino@yandex.ru)

Цианобактерии – граммотрицательные прокариоты, способные осуществлять кислородный фотосинтез. Предполагается, что клетки высших растений являются результатом симбиоза цианобактерий и нефотосинтезирующих одноклеточных организмов. Цианобактерия *Synechocystis* sp. стала первым фотосинтезирующим организмом, чей геном был полностью расшифрован, и в настоящее время служит важнейшим модельным объектом исследований процессов фотосинтеза. Клетки *Synechocystis* sp. обладают полным фотосинтетическим аппаратом, характерным для хлоропластов высших растений. Фотосинтетическая электрон-транспортная цепь включает фотосистему (ФС) II, b_6f -цитохромный комплекс и ФС I. Конечным акцептором электронов служит ферредоксин, донором электронов — вода, расщепляемая в системе окисления воды. Дыхательная электрон-транспортная цепь расположена на цитоплазматической и тилакоидных мембранах и содержит белки, типичные для дыхательной электрон-транспортной цепи, такие как NAD(P)H-дегидрогеназы (NDH-1 и NDH-2), цитохром- b_6f -комплекс и терминальные оксидазы. Целью исследования было определение относительного вклада основных электронных потоков через пул пластохинонов, используя экспериментальные данные о степени восстановленности пула пластохинонов в мутантных штаммах по одному из основных фотосинтетических или дыхательных комплексов. Рассматривались три основных пересекающихся пути: линейная фотосинтетическая электрон-транспортная цепь (от PSII), дыхательная цепь от NADPH и сукцината (через сукцинатдегидрогеназу), до цитохромоксидазы и циклическая электрон-транспортная цепь, включающая PSI, электроны с акцепторной части PSI возвращаются на пластохинон. Было показано, что при увеличении интенсивности света растет доля потока идущего от фотосистемы II, поток через NAD(P)H-дегидрогеназу NDH-1 уменьшается, а потоки через сукцинатдегидрогеназу и NAD(P)H-дегидрогеназу NDH-2 практически не зависят от интенсивности освещения клеток.

Кинетическое моделирование метаболизма простагландинов в эндотелиальной клетке: роль в системе гемостаза

Багрова Н.Н., Косинский Ю.А., Смирнов С.В., Демин О.В. (Пушино, Санкт-Петербург, Москва, bagrova.natalia@gmail.com)

Простаноиды (простагландины и тромбоксаны) – это производные арахидоновой кислоты, участвующие в передаче сигналов между клетками. Простаноиды синтезируются практически всеми клетками организма и участвуют в регуляции различных процессов, таких, как гемостаз, воспалительный ответ и др. Существует целый ряд препаратов, например, аспирин, индометацин, ибупрофен, целекоксиб, действие которых основано на ингибировании циклооксигеназы – ключевого фермента, ответственного за синтез простаноидов. Эти ингибиторы широко используются в медицине в качестве ключевых компонентов обезболивающих препаратов при лечении хронических воспалений. Одним из вредных побочных действий таких ингибиторов является нарушение гемостаза. К основным клеткам, задействованным в процессе тромбообразования, относятся тромбоциты и эндотелиальные клетки. На тему механизмов синтеза, его ингибирования и метаболизма простаноидов в эндотелиальной клетке в литературе существует огромное количество данных. На их основе мы

разработали кинетическую модель метаболизма и сигналинга простагландинов, способную описать существующие экспериментальные зависимости. Были выделены ключевые ферменты и другие белки, необходимые для описания метаболизма простагландинов в эндотелиальной клетке. Получено качественное воспроизведение некоторых экспериментальных зависимостей. Ведется работа по улучшению количественного описания существующих экспериментальных данных. Результаты проделанной работы уже можно использовать в качестве шаблона для создания модели синтеза и сигналинга простагландинов в любом другом типе клеток организма.

Использование ПЦР, выявляющей раково-тестикулярные антигены, для ранней диагностики онкологических заболеваний

Белова Т.В. (Нижний Новгород, belih59@list.ru)

Раково-тестикулярные антигены в норме экспрессируются клетками плаценты и семенников. Появление экспрессии этих антигенов в других тканях связано с развитием опухоли в организме. Опухоль-специфичный профиль экспрессии раково-тестикулярных антигенов очень удобен для использования при диагностике онкологических заболеваний различных гистологических типов. Целью данной работы было определить частоту встречаемости раково-тестикулярных антигенов MAGE-A1-6, NY-ESO-I, XAGE, GAGE, PAGE и MAGE-C7. Исследование проводилось при помощи метода обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с использованием специфических праймеров. Было протестировано образцы крови и клеток опухолевого очага 60 больных с клинически подтвержденным диагнозом рака прямой кишки. Наличие MAGE-A1-6 было показано для 82% протестированных образцов опухолевого очага (49 из 60), NY-ESO-I – 91% (55 из 60), GAGE и PAGE – 18% (11 из 60), XAGE – 35% (21 из 60) и MAGE-C7 – 47% (28 из 60). В образцах крови взятых у тех же больных MAGE-A1-6 были выявлены в 75% случаев (45 из 60), NY-ESO-I – 93% (56 из 60), PAGE – 8% (5 из 60), XAGE – 17% (10 из 60), GAGE – 3% и MAGE-C7 – 42% (25 из 60). Суммарная встречаемость раково-тестикулярных антигенов в крови онкологических больных на первой стадии рака прямой кишки составила 46%. На второй 67%, 70% – на третьей и 97% – на четвертой стадии заболевания. Высокая частота выявления MAGE-A1-6, NY-ESO-I, XAGE, GAGE, PAGE и MAGE-C7 как в клетках опухолевого очага, так и в крови больных позволяет рассматривать их в качестве кандидатов для ранней диагностики и мониторинга онкологических заболеваний, в том числе с использованием биочипа.

Влияние продолжительного ритмического возбуждения и демиелинизации на функционирование миелинизированных нервных волокон

Бибинейшвили Е.З. (Москва, vedmezhonik@mail.ru)

Проблема заболеваний, связанных с нарушениями проведения нервного возбуждения, весьма важна. Выполнение нервным волокном своих естественных функций способно воздействовать на структуру и метаболизм нервных волокон, в том числе на геометрию шванновской клетки, содержание в ней кальция и содержание кальция в митохондриях. Эти изменения, возникающие из-за демиелинизации, сказываются на параметрах проведения нервного импульса. В связи с этим значительный интерес представляет исследование совместного действия демиелинизирующих агентов и продолжительного возбуждения нервов, как ритмического, так и системного. В настоящей работе проводилось исследование перераспределения мембранно-связанного Ca^{2+} и потенциала митохондриальных мембран при действии демиелинизирующего агента лизофосфатидилхолина на фоне ритмической стимуляции нерва, блокирования потенциалзависимых K^+ -каналов и

деполяризации, вызванной повышением концентрации K^+ в физиологическом растворе. Для экспериментов использовался седалищный нерв травяной лягушки. Исследование проводилось методом флуоресцентной микроскопии. Перераспределение мембранно-связанного кальция и изменение потенциала на мембране митохондрий определяли по изменению интенсивности флуоресценции зондов Rh 123 и ХТЦ.

Исследование взаимодействия фуллеренов и углеродных нанотрубок с биологическими мембранами методом молекулярной динамики

Боздаганян М.Е. (Москва, m.bozdaganyan@gmail.com)

Одним из важнейших этапов развития нанотехнологии стало открытие фуллеренов и нанотрубок во второй половине 80-х годов. Это замкнутые поверхностные структуры углерода, которые проявляют специфические свойства как своеобразные материалы, как физические объекты и как химические системы. Обладая высокой электроотрицательностью, фуллерены выступают как сильные окислители в химических реакциях, а это, в свою очередь, позволяет синтезировать новые вещества на их основе. Так, производные фуллерена могут выступать в роли антиоксидантов и противоаллергических веществ; обладают цитопротективной и антибактериальной активностями; могут быть причиной перекисного окисления липидов; взаимодействуют с различными белками. Активно ведутся исследования по применению нанотрубок в биологии и медицине. В частности, разработан датчик на основе нанотрубок, позволяющий быстро измерять уровень сахара в крови. Исследуются механизмы взаимодействия нанотрубок с биологическими объектами. Последние токсикологические исследования показывают, что фуллерены и нанотрубки могут проникать через мембрану в клетки и влиять на выполняемые ими функции. Вдыхаемые ультратонкие наночастицы оседают в легких и далее с током крови попадают в мозг (преимущественно в обонятельную луковицу), преодолевая гематоэнцефалический барьер. Токсичность углеродных наночастиц зависит от их растворимости, например, цитотоксичность немодифицированного фуллерена в 7 раз выше, чем у его производных с высокой растворимостью в воде. Однако механизмы, благодаря которым наночастицы с такой легкостью проникают через мембрану, до сих пор мало изучены. В данной работе предлагается использовать метод молекулярной динамики для детального изучения механизмов взаимодействия наночастиц между собой в водной фазе и с биомембранами. В качестве объектов исследования были выбраны: билипидная мембрана из 100 дипальмитоилфосфатидилхолинов в воде, фуллерен C_{60} и углеродная нанотрубка (9, 9). Для произведения расчетов использовался программный пакет GROMACS. На начальном этапе проводились исследования наночастиц в воде для того, чтобы оценить, насколько применимы модели (рассчитаны коэффициенты диффузии, радиальные функции распределения). Параметры силового поля OPLSAA были подобраны верно, произведенные расчеты совпали с литературными данными. Далее изучалось проникновение фуллерена и нанотрубки через мембрану. Изучались динамика адсорбции и проникновения наночастиц, построены энергетические профили. Также построены графики зависимости расстояния от центра мембраны до центра массы фуллерена и нанотрубки, произведены расчеты изменения диффузии липидов в мембране после проникновения фуллерена и нанотрубки.

Встраивание каротиноидов в светособирающие комплексы LH2 из *Allochrodatum minutissimum* in vitro

Большаков М.А. (Пушино, lfbv22@rambler.ru)

Встраивание каротиноидов является одним из эффективных подходов для изучения роли каротиноидов и позволяет исследовать три вида образцов: 1 – со встроенными in

vivo каротиноидами (контроль); 2 – без каротиноидов; 3 – со встроенными in vitro каротиноидами. Ранее нами было показано, что in vivo каротиноиды встраиваются в комплексы неравномерно. Цель работы – исследовать встраивание каротиноидов in vitro в периферический светособирающий комплекс LH2 из серной фотосинтезирующей бактерии *Alc. minutissimum* и сравнить свойства полученных образцов с соответствующими характеристиками контрольных и бескаротиноидных комплексов. Клетки *Alc. minutissimum* выращивали, в присутствии ингибитора каротиноидгенеза дифениламина (12 мг/л). Каротиноиды экстрагировали ацетон/метанольной смесью (7/2) с последующим их переводом в петролейный эфир и высушивали под током аргона. Встраивание проводили добавлением экстракта каротиноидов ($A_{475}=0.7$) в ацетон/метаноле к бескаротиноидным хроматофорам. Растворитель удаляли диализом в течении 30 мин, а затем регистрировали спектр поглощения и добавляли следующую порцию каротиноидов. Максимального встраивания удалось добиться после добавления 8-12 порций каротиноидов. Чтобы отделить комплексы LH2 от свободных каротиноидов проводили электрофорез в полиакриламидном геле. Комплексы LH2 элюировали из геля и концентрировали. Были получены образцы с максимальным ($\approx 90\%$) и средним ($\approx 50\%$) содержанием каротиноидов по отношению к контрольному комплексу LH2. Анализ каротиноидного состава проводили методом ВЭЖХ (HPLC) на колонке Spherisorb ODS2, используя детектор с диодной матрицей SPD-M20A (Shimadzu). По спектру поглощения в каротиноидной области (максимум при 488 нм) комплексы LH2 со встроенными каротиноидами были похожи на контрольный образец (максимум при 488 нм). Аналогичные результаты были получены при измерении спектров КД. В экстракте каротиноидов, которые встраивались в комплекс LH2 присутствовали родопин (66.2%) спириллоксантин (3.4%) и дедгигидрородопин 14.1% 16.3% других каротиноидов. Избирательного встраивания отдельных каротиноидов в комплекс не обнаружено. Комплексы со встроенными каротиноидами восстанавливали термоустойчивость структуры и разрушались в том же интервале температур как и контрольные образцы, в отличие от бескаротиноидных комплексов, которые были термолабильны облучению синим светом, для выявления динамики окисления мономерного бактериохлорофилла и сравнения всех полученных данных с контролем и ранее полученными данными. При освещении контрольных образцов мы наблюдали выцветание полосы поглощения БХл850 и образование окисленного продукта (пик при 698 нм). В бескаротиноидных мембранах данный процесс практически отсутствовал. В комплексах LH2 со встроенными каротиноидами БХл850 легко окислялся. Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что каротиноиды встроились на свои места в структуре комплекса LH2. (РФФИ 09-00522).

Исследование действия He-Ne лазерного излучения на ферментативную активность Na^+ , K^+ -насоса зародышей вьюна

Бура М.В., Мандзинец С.М. (Львов, mcelevych@yahoo.com)

Эффекты влияния He-Ne лазерного излучения исследовали на многих биологических объектах на молекулярном, клеточном и органном уровнях. При воздействии на изолированном нейроне виноградной улитки He-Ne лазерное излучение вызывало обратимую деполяризацию, которая коррелировала с его интенсивностью, причем эффекты излучения зависели от исходной величины мембранного потенциала нейронов. He-Ne лазерное излучение увеличивало пролиферацию шванновских клеток, стимулировало деление астроцитов и активировало синтез макроэргов. Вместе с тем механизмы биологического действия He-Ne лазерное излучение изучены недостаточно. При некоторых патологических состояниях организма значительно изменяется активность натриевого насоса, например при диабете и ишемии она существенно понижается, Na^+ , K^+ -АТФазе также принадлежит важная роль в обеспечении

функциональной активности сократительных и подвижных клеток репродуктивной системы – миоцитов матки и сперматозоидов. Известно, что Na^+ , K^+ -насос, определяет увеличение уровня трансмембранного потенциала и отвечает за осмотичность бластоцелия зародышей в раннем развитии вьюна. Функциональная роль Na^+ , K^+ -АТФазы в генерации потенциалов, а также в раннем эмбриогенезе довольно велика, поэтому изучение влияния на нее лазерного излучения имеет важное теоретическое и прикладное значение. Объектом исследования были зародыши вьюна (*Misgurnus fossilis* L.) в период раннего эмбриогенеза. В качестве источника использовали He-Ne лазер с длиной волны 632,8 нм отечественного производства. Зародыши вьюна облучали после оплодотворения на протяжении 1, 3 и 5 минут с помощью световода (диаметр выходной линзы 1,2 мм с плотностью потока мощности $1,5 \times 10^{-3}$ Вт/м²); пробы отбирали на стадиях 2 и 64 бластомеров, 10 делении (соответствует 60, 210, 330 минутам развития зародышей). В ходе проведенных исследований установлено, что в зависимости от протяжения облучения He-Ne лазером изменения активности Na^+ , K^+ -АТФазы зародышей имеют разнонаправленный характер. На стадиях развития 2 и 64 бластомеров и 10 деления при одноминутном облучении отмечено снижение Na^+ , K^+ -АТФазной активности в среднем на $38,8 \pm 0,9\%$ в сравнении с контролем. При 5 минутном облучении зародышей также происходило достоверное снижение активности АТФазы зародышей ($40,8 \pm 1,1\%$) на исследуемых стадиях развития. Лазерное облучение зародышей на протяжении 3 мин имело благоприятный характер, поскольку отмечено восстановление значений активности Na^+ , K^+ -АТФазы зародышей до уровня контроля. Результаты работы свидетельствуют о возможности лазерного излучения модулировать динамические процессы в цитоплазматической мембране зародышей за счет поглощения фотоакцепторными молекулами, что может привести изменениям конформационных свойств макромолекул и, соответственно, к восстановлению скорости мембранозависимых процессов деления клеток зародышей. Авторы выражают признательность профессору, д.б.н. Д.И. Санагурскому за помощь в подготовке тезисов.

Динамика фотосинтетической активности клеток в течение клеточного цикла *Scenedesmus quadricauda*

Волгушева А.А., Иванова Э.В., Низовская Н.В. (Москва, volgusheva_alena@mail.ru)

Синхронно выращенная культура водорослей является прекрасным объектом для изучения метаболических процессов в течение жизненного цикла. Хлорококковая зеленая водоросль *Scenedesmus quadricauda* была выращена на минеральной среде (Setlik et al., 1981). Культуру водорослей синхронизировали чередованием 16 ч света и 8 ч темноты, при 28°C с постоянной продувкой смеси воздуха и 2% CO_2 в биореакторе. Данный прибор позволяет непрерывно, непосредственно в биореакторе, измерять такие важные характеристики как: изменение растворенного в воде O_2 и CO_2 , pH, температуру, параметры флуоресценции (индуцированные синим светом – 455 нм и красным – 627 нм) и оптическую плотность (Nedbal et al., 2008). Важным преимуществом данного эксперимента является то, что спектральный профиль и интенсивность актиничного света точно имитировали естественное освещение в течение дня. Максимальная интенсивность света в середине дня составляла $750 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ и $250 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ в синем и красном диапазоне, соответственно. Регистрацию изменения активности фотосинтеза и дыхания проводили с помощью электрода Кларка и pCO_2 – электрода. Максимальную скорость выделения O_2 и CO_2 измеряли каждый час на протяжении всего эксперимента (48 ч). Эксперимент начинали с темнового периода. Во время последующего светового периода параметр *F_t* увеличивался за счет роста концентрации хлорофилла. Максимальная флуоресценция уменьшалась с увеличением интенсивности света за счет развития нефотохимического тушения. Эффективность преобразования энергии в ФС2 на свету достигало минимума в полдень (когда интенсивность света максимальна) за

счет перехода большей части реакционных центров в закрытое состояние. В начале периода освещения скорость фотосинтеза достигала $10 \text{ мкМоль}(\text{O}_2) \cdot \text{мМоль}(\text{Хл})^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Она увеличивалась в течение первых трех часов освещения до $52 \text{ мкМоль}(\text{O}_2) \cdot \text{мМоль}(\text{Хл})^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, а затем, с увеличением интенсивности света, быстро уменьшалась до первоначального уровня. Аналогичный результат был получен на синхронной культуре *Scenedesmus armatus*. Авторы предположили, что эти изменения могут быть связаны с изменениями в антенном комплексе, в том числе и в каротиноидном составе. Так было показано увеличение количества лютеина после нескольких часов светового периода (Tulaj et al., 2003). Эти данные согласуются с наблюдаемыми нами изменениями в соотношении флуоресценции возбуждаемой «красным» и «синим» светом, что указывает на изменения в каротиноидном составе.

Угнетение фагоцитоза у макрофагов IC-21 в присутствии сыворотки

Головкина М.С. (Москва, gmarusja@gmail.com)

Фагоцитоз – один из важнейших клеточных процессов, который обеспечивает поглощение клеткой частиц размерами 0.5 микрон и более. В ходе этого процесса плазматическая мембрана клетки образует вокруг частицы везикулу, которая затем транспортирует частицу внутрь клетки. Одним из ранних событий, происходящих после контакта частицы с клеткой, является образование в мембране липидных микродоменов, богатых холестерином и сфингомиелином (рафтов). Сегрегация в этих доменах мембранных рецепторов и, возможно, других интегральных белков является необходимым условием для запуска дальнейшего биохимического каскада, обеспечивающего протекание фагоцитозного процесса. Однако целостной картины реакций пока не существует. В данной работе, в ходе исследований роли некоторых холестерин-зависимых белков в механизме фагоцитоза, было обнаружено значительное угнетение активности фагоцитоза культивируемыми макрофагами мыши IC-21 в присутствии эмбриональной сыворотки. Хотя в экспериментах сыворотку в ряде случаев не добавляют или не пишут о ее присутствии, при фагоцитозе *in vivo* естественно присутствие сыворотки; поэтому изучение и обсуждение ее эффектов представляется целесообразным. Параметры фагоцитоза определяли с помощью флуоресцентной микроскопии по количеству ассоциированных с клетками 2-мкм неопсонизированных флуоресцентных латексных частиц после 90-мин инкубации в тестируемой среде. Подсчет частиц проводили с помощью специально адаптированной программы ImageJ. Доля фагоцитирующих клеток (phagocytosis percent, PP) и среднее число частиц в фагоцитирующих клетках (phagocytosis index, PI) в стандартной культуральной среде Дульбекко (DMEM), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS), составляли, соответственно, $55 \pm 5\%$ и 2.0 ± 0.2 частиц/клетку (среднее \pm SE по 8 эксп.). В среде DMEM без сыворотки показатели PP и PI были почти в 2 раза выше и составляли, соответственно, $92 \pm 1\%$ и 4.3 ± 2 частиц/клетку (12 эксп.). В присутствии 5% FCS угнетающий эффект был выражен слабее. Поскольку одним из основных белковых компонентов сыворотки является сывороточный альбумин, способный экстрагировать из мембраны ненасыщенные жирные кислоты, можно предположить, что действие сыворотки обусловлено именно этим эффектом. Для проверки этого предположения клетки инкубировали в среде DMEM без сыворотки в присутствии 10 мг/мл альбумина. В этих условиях активность фагоцитоза практически не отличалась от контроля (DMEM). Сыворотка является также основным источником экзогенного холестерина. Чтобы проверить, является ли удаление холестерина фактором, стимулирующим фагоцитоз, мы использовали холестерин-секвестрирующий агент метил-бета-циклодекстрин (мбЦД). Однако присутствие в среде 4–8 мМ мбЦД не стимулировало, а угнетало фагоцитоз. Полученные данные позволяют заключить, что подавление фагоцитоза в присутствии сыворотки не связано с экстракцией альбумином из мембраны

ненасыщенных жирных кислот. Активирующее действие удаления сыворотки, по-видимому, не связано непосредственно с удалением экзогенного холестерина. Возможно, эффект сыворотки связан с конкуренцией за рецепторы. В любом случае при постановке экспериментов необходимо учитывать присутствие сыворотки. Автор выражает признательность к.б.н. А.Я. Дуниной-Барковской за помощь в организации экспериментов и подготовке тезисов, а также И. Скачкову за написание соответствующего макроса к программе.

Противоопухолевая активность нанокompозита аэросил-фуллерен C₆₀ в модельном эксперименте на животных

Дворченко О.С., Диденко Г.В., Шпак Э.Г. (Киев, Украина, dos031077@yandex.ru)

Целью работы было исследовать противоопухолевую активность нанокompозита аэросил-фуллерен C₆₀ в модели на мышах-самцах линии C57Bl/6 с привитой карциномой легкого Льюис. Животным подкожно на спине перевивали 10⁶ опухолевых клеток (ОК) карциномы легкого Льюис. Нанокompозит аэросил-фуллерен C₆₀ (C₆₀) вводили на 29 сутки после перевивки опухоли (концентрация фуллерена на поверхности аэросила (площадь поверхности 290 м²/г) – 0,15 моль/гр.) суммарная доза 0,2 мг/курс. Животных подразделяли на следующие группы: 1-я гр. – животные с опухолью, 2-я гр. – животные с хирургически удаленной опухолью, 3-я гр. животные получавшие C₆₀. Животных забивали на 38 сутки после перевивки опухоли, определяли цитотоксическую активность клеток лимфоцитарного и макрофагального рядов и цитотоксическую активность сыворотки по отношению к аутологичным ОК, выделенным из первичного опухолевого узла (ПОУ) и метастатического узла (МУ) в легких в МТТ-тесте. Вес ПОУ в 1-й гр. составлял 1,39±0,33 гр., в 3-й гр. – 1,44±0,24 гр. Количество метастазов в легких в 1-й гр. – 37,5±7,4, а во 2-й и в 3-й гр. не отличалось от контрольных значений (22,5±7,5 и 23,6±5,4, соответственно). Объем метастазов (ОМ) в 1-й гр. изменялся в пределах 14,8÷981,1 мм³ (медиана – 219,5 мм³), во 2-й гр. варьировал 0,36÷836,3 мм³ (медиана – 44,9 мм³), в 3-й гр. составлял 0,2÷235,8 (медиана – 6,3 мм³). Во 2-й гр. отмечено достоверное (P_U<0,05) снижение ОМ. В 1-й гр. цитотоксический индекс (ЦИ) в реакции прямой цитотоксичности лимфоцитов составлял 28,5%, по отношению к ОК ПОУ и 23,9%, по отношению к ОК из МУ. Достоверное (P<0,05) повышение ЦИ (до 48,43%), по отношению к ОК ПОУ, наблюдали в 3-й гр., а по отношению к ОК из МУ наблюдали только во 2-й гр., где ЦИ составлял 41,24%. В реакциях антителозависимой цитотоксичности лимфоцитов ЦИ в 1-й гр. составлял 41,59%, по отношению к ОК ПОУ и 44,88% по отношению к ОК из МУ. В 3-й гр. достоверное повышение ЦИ (до 58,79%) наблюдали только по отношению к ОК ПОУ. ЦИ сыворотки крови в контрольной группе составлял 11,9±0,79%, по отношению к ОК ПОУ и 11,88%, по отношению к ОК из МУ. В 3-й гр. ЦИ по отношению к ОК из ПОУ был достоверно выше и составлял 30,69%, а к ОК из МУ достоверно повышался до значений 45,28%. Во 2-й гр. ЦИ достоверно повышался только по отношению к ОК из МУ (36,32%). Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о противоопухолевой активности нанокompозита аэросил-фуллерен C₆₀ на модели перевивной карциномы легкого Льюис у мышей, механизм реализации которой состоит в стимуляции антителозависимых реакций элиминации опухолевых клеток.

Существует ли связь между стабильностью белков к тепловой денатурации и к разрушению полиэлектролитами?

Дурденко Е.В., Дыбовская Ю.Н., Тухоненко С.А. (Пушино, ekaterina-durdenko@rambler.ru)

Хорошо сбалансированная структура белка с одной стороны обеспечивает ему стабильность на время жизни в клетке, с другой допускает широкомасштабные (long time) флюктуации, которые ответственны за многие биохимические функции белков, в том числе за скорость их деградации протеазами. В связи с этим хорошо известна корреляция между стабильностью белков к тепловой денатурации и стабильностью их к разрушению разными факторами, в частности расщеплению протеазами. Нашей задачей было определить, в какой мере стабильность белков к разрушению их полиэлектролитами соотносится со стабильностью их к тепловой денатурации. В нашей лаборатории ранее были проведены эксперименты по влиянию ряда полиэлектролитов на структурные и каталитические характеристики белков. Было показано, что присоединение некоторых полиэлектролитов – к этим белкам разрушает третичную структуру и больше половины α -спиральной структуры, приводя к полной их инактивации. Целью настоящего исследования является изучение физико-химических механизмов взаимодействия полиэлектролитов с мультисубъединичными белками и с помощью расчетов электростатического потенциала на поверхности белков выявление общих закономерностей в формировании таких комплексов, определяющих их функциональное состояние. В работе представлены сравнительные расчеты электростатического потенциала на поверхности белков, имеющих близкую пространственную конфигурацию цепи, но с разным числом субъединиц – миоглобина (Mb) и гемоглобина (Hb), а также лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и глутаматдегидрогеназы (ГДГ) для объяснения экспериментально полученных различий в комплексообразовании этих белков с полиэлектролитом. Проведены также экспериментальные исследования тепловой денатурации этих белков. Анализ экспериментальных данных и проведенных расчетов показали: 1) белки с близкой структурой имеют большие различия в стабильности их к разрушению полиэлектролитами: – ЛДГ и ГДГ различаются на 2 порядка по ингибирующей концентрации полиэлектролита; 2) стабильность белков к разрушению полиэлектролитом не коррелирует со стабильностью их к тепловой денатурации: Mb имеет $T_{ден}$ на 20° С выше, чем Hb, но менее стабилен к разрушению полиэлектролитом, температуры денатурации ЛДГ и ГДГ практически не различаются. Полный заряд белка также не определяет стабильность его к разрушению полиэлектролитом. 3) Одним из основных свойств белков, определяющих эффективность разрушения их полиэлектролитом, является особое распределение на его поверхности электростатического потенциала.

Изучение трансфекции клеток в культуре полиплексными наноконструкциями на основе конъюгатов полиэтиленimina, полиэтиленгликоля и ТАТ-пептида

Дурманов М.О. (Москва, misha_bi_phys@mail.ru)

Генная терапия – это направление лечения наследственных и приобретенных заболеваний (в т.ч. рака) путём внесения в клетки соответствующего генетического материала. Для доставки ДНК или РНК в клетки необходимо создание носителей (векторов), которые бы обеспечивали защиту, направленность и специфичность доставки в определённые типы клеток, а также обладали достаточной ёмкостью для переносимого генетического материала. В настоящее время все большее внимание уделяется созданию невирусных систем доставки с полностью контролируемым составом и свойствами. Одним из перспективных направлений является создание полиплексов – наноконструкций доставляемой ДНК с положительно заряженным

полимером. Полиэтиленимин (ПЭИ), блок-сополимеры и конъюгаты на его основе связываются с отрицательно заряженной ДНК, компактизуют её и предохраняют от действия нуклеаз в условиях *in vivo*. Полиплексы на основе ПЭИ эффективно адсорбируются на плазматической мембране за счёт избыточного положительного заряда и поглощаются клетками. Большое число положительных зарядов, однако, приводит к повышенной токсичности полиплексов. С целью её снижения используют модифицирование ПЭИ полиэтиленгликолем (ПЭГ), который обладает низкой токсичностью и высокой гидрофильностью. Кроме того, к комплексу ПЭИ-ПЭГ может быть присоединён дополнительный компонент, облегчающий проникновение полиплекса в клетку, например, ТАТ-пептид (фрагмент капсидного белка вируса иммунодефицита ВИЧ-1). В данной работе было изучено влияние состава полиплексов на основе конъюгатов ПЭИ-ПЭГ-ТАТ на эффективность трансфекции клеток линии А431 *in vitro*, а также распределение этих наноконплексов в клетках. Для работы использовали полиплексы на основе синтезированных в нашей лаборатории конъюгатов ПЭИ-ПЭГ-ТАТ с различными соотношениями компонентов. В качестве маркерного гена был выбран ген зелёного флуоресцентного белка. Клетки эпидермоидной карциномы человека линии А431 трансфицировали полиплексами. Анализ результатов трансфекции проводили при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss 510 META NLO. Проведенные эксперименты показали, что наибольшая эффективность трансфекции (свыше 70%) была достигнута при использовании полиплексов с малым соотношением ПЭГ/ПЭИ на клетках в культуре. Весьма эффективны (около 40%) были также полиплексы на основе конъюгатов с высоким соотношением ПЭГ/ПЭИ. Для изучения процесса переноса генетического материала в исследуемые клетки доставляемую ДНК метили флуоресцирующими квантовыми точками QDots 605, а конъюгат ПЭИ-ПЭГ-ТАТ красителем Су5. При помощи конфокальной лазерной сканирующей микроскопии проведена оценка транспорта полиплексов в культивируемые клетки, исследовано распределение этих наноконплексов внутри клеток, проведен анализ взаимодействия доставляемой плазмидной ДНК с конъюгатом ПЭИ-ПЭГ-ТАТ.

Исследование структурных свойств и пигмент-белковых взаимодействий мутантных реакционных центров *Rhodobacter sphaeroides* I(L177)Н с прочно связанным бактериохлорофиллом *a*
Забелин А.А. (Пушино, zabelin1982@mail.ru)

В фотосинтетических пигмент-белковых комплексах молекулы (бактерио)хлорофиллов и (бактерио)феофитинов слабо, главным образом, нековалентно связаны с белком. Недавно было показано, однако, что в мутантных реакционных центрах (РЦ) *Rhodobacter sphaeroides* I(L177)Н одна из четырех молекул бактериохлорофилла *a*, возможно Р_А, прочно связана с L-субъединицей белка. Сравнительные исследования РЦ I(L177)Н и РЦ дикого типа могли бы быть полезны при изучении особенностей пигмент-белковых взаимодействий и их роли в «подстройке» спектральных и окислительно-восстановительных свойств пигментов для эффективного осуществления основной функции РЦ – стабильного разделения зарядов. Для изучения особенностей пигмент-белковых взаимодействий, вызванных замещением изолейцина L177 на гистидин в РЦ точечного мутанта I(L177)Н, использованы методы фотоиндуцированной дифференциальной ИК-спектроскопии с фурье-преобразованием и кругового дихроизма. Функциональное состояние пигментов в фотохимически активной цепи кофакторов оценено методом фотонакопления восстановленного бактериофеофитина Н_А⁻. Полученные результаты сравниваются с данными для РЦ дикого типа. Показано, что в мутантных РЦ сохраняется димерная природа катион-радикала первичного донора электрона Р с асимметричным распределением заряда между молекулами

бактериохлорофиллов P_A и P_B в состоянии P^+ . Однако димеры P в РЦ дикого типа и I(L177)H структурно не идентичны друг другу вследствие, вероятно, молекулярных перестроек макроциклов P_A и P_B и(или) изменений в их ближайшем аминокислотном окружении, индуцированных мутацией. Анализ электронных спектров поглощения и дифференциальных инфракрасных спектров P^+Q^-/PQ позволяет предположить, что 17^3 -эфирная группа бактериохлорофилла P_A может быть вовлечена в ковалентное взаимодействие с белком в РЦ I(L177)H. Предложен механизм образования ковалентной связи между молекулой БХл и L-субъединицей белка мутантных РЦ, основанный на реакции переэтерификации 17^3 -эфирной группы бактериохлорофилла P_A остатком серина L244 с участием гистидина L177 в качестве каталитической группы. Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология» (№ 10 П)) и РФФИ (грант 06-04-48686).

Взаимодействие фотосинтетических пигмент-белковых комплексов и квантовых точек

Загидуллин В.Э. (Москва, vad-zag@yandex.ru)

Многие современные исследования в области фотосинтеза направлены на создание искусственных фотосинтетических систем на основе существующих пигмент-белковых комплексов. Изменение свойств этих комплексов при взаимодействии с наноструктурами, такими, как квантовые точки, является одним из важных направлений в этих исследованиях. Существующие теоретические работы показывают, что эффективность работы фотосинтетического аппарата может быть увеличена в несколько раз через подобные взаимодействия. Квантовые точки представляют собой полупроводниковые нанокристаллы, покрытые инертной полимерной оболочкой для защиты от химического взаимодействия с окружающей средой. Благодаря их высокой абсорбционной способности, могут играть роль дополнительных антенных комплексов для фотосинтетического аппарата. Современные технологии синтеза позволяют создать квантовые точки с квантовым выходом порядка 70%. Помимо этого, легко можно подобрать квантовых точки с максимумом флуоресценции, находящемся в нужном спектральном диапазоне, что свойство позволяет создать систему с эффективной миграцией энергии. Благодаря этим свойствам, квантовые точки являются многообещающим кандидатом на роль донора энергии возбуждения электронов в фотосинтетических системах. В качестве объектов исследования были выбраны раствор квантовых точек, реакционных центров пурпурных бактерий, а так же их смесь. Образцы исследовались при помощи лазерной кинетической флуорометрии в пико-наносекундном временном диапазоне, что позволяло оценить изменение флуоресценции каждого из компонентов в смеси, а так же оценить их функциональное состояние. Проведенные эксперименты показали, что квантовые точки способны донировать энергию возбуждения и тем самым усиливать работу реакционных центров, что было зарегистрировано как увеличение флуоресценции реакционных центров и, соответственно, уменьшение флуоресценции самих квантовых точек. Таким образом открываются большие перспективы по созданию гибридных фотосинтезирующих систем на основе пигмент-белковых комплексов и квантовых точек.

Применение методов лазерной интерференционной микроскопии и комбинационного рассеивания для оценки состояния клеток

Загубиженко М.В. (Москва, zagzone@gmail.com)

Предлагается комплексный метод анализа морфофункциональных параметров клеток, сочетающий использование метода лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ), который позволяет оценивать такие параметры клетки, как морфологию, объём

и общее содержание вещества и спектроскопии комбинационного рассеивания (КР), который, в свою очередь, позволяет оценивать состояние веществ, находящихся в клетке на уровне молекулярных связей. В качестве тестовых объектов использовались ядерные эритроциты травяной лягушки (*R. temporaria*) и безъядерные эритроциты человека в физиологических растворах с различной ионной силой. Для обоих типов эритроцитов было установлено, что в гипотонических растворах происходит увеличение объема клеток, а в гипертонических – уменьшение их объема. Эти изменения проявлялись в большей степени в случае эритроцитов человека. Для эритроцитов травяной лягушки в гипоосмолярном растворе также было зарегистрировано и увеличение размеров ядра, которое сопровождается уменьшением концентрации внутриклеточного содержимого; в гиперосмолярных условиях не было зарегистрировано морфофункциональных изменений в состоянии ядра. При этом изменение осмолярности не приводило к существенным изменениям состояния гемоглобина, оцениваемого при помощи КР-спектроскопии. Используемая методика позволяет оценить состояние клеток и тканей на различных уровнях их организации: от макро – оценка общих размеров клетки; до микро – оценка состояния клеточных органелл; и даже в нанометровом диапазоне – определение характеристик молекулярных связей. Это позволяет использовать данную методику для исследований в области бионанотехнологий.

Инженеринг биологических систем. Гипотеза

Казакова М.К. (Ташкент, Узбекистан, lametash@bcc.com.uz)

Анализ динамики процессов функционирования живых систем основан на огромном экспериментальном материале и избыточном числе гипотез. Безусловно, проведенные исследования позволили получить знания в области таких ключевых механизмов как передача информации, адаптация, взаимодействие живых организмов с окружающей средой, друг с другом, воспроизводства, изменчивости и многое другое. Вместе с тем многие вопросы, главным образом фундаментального характера, пока что остаются за пределами глобального понимания происходящих явлений. Это, по-видимому, связано с отсутствием единых представлений о взаимосвязи и взаимодействии биологических подсистем или иерархических уровней – уровня элементарных частиц и атомарного, молекулярного и межмолекулярного, клеточного и организменного, хотя теоретический вклад в понимание механизмов взаимодействия в иерархических системах значителен. Нами осуществлена попытка использования представлений «квантовой запутанности (entanglement)» в объяснении информационных взаимодействий подуровней биологических систем. О «запутанности» говорят, когда состояние двух (или более) квантовых систем должно описываться во взаимосвязи друг с другом, даже если сами системы разнесены в пространстве. Соответственно, физические свойства каждой из систем связаны с физическими свойствами другой, при этом они могут находиться не рядом и ничем не соединяться. Ранее считалось, что «запутывать» можно только фотоны, электроны и атомы, теперь же теоретически обосновано, что можно телепортировать любые частицы и даже «большие» молекулы. Кроме того, в настоящее время сформировано представление о том, что квантовая запутанность позволяет создавать супершифрованные сообщения и шифровальную сеть глобальных размеров, причем информация в этой сети передается со скоростью, большей скорости света. Так как биологические объекты представляют собой системы кодов, шифров и их раскодирования, то при определенном уровне абстрагирования, представления квантовой запутанности, по нашему мнению, можно использовать для анализа передачи генетической информации. Эти представления могут быть полезными при расшифровке механизмов патологий, и в частности, распространения метостаз при онкологических заболеваниях на информационном уровне. Можно также предположить и то, что гомеостаз является информационной системой в живых организмах, которая «создает и

сохраняет» квантовую запутанность – возможность клонирования, телепортации и даже левитации. Автор выражает искреннюю благодарность к.б.н. И.Н. Рубану и д.х.н. Н.Л. Воропаевой за помощь в работе.

Изменение устойчивости плазматической мембраны макрофагов к повреждающему действию H_2O_2 в присутствии ряда агентов

Кедров А.В. (Москва, terebra@mail.ru)

С использованием техники зондового микрофлуориметрического анализа было изучено влияние H_2O_2 и ряда биологически активных агентов на целостность плазматической мембраны и внутриклеточный рН перитонеальных макрофагов самцов беспородных белых мышей. Были исследованы основные закономерности повреждающего действия H_2O_2 на мембрану макрофагов. Это позволило подобрать оптимальные условия для создания клеточной тест-системы, с помощью которой проводилось изучение защитного действия на клетки ряда агентов, а также изменения в этих условиях внутриклеточного рН. Полученные данные показали, что увеличение концентрации H_2O_2 до 10 mM при инкубации с макрофагами приводит к возрастанию до 50% относительного содержания в их популяции клеток с поврежденной клеточной мембраной. Выраженность эффекта снижалась при введении в среду некоторых агентов (в число которых входили пептиды Semax и PGP). Макрофаги, сохранившие целостность мембраны после воздействия H_2O_2 , имели внутриклеточный рН более низкий по сравнению с исходным; сдвиг рН в кислую область достигал значений 0,4 единиц рН. Также было показано, что действие исследуемых пептидов само по себе приводит к подкислению внутриклеточного содержимого макрофагов. Таким образом, полученные данные указывают на возможное участие H^+ в реализации защитного действия пептидов Semax и PGP. Проводимые исследования являются этапом в работе по изучению клеточных механизмов защитного действия регуляторных пептидов от H_2O_2 -индуцированного окислительного стресса.

Изучение взаимодействия доменов DID и DAD белка mdia1 методом молекулярной динамики

Коромылова А.Д., Алова А.В. (Москва, anna.koromyslova@gmail.ru)

Такие клеточные процессы, как перемещение клеток, цитокинез, поддержание полярности клетки, везикулярный транспорт, морфология и иммунные реакции проходят благодаря подвижности актинового цитоскелета. Актиновые филаменты – это полярные структуры, характеризующиеся быстрорастущим оперенным концом и медленно растущим заостренным концом. Они регулируются внеклеточными раздражителями, которые активируют сигнальные цепи реакций. К ним же относятся и Rho-ГТФаза связывающие белки, которые, в свою очередь, в активном состоянии могут стимулировать образование актинового ядра и полимеризационного аппарата. Один из них, белок mDia1, содержит N-концевой домен, связывающий Rho-ГТФазу (GBD) и функциональный домен DID, который ингибируется доменом DAD, расположенным на C-конце белка. Активация белка mDia1 происходит после связывания GBD с активированной Rho-ГТФазой. С помощью ЯМР и биохимического анализа серии N-концевых структур было выявлено, что области контактов RhoГТФаза-DID и DID-DAD частично перекрываются, что позволяет предположить механизм конкурентного связывания и, как следствие, активирование белка mDia1 с помощью Rho-ГТФазы. Используя методы молекулярной динамики, были выделены пары аминокислотных остатков доменов DID и DAD, участвующих в образовании комплекса, проведена оценка стабильности структуры, выделены предполагаемые типы взаимодействий, приводящих к образованию комплекса, проведена оценка их вклада. Исследование

структуры и динамики комплекса mDia–Rho являются важным этапом на пути к пониманию молекулярных механизмов регуляции целой группы Ca-связывающих белков. Сравнение mDia1 с другими хорошо изученными эффекторами GTPаз позволяет раскрыть общую схему автоингибирования, что может иметь широкое применение во всех сигнальных системах, связанных с GTPазами.

Разработка матриксов на основе биополимеров микробиологического происхождения для депонирования и контролируемой доставки лекарственных средств

Кузьмина А.М., Горева А.В. (goreva_a@mail.ru)

В современной фармакологии приоритетным направлением является разработка новых подходов к созданию лекарственных систем пролонгированного действия, с возможностью адресной доставки препарата и контролируемого оттока препарата. Системы контролируемой доставки лекарств, в англоязычной литературе "drug delivery systems", представляют собой систему "лекарственный препарат – носитель", которая вводится в организм с целью контроля скорости оттока лекарства в организме. Перспективным материалом для создания таких систем являются полигидроксиалканоаты (ПГА) – резорбируемые и биосовместимые полимеры. Цель настоящей работы – конструирование матриксов из полигидроксиалканоатов для депонирования лекарственных средств в виде микросфер, таблетированных форм и пленок и изучение кинетики выхода препаратов *in vitro*. Для изготовления матриксов из ПГА использованы различные технологии – прессования, полив из раствора и испарение растворителя из эмульсий. Получены экспериментальные лекарственные формы антибиотиков группы аминогликозидов и карбопененов (гентамицин и тиенам), включенных в полимерный матрикс из ПГА в виде таблеток, пленок и микрочастиц. Выявлены оптимальные условия смешения препаратов с полимерной матрицей, охарактеризованы структура и свойства полученных лекарственных форм. Для выявления стабильности сконструированных лекарственных форм в биологических средах и исследование кинетики оттока препаратов проведены эксперименты в модельной среде *in vitro*. Установлено, что на кинетику оттока препарата в большей степени влияет способ изготовления, форма полимерного матрикса и степень нагруженности лекарственным препаратом. Кинетика оттока лекарственных препаратов из всех типов матриксов оказалась без резких выбросов в ходе эксперимента. Скорость выхода антибиотиков из полимерных микрочастиц зависела от величины включения антибиотика и была максимальной в первые два часа. Таким образом, невысокая скорость оттока препаратов из полимерных матриксов позволяет сделать вывод о перспективах использования полигидроксиалканоатов для создания новых лекарственных форм пролонгированного действия и перейти к экспериментам *in vivo*. Тезисы доклада основаны на материалах исследования, проведенных в рамках гранта Carl Zeiss. Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Т.Г. Воловой за помощь в подготовке тезисов.

Деконтаминация воды и растворов, загрязненных патогенными вирусами, с помощью сорбентов, приготовленных с использованием нанотехнологий

Курочкина Я.Е., Тимофеева А.В. (Москва, yaninakur@mail.ru)

В современных условиях вирусные инфекции занимают ведущее место в патологии людей и животных, в том числе, те из них, в распространении которых важную роль может иметь водный путь передачи (вирусы гриппа птиц, энтеровирусы и др.). В связи с этим большое значение для медицины, животноводства и ветеринарии является решение вопросов о деконтаминации и очистке воды, используемой для питьевых и

хозяйственно-бытовых нужд. Целью настоящей работы являлось изучение возможности удаления из растворов с помощью сорбентов патогенных вирусов человека и животных. Работу проводили с вирусами гриппа А, В и представителем энтеровирусов – вирусом полиомиелита, вакцинным штаммом типа 1 Сэбин. Материалы для сорбентов были приготовлены методами современных нанотехнологий. Были использованы 2 вида сорбентов: неорганический ультрадисперсный модифицированный графит (УДМГ) и органические – основание полианилина (Пан-О) и супрамолекулярные комплексы полианилина (ПАН), синтезированные химическим путем в присутствии поли-(2-акриламидо-2-метил-1-пропан-сульфоновой кислоты (Пан-ПАМПСК)). Электронно-микроскопические исследования показали, что форма выбранных сорбентов различна. Частицы сорбента УДМГ имеют полиморфную структуру и размеры от 20 до 100 мкм. Интерполимерные комплексы ПАН-ПАМПСК представляют собой нитевидные структуры длиной до 500 нм и диаметром 30-40 нм. Результаты исследования адсорбционных свойств 48 эталонных и эпидемических штаммов вирусов гриппа А и В, изолированных в период 1977-2008 гг., показали, что вирусы гриппа активно взаимодействуют с выбранными сорбентами, независимо от антигенной структуры поверхностных белков. Гемагглютинирующие титры вирусов после обработки растворов сорбентами уменьшались от 4 до 256 раз. Адсорбция проходила при широком диапазоне температур от 8-34 °С. Установлено, что выбранные сорбенты способны сорбировать вирусы полиомиелита, культивируемые в клетках VERO. Адсорбция проходила при комнатной температуре в течение 15-30 мин. Степень сорбции зависела от вида сорбента. Наибольший эффект наблюдался при использовании сорбента – Пан-О. После сорбции падение титров вирусов в растворах, регистрируемое по цитопатическому действию, было не менее чем на 4,0 lgТЦИД₅₀. На сорбенты также иммобилизовались белки невирусной природы широко используемый в иммунологических реакциях бычий сывороточный альбумин, аллантоисные белки куриных эмбрионов. Таким образом, проведенные исследования показали, что вирусы гриппа, полиомиелита, контаминировавшие растворы, белки не вирусной природы, могли иммобилизоваться сорбентами, приготовленными на основе современных материалов. Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю доктору биологических наук, ведущему научному сотруднику Ивановой Валерии Тимофеевне. Основные результаты получены в соавторстве д.х.н. В.Ф. Ивановым (ГУ НИИ физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН). Автор глубоко признателен и благодарен своим соавторам. Работа была частично поддержана грантами МНТЦ № 3718 и №3070.

Компьютерное моделирование ионных каналов, образованных антимикробными пептидами на примере зервамицина ПВ

Левцова О.В. (Москва, sunely@yandex.ru)

Зервамицин ПВ – антимикробный пептид, относящийся к классу пентайболов, продуцируемых микопаразитическими грибами родов *Emericellopsis*, *Trichoderma* и родственных им. Он состоит из 16 остатков и содержит нестандартные аминокислотные остатки: Aib (альфа-аминоизомасляная кислота), Iva (изовалин) и Nur (4-транс-гидроксипролин). Зервамицин ПВ взаимодействуют с клеточной мембраной, образуя ионные каналы и нарушая ее ионную проницаемость. Каналы образованные пептаиболом характеризуются многоуровневой проводимостью, каждый уровень соответствует каналу из разного количества молекул пептида. Предположительно, каналы формируются из 4-15 молекул. С помощью метода молекулярной динамики было проведено сравнительное изучение динамики взаимодействия молекулы зервамицина ПВ с двумя моделями мембран различного липидного состава, имитирующими клеточную мембрану эукариот (состоящая из ПОФХ липидов) и

прокариот (состоящая из ПОФЭ и ПОФГ липидов в соотношении 4:1). Было показано, что зервамицин взаимодействует с мембраной преимущественно вогнутой стороной и взаимодействие с мембраной бактериальной клетки энергетически более выгодно, чем с мембраной эукариотической. При взаимодействии с мембраной эукариотической клетки пептид ориентируется параллельно поверхности мембраны и данная конформация стабилизируется водородными связями между остатками Gln и липидными головками. При взаимодействии с бактериальной мембраной пептид встраивается N-концом в область полярных липидных головок. Были предложены 3 модели ионных каналов, состоящие из трех, четырех и пяти молекул зервамицина. Исследуя динамику данных каналов в липидном бислое, было показано, что каналы образуют поры диаметром 0,04; 2,5 и 3,5 нм соответственно. В случае тетрамера молекулы воды не образуют непрерывный ряд, в отличие от пентамера и гексамера, где непрерывная колонна молекул воды хорошо выражена. Таким образом, четыре молекул зервамицина не образуют проводящий ионный канал и наименьший уровень проводимости соответствует каналу, состоящему из пяти молекул. Данные исследования важны не только с точки зрения исследования функциональной активности зервамицин подобных антибиотиков, но также и для создания антимикробных препаратов нового поколения. Работа выполнена при поддержке РФФИ (07-04-01169), Роснауки, Рособразования.

Перенос электрона в фотосинтетических реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides* с отсутствующим первичным акцептором

Леонова М.М. (Пушино, Leonova-mari@yandex.ru)

Фотосинтез является уникальным процессом, в ходе которого происходит превращение и запасание энергии света в энергию химических связей органических соединений. Первичное преобразование световой энергии в энергию состояний с разделенными зарядами протекает в фотосинтетическом реакционном центре, представляющем собой трансмембранный пигмент-белковый комплекс. Направление и эффективность данного процесса в значительной степени определяется взаимодействием кофакторов переноса электрона друг с другом и аминокислотным окружением. Объединение молекулярно-биологических и биофизических методов позволило получить новую информацию о роли отдельных кофакторов и аминокислот в первичном разделении зарядов в РЦ. Гистидины L153 и M182 являются лигандами атомов Mg бактериохлорофиллов V_A и V_B , соответственно. С помощью сайт-направленного мутагенеза нами были получены мутантные реакционные центры *Rhodobacter sphaeroides* с замещениями гистидина L153 на тирозин (одиночная мутация) и дополнительно гистидина M182 на лейцин (двойная мутация). В связи с нестабильностью РЦ, их изучение велось в хроматофорах, выделенных из бактериального штамма с делетированными генами белков антенных комплексов. При замене гистидина L153 на тирозин наблюдались значительные спектральные и фотохимические изменения свойств РЦ, свидетельствующие об отсутствии молекулы первичного акцептора электрона V_A . Замена гистидина M182 на лейцин привела к потере атома Mg бактериохлорофиллом V_B и превращению его в бактериофеофитин Φ_B . Мутантные РЦ имели фотохимическую активность в составе фотосинтетической мембраны. Показано, что в РЦ H(L153)Y фотохимическое разделение зарядов происходит с квантовым выходом порядка 7% от квантового выхода в РЦ дикого типа и за время более 3 нс. В РЦ H(L153)Y+H(M182)L электрон от первичного донора передается на молекулу Φ_B неактивной цепи кофакторов и образуется состояние с разделенными зарядами $P^+\Phi_B^-$, которое за времена порядка 180 пс рекомбинирует в основное состояние. Кроме того, в кинетику изменений поглощения РЦ мутанта существенный вклад вносит быстрый суб-пикосекундный компонент со временем жизни ≤ 0.2 пс, который, вероятно, обусловлен процессами релаксации P838*, связанными с

конформационными изменениями первичного донора электрона. Работа поддержана грантами РФФИ (06-04-48686) и программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» № 10П, Программа фундаментальных исследований РАН «Фемтосекундная оптика и физика сверхсильных лазерных полей» № 2П, госконтракт 02.512.12.0004 по программе «Живые системы».

Оценка биохимических показателей крови при внутрижелудочном введении взвеси нанопористого материала

Липсон Н.Ю. (Астрахань, nlipson@rambler.ru)

Были использованы углеродные соединения, основанные на наноалмазах. Целью исследования было изучить биохимические показатели крови при внутрижелудочном введении взвеси нанопористого материала на фоне токсического действия хлорида кадмия. Экспериментальным животным вводили внутрижелудочно раствор соли кадмия в течение 9 дней, активированный уголь и нанопористый материал, измельченные в порошкообразную массу в виде водной дисперсии также вводили внутрижелудочно с помощью зонда. Животные были разделены на 6 групп: 1) интактные самки; 2) животные, получающие активированный уголь; 3) животные, получающие нанопористый материал; 4) животные, получающие соль кадмия; 5) животные, получающие соль кадмия с предварительным введением взвеси активированного угля; 6) животные, получающие соль кадмия с предварительным введением взвеси нанопористого материала. Исследовались процессы перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах плазмы крови, перекисный гемолиз эритроцитов и активность каталазы. Перекисный гемолиз эритроцитов является чувствительным показателем, отражающим про- и антиоксидантный баланс организма. Степень перекисного гемолиза эритроцитов при внутрижелудочном введении, как раствора хлорида кадмия, так и раствора хлорида кадмия совместно с активированным углем и нанопористым материалом практически не изменялась по сравнению с контрольными значениями. Активность каталазы в группах, где животным вводили активированный уголь и нанопористый материал совместно с раствором хлорида кадмия, незначительно понижалась по сравнению с контрольным значением. А у животных подвергавшихся воздействию нанопористого материала, раствора хлорида кадмия и активированного угля совместно с раствором хлорида кадмия, аналогичный показатель значительно возрастал ($p < 0,05$). Диеновые конъюгаты изопропанольной фракции имеют наиболее высокий показатель в группе, где животным вводился нанопористый материал совместно с кадмием. При введении нанопористого материала, активированного угля и активированного угля совместно с кадмием, уровень диеновых конъюгатов также превышает контрольное значение. Понижение уровня диеновых конъюгатов наблюдалось только при введении кадмия, хотя различия и не являются достоверными. В гептановой фракции содержание и кетодиенов и сопряженных триенов, и диеновых конъюгатов оказалось наиболее высоким при введении нанопористого материала с кадмием ($p < 0,05$), и наиболее низким при введении кадмия и активированного угля совместно с кадмием. Таким образом, нанопористый материал, вводимый внутрижелудочно, в указанной концентрации не приводил к достоверным изменениям изучаемых параметров. Показатели крови несколько отличались от контрольных значений, но эта реакция со стороны системы крови может быть связана с ответной реакцией организма на внутрижелудочное введение наноматериала.

Активированный уголь проявил сорбционные свойства, что сказалось на снижении продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови самок крыс, а нанопористый материал не проявил экранирующих свойств, наоборот увеличил интенсивность свободно-радикального окисления и возможно потенцировал токсический эффект соли кадмия.

Исследование фотофизических свойств гибридных систем, состоящих из нанокристаллов, связанных с фотосинтетическими пигмент-белковыми комплексами

Максимов Е.Г. (Москва, xbraindamagex@yandex.ru)

Известно, что эффективность разделения зарядов в реакционном центре фотосистемы 2 растительных клеток близка к 100%, в результате чего образуется электрохимический потенциал. Эти факты позволяют рассматривать ФС2 как перспективный, экологически чистый источник электроэнергии. За последнее десятилетие был выполнен ряд попыток получения электрического тока с помощью реакционных центров, у которых хиноны замещены синтетическими акцепторами электронов, соединенными с проводником посредством молекулярных проводников. Однако общим недостатком подобных устройств является ничтожно малая поглощающая способность тонких слоев изолированных реакционных центров. Это существенно снижает эффективность и целесообразность использования таких систем для получения электрического тока. Современные нанотехнологии позволяют синтезировать полупроводниковые CdSe/ZnS нанокристаллы или так называемые «квантовые точки» со строго определенными характеристиками спектров поглощения и флуоресценции. Это позволяет использовать квантовые точки в качестве флуоресцентных зондов. В данной работе нами было показано, что квантовые точки могут быть использованы в качестве светособирающих антенн для увеличения поглощающей способности фотосинтетических реакционных центров. В качестве объекта исследования нами были выбраны фотосинтетические мембраны, выделенные из цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803. Методика выделения предусматривает удаление значительной части фикобилисом – водорастворимых антенных комплексов, что отражается в спектрах поглощения. Нами были подобраны водорастворимые квантовые точки таким образом, что их спектр флуоресценции (максимум при 630 нм) хорошо перекрывается со спектром поглощения фикобилинов и хлорофилла, т.е. возможен перенос энергии по механизму Ферстера от квантовой точки к фотосинтетическим пигментам клетки. Для проверки этой гипотезы была проведена серия экспериментов, в ходе которых к суспензиям фотосинтетических мембран добавляли квантовые точки и регистрировали спектры флуоресценции в диапазоне от 590 до 780 нм. Флуоресценцию возбуждали светом с длинами волн 290, 430 и 550 нм. Были определены концентрации квантовых точек, при которых наблюдалось увеличение квантового выхода флуоресценции хлорофилла. Последующее увеличение концентрации точек, вероятно, приводит к экранированию, возможно, этим объясняется наблюдаемое снижение квантового выхода. Добавление квантовых точек к суспензии фотосинтетических мембран позволило увеличить квантовый выход флуоресценции хлорофилла при возбуждении видимым светом на 30-50% и в 40 раз при возбуждении в ультрафиолетовом диапазоне. Полученные результаты показывают, что наноразмерные кристаллы (квантовые точки) могут служить эффективными светосборщиками в гибридных энергопреобразующих устройствах. Автор выражает признательность профессору, доктору физико-математических наук В.З. Пащенко за помощь в подготовке тезисов.

Фемтосекундная динамика образования первичных продуктов фотолиза зрительного пигмента родопсина

Мозговая М.Н., Смитиенко О.А., Шелаев И.В. (Москва, mozgovaya.mariya@gmail.com, djolia@mail.ru, shelaev@bk.ru)

Зрительный пигмент родопсин представляет собой фоточувствительный белок,

который после поглощения кванта света изменяет свою конформацию и запускает процесс фототрансдукции путем взаимодействия с G-белком. Изменение конформации родопсина инициируется изомеризацией его хромофорной группы из 11-*цис* в полностью-*транс* форму ретиналя. Методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии было показано, что первый продукт реакции, фотородопсин, образуется за 200 фс с квантовым выходом 0.65 при возбуждении родопсина в максимуме α -полосы поглощения ($\lambda_{\max} = 500$ нм). В настоящей работе проводилось возбуждение родопсина при длинах волн $\lambda = 500, 535, 560$ нм с целью выявления зависимости динамики реакции фотоизомеризации от характеристик начального когерентного колебательного волнового пакета, который образуется благодаря фемтосекундному импульсу. При изучении кинетических кривых образования первых продуктов реакции были обнаружены осцилляции сигнала, отражающие существование когерентного колебательного волнового пакета в течение нескольких пикосекунд. Определение амплитудно-фазовых характеристик волновых пакетов, образующихся при различных длинах волн возбуждения, позволило выявить активные частоты. Было показано, что частоты осцилляций 44, 62, 142 и 160 см^{-1} соответствуют колебательным модам, активным в элементарном акте изомеризации 11-*цис* ретиналя в родопсине и в процессе восстановления исходного состояния. Изменение энергии кванта возбуждающего света на 2000 см^{-1} (от 500 до 560 нм) привело к изменению соотношения амплитуд различных реакционных колебательных мод при постоянстве их частот. Предполагается, что именно разное соотношение амплитуд частот, полученных в данных исследованиях, может быть причиной уменьшения квантового выхода реакции при возбуждении длинами волн больше 500 нм. Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках программы фундаментальных исследований отделения химии и наук о материалах РАН «Теоретическое и экспериментальное изучение природы химической связи и механизмов важнейших химических реакций и процессов». (Программа ОХ-01) Авторы выражают признательность н.с. Ф.Е. Гостеву, доц., к.б.н. Т.Б. Фельдман, д.х.н. В.А. Надточенко, проф. д.ф.-м.н. О.М. Саркисову, проф., д.б.н., акад. М.А. Островскому за помощь в выполнении работы.

Изучение агрегации рекомбинантного белка паутины 1F9 в водных растворах

Мусатова В.В. (Москва, veronika.musatova@gmail.com)

В последние годы белки каркасной нити паутины являются объектом интенсивных исследований. Интерес к паучьему шёлку, обусловленный механическими свойствами (высокий модуль Юнга и предел прочности) нити паутины, возрос при обнаружении его слабой иммуногенности и способности к биорезорбции. Эти свойства открывают широкие возможности по использованию паучьего шёлка. В медицине одной из таких возможностей является включение белков паутины в состав коллагеновых матриц, которые могут применяться в качестве каркаса при изготовлении искусственных тканей. Особое значение для объяснения механических свойств каркасных нитей паутины имеет изучение конформации молекул белка, составляющих нить. Каркасная нить состоит из двух белков, спидроина 1 и спидроина 2, которые имеют высокую молекулярную массу и периодическую структуру: они состоят из большого числа прямых повторов. Способность молекул к боковой агрегации приводит к формированию нанопфибрилл, которые обеспечивают уникальные механические свойства нитей паучьего шёлка. В этой работе исследовались конформации белка 1F9, который является искусственным аналогом спидроина 1, в растворах с низкой концентрацией белка методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Исследовались растворы 1F9, приготовленные разведением водой концентрированного раствора белка в смеси муравьиной кислоты (90%) с хлоридом лития (100 г/мл). Эта смесь может использоваться для экстракции белка при его получении. Концентрированный раствор разводили тридистиллированной

водой до концентраций белка 100 мкг/мл, 25 мкг/мл, 5 мкг/мл и 1 мкг/мл, затем наносили на слюду для исследования с помощью АСМ. Как и ожидалось, в растворах были обнаружены нанофибриллы, их диаметр (высота над подложкой) составил 2,5-5 нм. Кроме того, в разбавленных растворах (с концентрацией белка 25 мкг/мл и менее) были обнаружены не описанные ранее в литературе структуры – длинные тонкие нити высотой менее 1 нм. По оценкам, на 100 нм такой нити приходится менее десяти молекул белка. Таким образом, показано, что водные растворы 1F9, приготовленные после обработки белка СНООН/LiCl, содержат нанофибриллы, причем двух принципиально различных типов. Можно предположить, что способность к их формированию является неотъемлемым свойством белка и не зависит от способа его обработки, однако этот вопрос является дискуссионным. Можно ожидать, что геометрические размеры нанофибрилл и установленные в данной работе условия их формирования позволят лучше понять исключительные механические свойства белка паутины, что, в свою очередь, важно для его практических приложений.

Молекулярная динамика антимикробного пептида буфорина 2 и его аналога P11A в различных растворителях

Науменкова Т.В. (Москва, tnaumenkova@gmail.com)

К наиболее актуальным проблемам современной фармакологии относятся поиск новых антимикробных препаратов широкого спектра действия и доставка лекарств внутрь клеток. В этой связи молекула буфорина 2 представляет особый интерес. Буфорин 2 принадлежит к числу антимикробных пептидов. По своей структуре он схож с мембраноактивными пептидами. Противомикробный эффект этих веществ связан с их способностью нарушать структурную целостность мембран микробных клеток. Однако, согласно результатам исследований последних лет, буфорин 2 действует на клетки по принципиально иному механизму. Не нарушая структуры мембран, он проникает внутрь клеток и, связываясь с внутриклеточными агентами, приводит к гибели клеток. При этом буфорин 2 не обладает гемолитическим эффектом. Благодаря таким свойствам, буфорин 2 является не только перспективным антимикробным препаратом, но и молекулярным агентом, использование которого возможно для доставки лекарств внутрь клеток. Аминокислотная замена P11A приводит к значительным изменениям в структуре буфорина 2, превращая пептид в мощную мембраноактивную молекулу. Несмотря на огромный фармакологический потенциал буфорина 2 и его аналогов, о структурных свойствах и механизмах действия этих молекул на сегодняшний день известно крайне мало. В настоящей работе методом молекулярной динамики исследованы структурные свойства буфорина 2 и его мутанта P11A в воде и 33% водном растворе трифторэтанола (ТФЭ). Водные растворы ТФЭ различной концентрации широко используются для изучения структуры белков методом ЯМР-спектроскопии. Согласно имеющимся данным, растворы ТФЭ способствуют образованию и стабилизации α -спиральной конформации белков и пептидов, а также конформации β -слоя, β -шпилек, β -поворотов и гидрофобных кластеров. В связи с этим, ТФЭ часто используется в молекулярнодинамических экспериментах в качестве мембраноподобного растворителя. В работе проведено исследование динамических свойств и стабильности пептидов в различных средах. Рассматриваются такие характеристики вторичной структуры пептидов как длина и радиус спирали, угол поворота спирали, обсуждается отклонение значений этих параметров от параметров идеальной α -спирали. Проведена оценка вклада различных растворителей в стабилизацию вторичной структуры пептидов. Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант №07-04-01169). Автор выражает признательность научному руководителю исследований, профессору, д.ф.-м.н. К.В. Шайтану.

Влияние терагерцового излучения на оптические свойства тонких пленок белков и нуклеиновых кислот

Немова Е.Ф. (Новосибирск, endy@nsu.ru)

В настоящее время широко исследуется влияние терагерцового излучения на всевозможные биологические объекты. Это связано с тем, что данное излучение попадает в диапазон частот междоменных колебаний, вращательных переходов в молекулах воды и в биологических молекулах со сложной пространственной структурой, а также коллективных колебательных переходов на межмолекулярном уровне. Под воздействием терагерцового излучения могут происходить изменения этих вращательных и колебательных уровней, что приводит к заметным конформационным перестройкам в биомолекулах. Основной проблемой при изучении влияния терагерцового излучения на макромолекулы, является то, что оно поглощается водой. Исследование препаратов в тонких плёнках решает эту проблему. Кроме того, использование тонкоплёночных препаратов белков и нуклеиновых кислот позволяет расширить диапазон используемых методов для изучения влияния терагерцового излучения на физические свойства макромолекул. Цель данного исследования состояла в разработке методики получения тонких плёнок биологических макромолекул и исследования влияния на них терагерцового излучения. В работе использовались препараты бычьего сывороточного альбумина (БСА) и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Плёнки получали высушиванием водного раствора препарата на кварцевой подложке в потоке воздуха при комнатной температуре. В качестве подложки были использованы стекла из кристаллического кварца. Эти стекла пропускают и терагерцовое излучение, и УФ. Концентрация исходного раствора была 1 мг/мл. При помощи эллипсометрии измерена толщина полученной плёнки, которая составила 3-4 мкм. Для изучения оптических свойств до и после облучения в работе использовали методы ИК и УФ спектроскопии. Все препараты облучали субмиллиметровым лазером с оптической накачкой. Эксперименты проводили на длинах волн 81,5 или 261 мкм при мощности облучения 5, 10, 15 и 20 мВт и времени экспозиции 20, 30, 45, 60 и 90 мин. Было получено, что интенсивность поглощения БСА на длине волны 280 нм при облучении увеличивается. Максимальное изменение наблюдается при длине волны облучения 81,5 мкм. Этот эффект зависит от мощности и времени облучения. При облучении ДНК наблюдается уменьшение интенсивности поглощения на длине волны 260 нм относительно спектра необлучённого препарата. Максимальный эффект наблюдался при длине волны облучения 261 мкм. Этот эффект зависит от мощности и времени облучения. Таким образом, терагерцовое излучение влияет на оптические свойства тонкоплёночных препаратов БСА и ДНК. Это влияние зависит от длины волны, времени и мощности облучения.

Биосенсор для экспрессного определения активности ДНК-повреждающих факторов

Никитина И.И., Сайфуллина Д.В., Абдуллин Т.И. (Казань, nikitinairi@mail.ru)

Расщепление ДНК – важный тип повреждения ДНК *in vivo* – происходит под действием различных факторов и является причиной многих заболеваний человека. Среди расщепляющих ДНК факторов особый диагностический интерес представляют химические (активные формы кислорода, антибиотики и ксенобиотики) и биохимические (ДНКазы, антитела к ДНК и фосфодиэстеразы) агенты. Экспрессное определение ДНК-расщепляющей активности этих факторов является важной задачей для биомедицины, фармакологии и экологического мониторинга. Применяющиеся для решения этой задачи методы трудоемки и не могут быть реализованы в формате

одноразовых тестов, что сдерживает их внедрение в практику. Нами разработан новый метод оценки ДНК-расщепляющей активности молекул с использованием электрохимического биосенсора (заявка на патент РФ №2008137068). Модификация электродов углеродными нанотрубками позволила детектировать ДНК с высокой чувствительностью и селективностью по току ее окисления при потенциале около +1 В. Уменьшение молекулярной массы ДНК приводит к увеличению сигнала на модифицированном электроде вследствие изменения адсорбционного поведения ДНК. Предложены методы количественной оценки расщепления ДНК под действием активных форм кислорода и ДНК-гидролизующих белков. Разработанный биосенсор можно использовать в фармакологических исследованиях для анализа генотоксических антибиотиков, в экологическом мониторинге – для выявления химических агентов, взаимодействующих с ДНК, а также в клинико-диагностических лабораториях – для диагностики заболеваний, сопровождающихся изменением активности ДНК-гидролизующих белков. Работа является победителем федеральной программы "Участник молодежного научно-инновационного конкурса (УМНИК)", реализуемой Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, проект 8720.

Оценка безопасности продукции животноводства методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии

Николаева Т.Г., Кольцов В.В. (Казань, nikolaeva_tg@mail.ru)

Экологическое сельское хозяйство активно развивается в мире и начинает развиваться в России. Поскольку органическое сельскохозяйственное производство – это способ производства, учитывающий принципы естественного круговорота веществ в природе, сбалансированные взаимоотношения между почвой, растениями и животными, то одной из главных задач является обеспечение строгого контроля всего процесса производства, начиная с выбора территорий, кончая контролем конечного продукта.

В связи с этим особенно важен вопрос контроля технологии производства и переработки пищевой продукции с целью предотвращения попадания поллютантов в организм животных и человека, а также выбор методов контроля качества.

Целью нашей работы стало изучение содержания тяжелых металлов (кадмия, свинца, ртути и мышьяка) в говяжьем, свином, курином мясе, субпродуктах куриных, а также продукции переработки мяса (колбасные изделия).

Содержание ТМ в пробах определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии. Исследования проводились в период с 2003 по 2008 год на базе ОАО «Чувашский бройлер»; «Центр госсанэпиднадзора в Чувашской Республике»; ФГУ «Чувашский центр стандартизации, метрологии и сертификации», Контрольно-испытательной лаборатории Чебоксарского кооперативного института.

Всего было проанализировано 104 пробы.

В результате исследования было установлено, что мясо свиное и говяжье кадмия содержит в пределах 0,008-0,01 мг/кг; концентрация ртути в говяжьем и свином мясе составила 0,001-0,005 мг/кг, мышьяка – 0,01-0,08 мг/кг. Ртуть была обнаружена в трех пробах куриного мяса и составила $0,007 \pm 0,001$ мг/кг; кадмий обнаружен в двух пробах, его среднее содержание – $0,002 \pm 0,002$; мышьяк обнаружен в одной пробе в количестве $0,003 \pm 0,001$ мг/кг. Свинец в исследуемых пробах мяса содержался в пределах 0,01-0,16 мг/кг. Содержание тяжелых металлов и мышьяка в мясе не превышает ПДК.

Содержание ТМ в субпродуктах куриных: свинец – $0,2150 \pm 0,0145$ мг/кг, кадмий – $0,0367 \pm 0,0076$ мг/кг, ртуть – $0,0217 \pm 0,0048$ мг/кг, мышьяк – $0,0867 \pm 0,0209$ мг/кг.

Изучение концентрации ТМ и мышьяка в 67 образцах колбасных изделий позволило установить, что продукция, производимая из мяса, содержит свинца в пределах – 0,01-0,38 мг/кг; кадмия 0,01-0,05 мг/кг; ртути – 0,001-0,09 мг/кг; мышьяка – 0,01-0,032 мг/кг.

Колбасные изделия в среднем содержат: свинца – $0,0992 \pm 0,0106$ при ПДК 0,5 мг/кг, кадмия – $0,0128 \pm 0,0012$ мг/кг при ПДК 0,05 мг/кг, ртути – $0,0070 \pm 0,0019$ при ПДК 0,03 мг/кг, мышьяка – $0,0144 \pm 0,0018$ при ПДК 0,1 мг/кг.

Таким образом, говяжье, свиное, куриное мясо, субпродукты куриные и колбасные изделия, поступающие в торговые точки Чувашской Республики, содержат кадмия, свинца, ртути и мышьяка в пределах требований нормативных документов, что свидетельствует о безопасности исследуемой продукции для здоровья потребителей.

Приведенные выше данные позволяют нам рекомендовать метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии для контроля качества экологически чистой продукции.

Исследование структурных аспектов межмолекулярных взаимодействий пептидных лигандов с рецепторами

Озеров И.В., Пырков Т.В. (Москва, varnivey@mail.ru)

В природе существует большое количество низкомолекулярных веществ пептидной природы, обладающих физиологическим действием. Кроме того, появляются всё новые искусственные пептиды, биологическая активность которых изучается с целью создания лекарств. Для понимания механизма действия этого класса веществ в живых системах необходимо детально исследовать особенности взаимодействия таких лигандов с рецепторами, выяснить, какие функциональные группировки пептидов участвуют в образовании межмолекулярных контактов с белком-мишенью. Такое исследование позволит создать подходы к разработке новых синтетических пептидов, обладающих заданным набором свойств. В работе проводили анализ взаимодействия пептидных лигандов, выбранных из базы данных по пространственным структурам комплексов лиганд-рецептор – «PDBBind». База данных включает ~3000 различных комплексов, из них ~300 образованы лигандами, которые являются пептидами и имеют две и более пептидных связи. Анализ проводили с использованием ряда современных вычислительных методов, в частности, использовали метод молекулярного гидрофобного потенциала (МГП) для количественной оценки неполярных взаимодействий. Помимо гидрофобных контактов, изучали и другие типы межмолекулярных взаимодействий, включая водородные связи и стэкинг, их роль в структурной организации комплексов лиганд-рецептор. Целью работы является выявление структурных особенностей пептид-связывающих рецепторов, связанных с положением отдельных функциональных групп лигандов, которые обуславливают специфическое молекулярное узнавание этими рецепторами лигандов пептидной природы. В перспективе, выявленные в ходе данного исследования закономерности взаимодействия пептидных лигандов с рецепторами будут использованы для рационального дизайна новых биологически активных пептидов.

Разработка биолюминесцентного метода определения тяжести заболевания онкологических больных

Орлова А.В. (Красноярск, Nutik2005@mail.ru)

Биолюминесцентные методы активно применяются в медицине для иммуноферментного анализа, определения активности ферментов, концентраций различных метаболитов и других целей. Ранее были разработаны биолюминесцентные методы для оценки тяжести эндотоксикоза у хирургических и терапевтических пациентов, прогнозирования течения их болезни и оценки эффективности применяемых методов лечения. Биолюминесцентные методы анализа имеют следующие характеристики: высокая чувствительность, экспрессность, низкая травматичность и простота выполнения. Цель исследования – показать возможность разработки

биолюминесцентного экспрессного метода анализа состояния здоровья онкологических больных. В ходе выполнения работы проведен сравнительный анализ влияния плазмы крови больных и доноров на интенсивность свечения биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза; выбран измеряемый параметр биолюминесценции биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, при котором различия в действии плазмы крови пациентов и доноров максимальны; изучены условия пробоподготовки образцов плазмы крови для проведения биолюминесцентного анализа. Исследуемые образцы плазмы крови были предоставлены хирургическим отделением Краевого онкологического диспансера. Влияние плазмы крови на биферментную систему светящихся бактерий НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза оценивали по изменению двух параметров биолюминесценции: максимума интенсивности свечения биолюминесценции и суммарного выхода свечения в исследуемой реакционной смеси за 10-20 секунд в присутствии 5-20 мкл исследуемой плазмы по сравнению с контрольным свечением. Показано, что наиболее чувствительным параметром биолюминесценции является максимальная интенсивность свечения, т.к. в этом случае различия в действии на биферментную систему плазмы крови доноров минимальны, а в действии плазмы крови доноров и пациентов – максимальны. Сравнительный анализ влияния плазмы крови больных и доноров на интенсивность свечения биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза показал, что плазма крови доноров в количестве 5 мкл не влияет на максимальную интенсивность свечения биферментной системы, причем показания доноров практически не различаются между собой. В то же время добавление в реакционную смесь 5 мкл плазмы крови больных с онкологическими заболеваниями существенно активизирует биолюминесцентную реакцию: максимальный уровень свечения достигает 117-151%. Показано, что для проведения биолюминесцентных методов анализа нельзя использовать замороженные образцы плазмы крови, т.к. это приводит к искажению результатов анализа. Таким образом, в ходе работы показана принципиальная возможность разработки экспрессного биолюминесцентного метода анализа состояния здоровья онкологических больных на основе биферментной системы светящихся бактерий НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза. Автор выражает признательность к.б.н. Есимбековой Е.Н. за помощь в подготовке тезисов.

Определение жесткости полиаланиновых пептидов и их надмолекулярных комплексов методом управляемой молекулярной динамики

Оршанский И.А. (Москва, Ingar@moldyn.org)

Полиаланиновые пептиды в конформации β -листа при взаимодействии между собой формируют β -слой. Данная структура самопроизвольно образует особый вариант третичной структуры – левозакрученную суперспираль. С помощью методов управляемой молекулярной динамики осуществлялось растяжение пептидов под действием приложенной внешней силы. Оценивалось относительное удлинение пептидов при приложении разных величин внешней силы. На основании полученных данных были рассчитаны коэффициенты жесткости для надмолекулярного полиаланинового комплекса при применении различных сил. Исследуя конформации системы после применения внешних сил различной величины, а также данные о значении коэффициентов жесткости надмолекулярного комплекса, были сделаны выводы о возможных механизмах формирования различной жесткости пептидных комплексов на различных этапах их деградации при растяжении. Проводилась оценка динамического поведения как отдельных молекул, так и комплексов пептидов в конформации β -слоя. Жесткость и эластичность волокон проводилась с помощью метода управляемой молекулярной динамики. Работа выполнена при поддержке РФФИ

(грант 04-04-49645) и Роснауки. Научный руководитель работы – профессор К.В. Шайтан.

Создание олигонуклеотидного микрочипа для выявления подтипа вируса гриппа А H5N1

Плотникова М.А., Клотченко С.А., Тёмкина О.А., Егоров В.В. (Санкт-Петербург, plotnikova@influenza.spb.ru)

Ежегодно повторяющиеся эпидемии гриппа, обусловленные способностью вируса гриппа изменять свою структуру, а также угроза возникновения новых пандемий в связи с появлением в циркуляции нового высокопатогенного штамма вируса гриппа H5N1, свидетельствуют о необходимости создания чувствительных, надежных и быстрых методов идентификации различных штаммов. Технология микрочипов является одним из наиболее эффективных современных методов для одновременного выявления присутствия множества различных вирусов в исследуемом образце. Целью представляемого исследования является создание олигонуклеотидного биочипа для выявления подтипа вируса гриппа типа А человека (ВГА) H5N1. Для последовательностей HA и NA ВГА человека H5N1, представленных в базе данных NCBI Influenza Virus Sequence Database было построено филогенетическое дерево с целью нахождения идентичных нуклеотидных сайтов. Нуклеотидные последовательности были выровнены между собой и к консервативным участкам в программе OligoWiz 2.0. были подобраны олигонуклеотидные зонды. Подобранные олигонуклеотидные зонды нанесли на аminosилановый субстрат при помощи споттера SpotArray24 (Perkin-Elmer, USA) методом контактной печати в условиях 50% влажности. Имобилизация олигонуклеотидных зондов на поверхности подложки осуществлялась путем облучения на кросслинкере (Biometra, German). Стандартными методами биохимии выделили тотальную РНК из клеточных культур, содержащих референс-штаммы ВГА человека H5N1 A/HongKong/156/1997, A/HongKong/213/2003, A/Indonesia/5/2005, A/VietNam/1203/2004. Оптимизировали систему получения меченой кДНК с помощью обратной транскрипции, оценили эффективность получения Су3 флуоресцентно меченых кДНК проб для гибридизации методами электрофореза и спектрофотометрии. Гибридизацию полученных меченых амплификатов с созданным микрочипом проводили в течение ночи при температуре 60°C. После гибридизации производили отмывку микрочипов и сканирование путем рассеивающего сканирования при длине волны 550 нм на сканере ScanArray Express (PerkinElmer, USA). На основании полученных результатов был разработан лабораторный образец олигонуклеотидного микрочипа для выявления вирусов гриппа типа А человека подтипов H5N1. В настоящий момент проводится апробация микрочипа. Тезисы докладов основаны на материалах исследований, поддержанных грантом Регионального общественного фонда содействия отечественной медицине.

Актин-обусловленный ответ эмбриональной клетки на осмотическое воздействие

Погорелова М.А., Тарасов А.И., Панаит А.В., Корниенко Е.В. (Пуццино, pogm2007@rambler.ru)

Мембрана раннего эмбриона является высоко проницаемой по отношению к воде. Поэтому любой осмотический шок сопровождается соответствующим движением воды через мембрану бластомера и последующим изменением объема эмбриональной клетки. Изменение клеточного объема влияет на многочисленные внутриклеточные регуляторные механизмы, такие как синтез белков, эпителиальный транспорт, метаболизм, выброс гормонов и медиаторов, возбудимость.

Не смотря на то, что факт взаимосвязи между осмотическими свойствами среды инкубирования и объемом раннего эмбриона млекопитающих установлен экспериментально, не ясными остаются клеточные механизмы осмотического ответа. Исходно мало внимания уделялось этому направлению, так как не было эффективных методов количественного исследования отдельного эмбриона млекопитающих, что обусловлено трудностью измерения объема объекта столь малых размеров.

Для измерения объемных характеристик отдельной клетки на основе метода freeze – drying разработана технология количественной микротомографии 2-х клеточного эмбриона млекопитающих посредством сканирующей лазерной микроскопии (LSM) зародыша с его последующей трехмерной реконструкцией. На основе разработанной LSM микротомографии получена кинетика ответа бластомера на различные виды осмотического воздействия.

В результате, проведен сравнительный анализ объемных параметров бластомера 2-х клеточного эмбриона мыши в зависимости от длительности осмотического шока разной направленности и изучена кинетика изменения объема клетки раннего эмбриона мыши в гипосмотической среде на фоне блокирования Na^+/K^+ -Атфазы, изменения изоэлектрической точки белка и действия цитохалазина Б. Показано, что для бластомера 2-х клеточного эмбриона основным механизмом, ответственным за компенсаторный ответ клетки на осмотический шок, является актин-обусловленная регуляция ионных каналов.

Изучение структуры наночастиц, полученных при взаимодействии ДНК и белка оболочки спиральных фитовирусов

Полозов В.М., Никитин Н.А. (Москва, vpolozov@gmail.com)

Использование природных наноструктур – вирусов растений и их способность к самосборке является перспективным подходом для разработки нанобиотехнологий. Структурные белки – белки оболочки (БО) обладают большим набором функций и играют важную роль в жизненном цикле вируса. Ранее нами была показана возможность сборки искусственных вирусных наночастиц, состоящих из белка оболочки Х-вируса картофеля (ХВК) и ряда гетерологичных нуклеиновых кислот, способных к контролируемой диссоциации под действием транспортного белка 1 ХВК. В данной работе изучена возможность сборки *in vitro* наночастиц, состоящих из белка оболочки ХВК и линейной двуспиральной ДНК. С помощью электронной и атомно-силовой микроскопии обнаружено два вида частиц при сборке БО ХВК и ДНК: палочковидные частицы, морфологически не отличающиеся от рибонуклеопротеидов, полученных при сборке БО и вирусной РНК, а также гибкие, сильно извитые частицы. Диаметр полученных частиц, измеренный с помощью электронной микроскопии, варьируется от 10 до 18 нм, что сопоставимо с размерами нативного ХВК (13,5 нм). Изучена эффективность сборки наночастиц из БО ХВК и ДНК при изменении длины ДНК, соотношении БО-ДНК, а также различных значениях рН и ионной силе. Исследование влияния нуклеаз, рестриктаз и специфических протеаз на полученные частицы позволяют сделать предположение о неплотной упаковке белка оболочки вокруг ДНК. Полученные наночастицы из белка оболочки ХВК и ДНК могут служить наноконтейнерами для доставки терапевтической ДНК в клетки. А комбинирование методов модификации белков и синтеза ДНК открывают новые горизонты в области создания сложных бионаноматериалов.

Исследование серотонинового 5-НТЗ рецептора с помощью метода молекулярной динамики

Попинако А.В. (Москва, popinako@rambler.ru)

Серотониновый (5-Hydroxytryptamine₃) рецептор представляет собой интегральный белок в липидном бислое мембраны. Мессенджер 5-НТЗ рецептора (серотонин) связывается с надмембранной частью серотонинового рецептора и запускает пассивный транспорт ионов через мембрану.

Серотониновый рецептор – представитель суперсемейства лиганд-зависимых ионных каналов (Jansen, 2008). Состоит из пяти трансмембранных доменов вокруг центральной проводящей поры, проницаемой для ионов натрия, калия и кальция (Kerгу, Price, 2007). Домены расположены псевдо симметрично вокруг пропускающей поры. Функционирующие каналы могут содержать пять идентичных 5-НТЗА субъединиц (гомоопентамеры) или представлять совокупность из 5-НТЗА и одну из четырех 5-НТЗВ, 5-НТЗС, 5-НТЗD, или 5-НТЗЕ субъединиц (гетероопентамеры). Трёхмерная структура канала в настоящее время неизвестна. В данной работе для предсказания структуры 5-НТЗ рецептора использовался метод моделирования по гомологии. Был произведен поиск шаблона для каждой субъединицы 5-НТЗ рецептора в отдельности. Трёхмерная структура надмембранной части субъединицы белка была получена на основании известной структуры ацетилхолин-связывающего белка (AChBP, Acetylcholine Binding Protein). Методом молекулярной динамики было изучено взаимодействие рецептора с некоторыми лигандами и исследована динамика миграции ионов сквозь канал серотонинового 5-НТЗ рецептора.

Структурные различия двух тканеспецифичных высокогомологичных форм эукариотического фактора элонгации трансляции eEF1A

Притужалов Е.А. (Тула, prituz@mail.ru)

Эукариотический фактор элонгации eEF1A – мультифункциональный белок, основная функция которого заключается в эффективной доставке аминокил-тРНК к 80S рибосоме. Помимо этого eEF1A участвует в разнообразных клеточных процессах, образуя комплексы с разными лигандами от актина до вирусной РНК. Было идентифицировано две тканеспецифичные формы этого белка: eEF1A2, которая экспрессируется только в нервной и мышечной тканях, и eEF1A1, обнаруженная во всех остальных тканях. При этом было найдено, что eEF1A2 при онкогенезе экспрессируется и в других тканях. Сравнительное исследование этих форм фактора элонгации eEF1A (из мышц и печени кролика), имеющих 98% гомологии, методами малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), аналитического центрифугирования (АЦ), дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСМ) и кругового дихроизма (КД) выявило наличие четких различий в их структуре, стабильности и функциональном поведении. Так, кривые кругового дихроизма в области ближнего и дальнего ультрафиолета свидетельствовали о различиях в их вторичной структуре. Профили теплопоглощения показывали, что второй фактор плавится при более высоких температурах, а данные скоростной седиментации и МУРР показывали, что второй фактор более компактен в растворе по сравнению с первым. На основе развитого нами подхода к моделированию неструктурированных участков белков и программы “GASBOR” для обработки данных МУРР была установлена структура eEF1A2 в растворе. Найденная модель была сопоставлена с кристаллической структурой дрожжевого фактора, который имеет высокую гомологию (88%) с исследуемым eEF1A2. Сравнение двух структур показало, что они отличаются, в основном, сдвигом между вторым и третьим доменом фактора и наличием С-концевого подвижного участка в исследуемом белке. Исследование комплексов изоформ фактора с калмодулином методами АУ и МУРР показало, что только первый фактор эффективно связывается с калмодулином в присутствии ГДФ. Анализ аналогичных комплексов с т-РНК свидетельствовал о большей эффективности первого фактора к связыванию т-РНК и более масштабных конформационных изменениях в белке. Таким образом,

представленные данные свидетельствуют о заметных структурных различиях двух высокомолекулярных форм фактора eEF1A. Вероятно, этими различиями можно объяснить наличие разной функциональной активности этих белков.

Применение атомно-силовой микроскопии для обнаружения техногенных наночастиц в биологических образцах

Роскошина А.С. (Москва, annarosk@gmail.com)

Интенсивное развитие нанотехнологий ведет к появлению многообразия новых материалов, содержащих наноразмерные частицы. В наноразмерном состоянии многие вещества приобретают новые свойства и становятся более активными. Высокая биологическая активность наночастиц несет в себе потенциальные риски возникновения нежелательных токсических эффектов. Установлено, что многие наночастицы обладают высокой проникающей способностью: легко проникают через мембраны клеток, обнаруживаются в клеточном ядре, преодолевают гематоэнцефалический барьер. Использование наночастиц и наноматериалов требует создания системы для обнаружения и идентификации наночастиц, попавших в биологические организмы. Это связано с тем, что на данные о влиянии техногенных наночастиц на живые организмы, накопленные на настоящий момент, чрезвычайно скудные. В данной работе обсуждается применение атомно-силовой микроскопии (АСМ) для обнаружения наночастиц в пробах из живых организмов (срезах тканей, лизатах, гомогенатах и т.д.). Современные возможности АСМ позволяют получать не только изображения поверхности образцов, но также измерять их локальные механические, электрические и магнитные свойства. Для этого используют специальные режимы работы АСМ, такие как электросиловая микроскопия, магнитно-силовая микроскопия и другие. Цель данной работы состояла в том, чтобы выявить сильные и слабые стороны АСМ как инструмента для обнаружения наночастиц в биологических образцах. Работа была выполнена на микроскопе Solver PRO-M (NT-MDT, Зеленоград). Подготовка биологических образцов для обнаружения наночастиц возможна как с сохранением клеточной структуры исследуемого объекта, так и с разрушением мембран и органелл клеток. При сохранении целостности мембран и органелл становится возможным охарактеризовать места накопления наночастиц в клетках, и это позволяет исследовать биологический эффект, вызванный наночастицами. Применение АСМ для этой цели требует создания специальной методики приготовления образцов, поскольку традиционно для АСМ доступна только поверхность, а не объем исследуемого объекта. В данной работе было продемонстрировано, что АСМ не применима для сканирования гистологических срезов, приготовленных по методикам для оптической микроскопии, из-за высокой шероховатости и механических свойств образцов. Было показано, что для сканирования методами АСМ более применимы поверхности эпоксидных блоков, используемые в процессе приготовления срезов для электронной микроскопии. На поверхности блоков эпоксидной смолы с залитыми образцами с использованием различных режимов работы атомно-силового микроскопа (контактного, полуконтактного) были получены изображения субклеточных структур.

При использовании АСМ как разрушающего метода обнаружения наночастиц (для детекции наночастиц в гомогенатах клеток, сыворотке крови и т.д.) требуется обнаружить наночастицы в сложном органическом окружении. Для этого наиболее перспективной представляется применение электросиловой микроскопии (ЭСМ). В настоящее время ведутся работы по применению ЭСМ для обнаружения нанотрубок в сыворотке крови.

Структурно-функциональные модификации частично нитрозилированного гемоглобина, индуцированные оксигенацией

Рубан М.К. (Воронеж, rumikon@rambler.ru)

В физиологических условиях концентрация эндогенного вазодилатора оксида азота (II) (NO) в кровеносном русле значительно ниже количества общего внутриэритроцитарного гемоглобина (\approx в 10^3 раз), поэтому в эритроцитах гембелок будет только частично нитрозилирован. Известно, что частично нитрозилированный гемоглобин (ЧНГ), в отличие от метгемоглобина и полностью нитрозилированного гемоглобина, не теряет кислородтранспортную функцию. Следовательно, ЧНГ может вносить определенный вклад в кислородсвязывающие характеристики общего гемоглобина. Полагают, что в таком ЧНГ молекулы NO, в зависимости от условий микроокружения, могут совершать внутримолекулярные переходы между α - и β -гемами, а также остатками Cys β 93, что может при определенных условиях придавать дополнительные функции молекуле гембелка как донора NO. Целью данного исследования явилось изучение структурно-функциональных модификаций ЧНГ в ходе процесса оксигенации. Для получения ЧНГ использовали газообразную смесь с объемной долей NO > 99,85 % и растворы Hb человека. Для выявления структурно-функциональных модификаций гембелка, индуцированных NO, получали данные о спектрах поглощения в видимом диапазоне длин волн, а также кривые диссоциации оксигемоглобина (КДО). В ходе оксигенации растворов Hb в спектрах поглощения образцов в области полосы Soret имеется изосбестическая точка при 420 нм, свидетельствующая о взаимном переходе двух лигандных форм гембелка: дезокси- в оксиформу. Выявленные нами на начальных этапах оксигенации ЧНГ отсутствие изосбестической точки в области 420 нм и постепенное исчезновение максимума при 413,5 нм в дифференциальных спектрах, по-видимому, являются следствием перегруппировки молекул NO от гемов к SH-группам Cys β 93. С увеличением концентрации O₂ появлялась изосбестическая точка в области 420 нм и максимума в дифференциальном спектре при 410,5 нм, что может быть следствием полного перемещения молекул NO от Fe²⁺ гемов к Cys β 93. Кроме того, частичная нитрозиляция Hb, при которой соотношение молекул Hb:NO составляло 20:1 (по гемму) соответственно, приводила к достоверному снижению сродства гемоглобина к кислороду по отношению к контролю: величина полунасыщения лигандом (P₅₀) уменьшалась с 18,7 \pm 1,6 до 8,1 \pm 1,2 мм рт. ст., а константа Хилла (α) – с 2,7 \pm 0,2 до 2,1 \pm 0,1. Полученные нами данные выступают в поддержку гипотезы, предложенной Дж. Стэмлером. В ходе оксигенации (при T \rightarrow R переходе) молекулы ЧНГ может происходить внутримолекулярная перегруппировка NO от железа гема на атом серы Cys- β 93 с образованием S-нитрозооксигемоглобина (SNO-оxу-Hb). Известно, что SNO-оxу-Hb обладает повышенным сродством к кислороду вследствие стабилизации R-конформации гембелка. Этот механизм может иметь особое физиологическое значение. Молекулы NO переносятся относительно стабильным SNO-оxу-Hb из легких в системные капилляры, где при дезоксигенации гемоглобина молекулы NO выходят из менее устойчивого SNO-deoоxу-Hb и выводятся из эритроцитов, возможно, в виде S-нитрозоглутатиона, являющегося донором NO для растворимой гуанилатциклазы. В этом заключается предполагаемый механизм регуляции тонуса кровеносных сосудов гемоглобином пропорционально степени гипоксии. Таким способом может происходить авторегуляция скорости кровотока и доставка кислорода.

Структурные неоднородности участков поверхности эритроцита в поле атомного силового микроскопа

Рысаева Р.М. (Москва, regishka2004@yandex.ru)

Целью данной работы являлось изучение фрагментов поверхности эритроцита на вершине тора, на внутреннем спаде и на дне дискоцита в мазке цельной крови и в условиях фиксации клеток. Эритроциты были получены из крови мужчин в возрасте от

20 до 65 лет. В качестве образцов использовались мазки цельной крови. Красные кровяные клетки фиксировались в 1% глутаровом альдегиде, отмывались дистиллированной водой, затем из них формировали монослой. Изображение получали на атомном силовом микроскопе «Фемтоскан» в режимах сканирования plane, deflection, friction. Смещение силы от 1 пН до 1 мкН. Все изображения получены при комнатной температуре. В результате работы было получено, что высота эритроцитов при фиксации глутаровым альдегидом 1000–1800 нм, диаметр 4,5–5,5 мкм. В мазке цельной крови без фиксации высота составила 500–800 нм, диаметр – 6–8 мкм. Поверхность тора, внутреннего склона и дна дискоцита отличаются по структуре и параметрам шероховатости. Приводятся изображения, параметры шероховатости и гистограммы распределения неоднородностей для каждого из указанных фрагментов дискоцита.

Исследование влияния ряда производных резорцина на стабилизацию электрона в хинонной акцепторной части фотосинтетических реакционных центров бактерий *Rhodobacter sphaeroides*

Симанова А.А. (Москва, psixanutaia@mail.ru)

Химические шапероны в настоящее время привлекают пристальное внимание исследователей в связи с потенциальной возможностью их применения для коррекции структурно-динамического состояния белков ответственных за развитие ряда тяжелых патологических состояний типа болезней Альцгеймера, Паркинсона, прионовых инфекций. Развитие этих патологий обусловлено спонтанным изменением пространственной структуры данных белков, изменением их молекулярно-динамических характеристик, в том числе состояния системы их водородных связей, с нарушением нативной функциональной активности. Функционирование электрон-транспортной цепи фотосинтетических реакционных центров (РЦ) пурпурных бактерий (скорость и направление переноса электрона в отдельных звеньях цепи) существенно зависит от структурно-динамического состояния данного макромолекулярного комплекса, включая состояние системы его водородных связей. Направленная модификация этого состояния отражается на удобно и быстро регистрируемых спектрально-кинетическими методами информативных показателях электрон-транспортной активности комплекса. Это свойство фотосинтетических РЦ, изолированных из бактерий *Rhodobacter sphaeroides*, было использовано нами для анализа влияния химических шаперонов – производных резорцина – на стабилизацию электрона в хинонной акцепторной части РЦ. В условиях отсутствия внешних доноров электрона для фотоокисляемого бактериохлорофилла (Р) фотоактивация РЦ приводит к обратимому переносу одного электрона между Р и хинонными акцепторами Q_A и Q_B. Скорость темнового восстановления Р⁺ от хинонных акцепторов отражает эффективность временной стабилизации электрона в акцепторном звене, связанной со сдвигами протонов в белковом окружении хинонов. Обнаружено ускорение темнового возвращения электрона к Р⁺ при добавлении к РЦ 4-гексилрезорцина, меньший эффект наблюдался для 5-этилрезорцина, практически не наблюдался для 2-метилрезорцина и 5-метилрезорцина. Иными словами, выявлена корреляция между длиной боковой гидрофобной углеводородной цепочки в структуре шаперона, позволяющей, очевидно, эффективнее взаимодействовать с амфифильным комплексом РЦ, и оказываемым функциональным воздействием. Сам функциональный эффект по-видимому обусловлен наличием двух гидроксильных групп в структуре шаперона, влияющих на систему водородных связей РЦ и, как следствие, на стабилизацию электрона в хинонной акцепторной части РЦ. Таким образом, показатели функциональной активности РЦ пурпурных бактерий можно использовать в качестве тест-системы для первичного скрининга потенциальных химических шаперонов по эффективности влияния на структурно-динамическое состояние функциональных мембранных белков.

Экспресс метод диагностики ретровирусного лейкоза на основе нанобиосенсора
Сытник Ю.А., Мельниченко Н.Н., Стародуб Н.Ф., Мельничук М.Д., Шмырева А.Н. (Киев, Украина, realcrystallab@univ.kiev.ua)

Для обеспечения населения высококачественными продуктами и снижения экономического ущерба, связанного с заболеваемостью и ограничениями реализации племенного молодняка, молока и мяса необходима профилактика и ликвидация лейкоза крупного рогатого скота. Согласно современным научным данным лейкоз крупного рогатого скота – хроническое инфекционное заболевание опухолевой природы, вызываемое ретровирусом. Источником заболевания являются инфицированные животные на всех стадиях заболевания. Животные заражаются при проникновении в организм лимфоцитов, содержащих вирус, который передается через кровь, молоко и другие биологические вещества. В настоящее время существует ряд способов серологического анализа для определения антигенов и антител, в частности, с целью диагностики инфекционных болезней. Один из них базируется на методе РИД (реакция иммунодиффузии), чувствительность которого колеблется в пределах 5–50 мкг/мл. Время проведения анализа составляет не менее 72 часов. Самой распространенной сегодня является диагностика этого заболевания с помощью твердофазного иммунохимического метода (ELISA), чувствительность которого составляет 1–10 нг/мл. Правда его осуществление требует дорогостоящих реактивов, высококвалифицированного персонала, а также, по крайней мере, 6 часов для выполнения анализа в условиях стационарной лаборатории. Последнее резко ограничивает возможность широкого скрининга, так необходимого для контроля качества пищевых продуктов, однако такая перспектива открывается с созданием специальных инструментальных методов на основе биосенсорной технологии. В последние годы в области биосенсорики все большее внимание уделяется наноструктурированному кремнию, как широко доступному и дешевому материалу. Использование наноструктурированного кремния для создания биосенсоров дает возможность разрабатывать простые устройства для выполнения экспрессных анализов без дополнительного использования каких-либо меченых соединений. Такие устройства особенно полезны для прямого обнаружения биомолекулярных взаимодействий в режиме реального времени. В данной работе предложена методика диагностики лейкоза у крупного рогатого скота путем определения в реальном времени образования иммунных комплексов (белок ретровируса-антитело) с помощью иммунного биосенсора на основе наноструктурированного кремния, что обеспечивает возможность быстрого контроля, как для больных животных, так и непосредственной оценки происхождения молока: от здоровых или больных коров. В отличие от существующих методов диагностики лейкоза крупного рогатого скота, предлагаемый способ дает возможность проводить диагностику в полевых условиях всего лишь за 10 мин. с использованием минимального количества затратных материалов.

**Физико-химические основы создания, изучение свойств и применение
полиэлектролитного ферментного микродиагностикума**

Тихоненко С.А., Дурденко Е.В. (Пуццино)

Целью данной работы является создание и изучение полиэлектролитного ферментного микродиагностикума как средства микро- и наноразмерной величины, позволяющего распознавать и количественно определять низкомолекулярные вещества в нативных биологических жидкостях. Такой микродиагностикум выполнен в виде ансамбля полиэлектролитных микрокапсул (ПЭ-микрокапсул) с включенным в них ферментом, оболочки которых состоят из чередующихся слоев поликатиона и

полианиона. Важным свойством оболочки ПНМК является ее полупроницаемость – проницаемость для низкомолекулярных соединений и непроницаемость для высокомолекулярных веществ и крупных частиц. Благодаря этому свойству полиэлектролитной оболочки, содержащая фермент микрокапсула помещенная в многокомпонентную среду становится анализатором в ней низкомолекулярных веществ – субстратов, ингибиторов или активаторов инкапсулированного фермента. В качестве объекта, были выбраны ЛДГ и уреазы, микродиагностикумы на лактат и мочевины соответственно. Из полученных данных следует, что по сравнению с существующими в медицине ферментативными клинико-биохимическими методами анализа биожидкостей предлагаемый нами микродиагностикум имеет явные преимущества. Фермент, включенный в мультислойную полиэлектролитную капсулу, может, по предварительным данным, сохранять свою активность в течение нескольких месяцев, в то время как активность фермента в растворе, «в свободном» состоянии падает практически до нуля в течение нескольких дней. Фермент, включенный в полиэлектролитную капсулу, полностью сохраняет свою активность в анализируемой биологической жидкости, содержащей протеиназы, что исключает необходимость удаления протеиназ из анализируемой биологической жидкости, что достаточно трудоемко. Микродиагностикум позволяет проводить анализ биожидкости без ее предварительного фракционирования. Предлагаемый нами способ дает возможность многократного использования микродиагностикума. Следует отметить, что в одной полиэлектролитной капсуле содержится лишь десятки пикограммов фермента. Предлагаемый способ в перспективе позволит определять концентрации анализируемого вещества с помощью нескольких или даже одной капсулы, когда оболочка помечена флуоресцентной или радиоактивной меткой. Технология изготовления капсул позволяет варьировать их диаметр от 2 до 10 мкм и толщину оболочки от 10 до 100 нм.

Пути реализации апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного воздействием УФ-света

Трубицына М.С. (Воронеж, mst2905@mail.ru)

К настоящему времени накоплены обширные сведения о типах программированной клеточной гибели, ее морфологических проявлениях, путях реализации, основных «участниках» и регуляторах апоптоза. Вместе с тем требуют уточнения и детализации вопросы, касающиеся изучения способов инициации различных путей апоптоза, выяснения точек («сайтов») их интеграции и возможности целенаправленного регулирования процессов клеточной гибели при помощи физико-химических агентов. Установлено, что через 20 ч после УФ-облучения (240-390) лимфоцитов в дозах 151, 1510 и 3020 Дж/м² имеет место процесс фрагментации ДНК, что указывает на процессы инициации гибели лимфоцитарных клеток человека по типу апоптоза. С целью выявления возможных путей реализации апоптоза в лимфоцитах в условиях воздействия УФ-света нами были исследованы УФ-индуцированные изменения уровня экспрессии CD95 лимфоцитов человека, запускающего процесс гибели клеток исследуемых клеток. Статистически достоверное повышение уровня экспрессии CD95 (Fas-рецептора) по отношению к контролю (интактные клетки) было зарегистрировано через 3, 4, 5 часов после воздействия УФ-света в дозе 151 Дж/м² и через 1-5 часов после воздействия УФ-света в дозах 1510 Дж/м² и 3020 Дж/м² на лимфоциты. Обнаруженное нами повышение уровня экспрессии мембранного рецептора CD95 после УФ-облучения иммуноцитов будет обуславливать более высокую степень «восприимчивости» лимфоцитарных клеток к воздействию апоптотических сигналов. При исследовании УФ-индуцированных изменений функциональной активности ключевой эффекторной каспазы-3 лимфоцитов человека выявлено, что через 8 и 24 ч после облучения в дозе 151 Дж/м² и через 6 и 8 часов после облучения лимфоцитов в дозе 1510 Дж/м² наблюдается

увеличение интенсивности флуоресценции продукта каспазной реакции относительно интактных клеток. После облучения лимфоцитов в дозе 3020 Дж/м² и последующей инкубации клеток в течение 2, 4, 6 и 24 ч выявлено статистически достоверное снижение уровня функциональной активности каспазы-3 по отношению к контрольным образцам. По всей вероятности, с повышением дозы УФ-света до 3020 Дж/м² происходит переключение каспазного рецепторного пути апоптоза с участием каспазы-3 на каспазозависимый путь, связанный с освобождением из митохондрий фактора АIF (фактор, индуцирующий апоптоз), вызывающего конденсацию хроматина и разрыв ДНК. Следовательно, полученные нами данные свидетельствуют в пользу представления об участии как рецепторного каспазозависимого, так и каспазозависимого пути апоптоза лимфоцитов, индуцированного воздействием УФ-излучения в широкой спектральной области. Автор выражает признательность профессору, д.б.н. В.Г. Артюхову и профессору, д.б.н. М.А. Наквасиной за помощь в подготовке тезисов.

Методы оценки качества посевного материала с учетом их устойчивости к негативным факторам окружения

Шадманова А.Р., Саттаров М.А., Саимназарова Ч.Ю. (Ташкент, Узбекистан, lametash@bcc.com.uz)

В настоящее время в мире преобладают тенденции в получении сельскохозяйственной экологически чистой продукции высокого качества, и наблюдается постоянный рост цен на нее на рынках сбыта. Особенно это ярко проявляется в производстве такой важной культуры как рис. Практически все население мира употребляет рис, рисовую муку и другие продукты переработки зерна риса в связи со сбалансированным содержанием в нем жизненно необходимых питательных веществ. В республике Узбекистан на протяжении целого ряда лет особое внимание уделялось возделыванию этой ценнейшей культуры с целью получения одного из основных продуктов питания – зерна риса. Была построена инфраструктура, способствующая селекции высокопродуктивных сортов риса, развитию семеноводства и созданию агротехники возделывания этой культуры, что в целом позволило получать стабильные урожаи зерна риса с высокими пищевыми качествами.

Существенные изменения, происходящие в экосистемах, загрязнение экосайтов экотоксикантами на фоне резко меняющихся климатических условий, приводящих в том числе к уменьшению возможности потребления поливных вод, засолению, засухе, а также к появлению новых форм микроорганизмов (экстремофильных), более агрессивных по отношению к культуре риса, требуют новых концепций и подходов в разработке технологий, повышающих адаптивность различных сельскохозяйственных культур к быстро меняющимся условиям окружающей среды, а также разработки новых сортов, агротехники возделывания, методов защиты растений и усовершенствованных стандартов на посевные семена. Причем в этих стандартах должны быть включены современные наукоемкие новые критерии оценки сортовой чистоты семенного материала, такие как устойчивость растений риса к заболеваниям, засолению, засухе и некоторые другие показатели.

Цель проводимых нами исследований заключается в усовершенствовании Государственного стандарта Республики Узбекистан на семена риса посевного, маркированные по хозяйственно-ценным признакам. Это достигается за счет использования биохимических маркеров для оценки сортовой чистоты и улучшения сортов риса по хозяйственно-полезным признакам. Отобраны и использованы биохимические маркеры для оценки сортовой чистоты и выбора толерантных биотипов растений к различным неблагоприятным факторам окружения (засоление, засуха, болезни и др.), обладающих скороспелостью. Предлагаемый метод маркер-

экономическое обоснование использования данной технологии предпосевной обработки семян риса, регламент этого процесса и рекомендации по применению разработанной технологии. Разработанная технология адаптирована к имеющимся производственным мощностям подготовки высококачественных семян различных сельскохозяйственных культур. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю И.Н. Рубану и д.х.н. Н.Л. Воропаевой за помощь в работе.

The influence of MEM waves on the surface tension coefficient of DNA water solutions

Nersisyan S.S. (Yerevan, Armenia, suen20@mail.ru)

Based on the well known hypothesis millimeter electromagnetic (MEM) waves' effect on biological objects has an informative-resonant nature, but not an energetic one. Nowadays it is commonly accepted the viewpoint according which MEM waves' effect on biological systems is attributed with their influence on the water. The similarity of resonance frequencies allows to make a conclusion about the existence of an overall mechanism of MEM waves' effect on those systems, which, most probably, is related with the cluster structure of the water. Under the influence of MEM waves the structure of biological objects, (particularly DNA water solutions), thus their physical and chemical features are changed. From this point of view it is important to study the influence of MEM waves on DNA water solutions using different methods.

Based on the widely accepted theory, MEM waves, during the interaction with biological systems are able to penetrate into the deeper layers. A series of experimental data testify about it, such as densitometrical, during which the density of the DNA solutions were measured before and after the irradiation at the resonant frequencies of water molecular structures' oscillations. As a result an increase in the irradiated DNA solution was detected in comparison with the non-irradiated solution.

We have systematically measured the surface tension coefficient of the irradiated as well as non irradiated water, buffer solution and DNA water solution in a wide temperature range (24.9-63.8°C). As the results have shown, the surface tension coefficient did not change before and after the irradiation for all above mentioned solutions within the accuracy of the experiment. Thus, summarizing the obtained results, we can conclude, that MEM waves at the frequencies of water molecular oscillations are able to penetrate into the deeper layers of biopolymers' water solutions. The author expresses her gratitude to Prof. Yu.S. Babayan for valuable discussions.